

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Levana Ferromagnetizada: uma matriz de afinidade para purificar
lectina de sementes de *Cratylia mollis* (Cramoll 1)**

Aluna: Renata Angeli

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Tereza dos Santos Correia

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Valente

Recife, 2006

Renata Angeli

**Levana Ferromagnetizada: uma matriz de afinidade para purificar
lectina de sementes de *Cratylia mollis* (Cramoll 1)**

**Dissertação apresentada para
o cumprimento parcial das
exigências para obtenção do
título de Mestre em Ciências
Biológicas pela Universidade
Federal de Pernambuco.**

Aprovado por: _____

Data: ____/____/____

Angeli, Renata

Levana ferromagnetizada: uma matriz de afinidade para purificar lectina de sementes de *Cratylia mollis* (Cramoll 1) / Renata Angeli. – Recife: O Autor, 2006.

53 folhas : il., fig.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.

Inclui bibliografia.

1. Lectinas de *Cratylia mollis* 2. Levana 3. Levana Ferromagnética I. Título.

**573
570**

**CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)**

**UFPE
CCB – 2006 -052**

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, NÍVEL MESTRADO, DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO.

Aos dois dias do mês de junho de dois mil e seis, às nove horas, no Auditório do Centro de Ciências Biológicas, realizou-se a defesa de dissertação apresentada pela Mestranda **Renata Angeli**, intitulada: "**Levana Ferromagnetizada: uma matriz de afinidade para purificar lectinas de sementes de *Cratylia mollis* (Cramoll 1)**". A Banca Examinadora foi homologada em vinte e três de maio de dois mil e seis, pela PROPESQ, tendo como membros titulares, os Professores: **Maria Tereza dos Santos Correia** (Orientadora), Doutora em Ciências Biológicas, pela Universidade Federal de São Paulo, **Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho**, Doutora Ph.D em Bioquímica, pela Universidade de Londres, Inglaterra, **Adriana Carla Cavalcante Malta Argôlo**, Doutora em Ciências Biológicas, pela Universidade Federal de Pernambuco; **Suely Lins Galdino**, Doutora em Ciências Farmacêuticas, pela Universidade de Joseph Fourier, França e **Patrícia Maria Guedes Paiva**, Doutora em Ciências Biológicas, pela Universidade Federal de São Paulo, suplentes. A Profª. Tereza Correia, deu início à Sessão, para apresentação de defesa de Mestrado. Agradeceu a presença de todos e após ler os termos convidou a Mestranda para apresentação de sua defesa, que efetuou durante vinte e quatro minutos. Continuando, a Profª. Tereza Correia solicitou à Comissão Examinadora a ocupar seus lugares. A seguir, procedeu-se à arguição na seguinte ordem: Dr.ª Adriana Argôlo (1º examinador); Dr.ª Luana Coelho (2º examinador); Dr. Tereza Correia (3º examinador). A presidenta fez agradecimentos e em seguida solicitou dos convidados que se retirassem por alguns minutos a fim proceder a avaliação. A Banca Examinadora atribuiu a **Renata Angeli** a seguinte menção: "**Aprovada com Distinção**" por unanimidade. Face ao resultado a mesma está apta a colar o grau de Mestre em Ciências Biológicas, Área **Biotecnologia**, pela Universidade Federal de Pernambuco. Nada mais havendo a tratar a sessão foi encerrada e para constar eu, Adenilda Eugênia de Lima, Secretária, lavrei, datei e assinei a presente ata que também assinam os demais presentes. Recife, 02 de junho de 2006.

Adenilda Eugênia de Lima
Renata Angeli
Patrícia Maria Guedes Paiva
Adriana Carla Cavalcante Malta Argôlo
Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho
Suely Lins Galdino
Maria Tereza dos Santos Correia
Adenilda Eugênia de Lima
Renata Angeli
Patrícia Maria Guedes Paiva
Adriana Carla Cavalcante Malta Argôlo
Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho
Suely Lins Galdino
Maria Tereza dos Santos Correia

**Aos meus pais, Renato e Lourdes,
por entenderem minhas prioridades e
por acreditarem sempre no meu sucesso!
Obrigada pela paciência, por sempre
estarem dispostos para mim, pelo
orgulho e principalmente pelo amor!
Desculpa as ausências, os estresses, a
falta de paciência, o mau humor...! Amo
vocês sempre e muito!!!**

**Ao meu irmão Raphael, o meu
agradecimento silencioso, a saudade é
imensa mas estou certa que de onde você
estiver, estará olhando feliz e muito
orgulhoso!!!**

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Maria Tereza dos Santos Correia, por tudo sempre!!! Obrigada por atender às minhas necessidades, às minhas cobranças, aos meus estresses, às minhas dúvidas, aos meus medos... e entender tudo isso!!! Você sempre foi mais do que eu esperava e vai ser eternamente a minha orientadora preferida! A nossa amizade e parceria será para sempre (mesmo que fisicamente mais distante agora), eu tenho certeza!!!

À Prof^a. Dr^a. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho, pela valiosa contribuição científica. Obrigada pelo apoio e estímulo constantes e por me fazer sentir tão bem acolhida e importante neste nosso maravilhoso grupo de trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Patrícia Maria Guedes Paiva pela colaboração e pela grande amizade e carinho. Obrigada por estar junto comigo disposta a dar sempre o seu melhor, pelo desprendimento e estímulo constante!

Ao Programa Casadinho do CNPq, que possibilitou minha ida à UFRJ estender meus conhecimentos. A todos que fazem o Instituto de Bioquímica Médica pelo desprendimento e pela ajuda. Um agradecimento muito especial à Prof^a. Dr^a. Débora Foguel e Lina Zingali por terem me recebido tão bem; obrigada pela amizade que foi construída nesses meses e pelas possibilidades que vocês me apresentaram!

A todos do Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear em especial à Prof^a. Dr^a. Ana Paula Valente e ao Prof. Dr. Fábio Almeida, obrigada pela atenção, confiança e disponibilidade sempre. Vocês me proporcionaram o prazer de descobrir a Ressonância Magnética Nuclear, espero que nossa parceria iniciada no Mestrado continue agora no Doutorado, muitas coisas boas ainda virão! Um agradecimento especial também a Cristiane Ano Bom, Carolina Cruzeiro e Talita Santos pela grande ajuda e amizade!

Aos professores do Departamento de Bioquímica da UFPE, pela atenção e apoio constantes. Um agradecimento especial à Prof^a. Dr^a. Vera Menezes pela ajuda e à Prof^a. Dr^a.

Maria da Paz pela contribuição e ajuda, e também à Prof^a. Dr^a. Suely Galdino coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas pelo estímulo e pela confiança!

À Prof^a. Dr^a. Glícia Calazans do Departamento de Antibióticos por ceder as levanas. Obrigada pelo carinho, pela ajuda e explicações constantes! Adorei nossa parceria!!!

A todos os funcionários do Departamento de Bioquímica da UFPE pela atenção e competência, a Neide e Miron pelo carinho e pela ajuda diários e as secretárias do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Liane e Adenilda pelo bom humor e pela disposição, sempre!

À Maria e a João pela competência e profissionalismo com que vocês fazem ciência. Obrigada por estarem sempre perto, por toda a ajuda, amizade e pelo carinho diário!

À Jackeline Maciel pela paciência e ajuda e, principalmente pela atenção que me foram dispensados! E à Ana Catarina que me ajudou a fazer as estatísticas e foi sempre presente quando eu precisei!

A todos que fazem o Laboratório de Glicoproteínas da UFPE por fazerem deste a extensão da minha casa e por me proporcionarem um ambiente agradável e muito divertido. Um agradecimento especial ao meu ‘orientando’ Fernando pela ajuda e por aprender de forma rápida e segura como fazer ciência.

Aos meus amigos da turma de mestrado, pela paciência, ajuda e amizade! Foi muito bom ter feito parte da primeira turma do mestrado em Ciências Biológicas! Um agradecimento especial à Daniela Viana pela grande amizade e pelo carinho!

A todos os novos amigos do Rio de Janeiro, principalmente os que fazem o Laboratório de Amiloidoses e Proteínas Agregadoras – LAPA, pela recepção, disponibilidade, atenção e, principalmente pelo desprendimento e carinho! Vocês foram importantíssimos para as minhas descobertas e para as minhas decisões....! Gostaria de agradecer a todos através do meu obrigada em nome de Carolina Braga, Leonardo Palmiere, Juliana Cortines e Yraima Cordeiro por tudo mesmo!!!

Aos meus amigos queridos e amados de sempre e para sempre Ana Paula, Danilla, Deborah, Gabriella, Jayme, Marcelo e Renata pelo apoio, paciência, carinho. Enfim pela nossa amizade tão verdadeira que se manteve apesar de rotinas tão diferentes e da distância! Agora o ciclo recomeça...Obrigada pelos meus já tão amados sobrinhos!!!

À Andréa, Adriana, Cynthia, Flávia, Maria Danielly, Mariana e Regininha pela nossa união, confiança e cumplicidade que fez com que juntas superássemos os nossos obstáculos diários e conseguíssemos fazer ciência de uma forma tão linda! Obrigada pela força, pelo carinho, pelas descobertas diárias e principalmente pelos nossos momentos *off* sempre tão divertidos! Agora a separação será somente física (sempre soube que iríamos atrás do que julgamos melhor) porque no coração estaremos sempre unidas!!!

À Nathalia, por saber que ela vai estar sempre ali, pelo sorriso, abraço, companheirismo e carinho! Sem você nada teria sido tão bonito e tão prazeroso!!! Você é imprescindível e insubstituível!!! Obrigada por tudo!!! Sempre!!!

À minha família, avós, tios e primos por sempre me apoiarem e sempre se orgulharem de mim. Um agradecimento especial à minha avó Nair, pelo carinho e aos meus tios Ranúzia, Suzi pela amizade e força nessa minha caminhada! Obrigada também aos primos Débora e Ricardo pela acolhida e pela amizade! Ao meu tio Renato meu agradecimento mais que especial pela amizade, amor, companheirismo, por tudo que você representa para mim, obrigada por tudo!

"Esperança não é otimismo, não é a convicção de que algo terá um final feliz, mas a certeza de que algo faz sentido sem considerarmos como terminará. Penso, portanto que é de outro lugar que captamos a mais profunda e importante esperança, a única que, apesar de tudo, é capaz de nos manter na superfície, de nos instar a boas ações e que é a única fonte de grandeza do espírito humano. E é essa esperança que nos dá força de viver e experimentá-la sempre de novo."

Vaclav Havel

RESUMO

Levanas, compostas por resíduos D-frutofuranosil unidos por ligações β -2,6 podem ser produzidas por diversas espécies de plantas e bactérias. Aplicações para estes polissacarídeos têm sido sugeridas na indústria alimentícia, farmacêutica e na medicina. As partículas magnéticas são largamente estudadas para suas aplicações nas áreas biológica e biomédica. As lectinas são proteínas amplamente distribuídas entre plantas, animais e microorganismos. Cramoll 1 é uma lectina glicose/manose e sua purificação é feita através de um extrato das sementes de *Cratylia mollis* a 10 % (p/v), posteriormente uma precipitação com sulfato de amônio a 40 a 60 % de saturação (F40-60). Esta foi então cromatografada em Sephadex G-75 (Cramoll 1,4), seguida por uma cromatografia de troca iônica em CM-cellulose (Cramoll 1 e Cramoll 4). Esta lectina tem uma grande variedade de aplicações biotecnológicas. Cramoll 3, lectina galactose específica, também purificada a partir do extrato das sementes de *C. mollis* e fracionamento com sulfato de amônio a 0 a 40 % de saturação (F0-40), foi cromatografada por exclusão molecular em Sephadex G-100. A Ressonância Magnética Nuclear já é referência mundial para a análise de estruturas moleculares em diversas áreas do conhecimento, sendo utilizada frequentemente para polissacarídeos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o uso de levana de *Zymomonas mobilis* insolubilizada na sua forma magnetizada (FMZAG-12) para purificar lectinas fructose específicas usando preparações de lectinas de sementes de *C. mollis*. Testes de inibição da Atividade Hemaglutinante (AH) foram utilizados para avaliar a ligação específica de Cramoll 1, Cramoll 1,4, Cramoll 3 e Con A às levanas (ZAG-12, na sua forma nativa e fracionadas por etanol, Z-1-81, ZAP e CP-50). Estas mesmas lectinas e a F40-60 foram incubadas com a FMZAG-12 que foi usada como um suporte de afinidade; as proteínas adsorvidas foram eluídas com seus carboidratos específicos. Métodos eletroforéticos e AH foram utilizados para avaliar as lectinas obtidas. As levanas inibiram diferentemente a AH das lectinas. Con A e Cramoll 1,4 ligadas a FMZAG-12 foram eluídas com glicose, a eluição de Cramoll 1,4 mostrou o mesmo padrão eletroforético (duas bandas polipeptídicas). Cramoll 3 não se ligou ao suporte magnetizado. Quando a F40-60 foi incubada apenas a Cramoll 1 foi purificada, revelando uma banda polipeptídica (padrão). Levanas então inibiram diferentemente a AH das lectinas testadas e FMZAG-12 foi eficiente em purificar Cramoll 1 através de um protocolo mais rápido.

ABSTRACT

Levans, fructose polymer, are composed by β -2,6 linkages and can be produced by different species of plants and bacteria. Applications for levans have been suggested in food industries, pharmaceuticals, also in medicine. Ferromagnetic particles in biomedical and industrial areas have been used. Lectins found are ubiquitously distributed in nature, and occur in plants, animals and microorganisms. Cramoll 1 is specific to glucose/mannose and was purified through 10 % (w/v) seed extract of *Cratylia mollis*, fractionated with ammonium sulphate and the fraction (F) 40 to 60 % of saturation (F40-60) was affinity chromatographed in Sephadex G-75 (Cramoll 1,4) followed by ion exchange chromatography in CM-cellulose (Cramoll 1 and Cramoll 4). This lectin has successfully been used in different biological assays. Cramoll 3, galactose specific, was purified by the same 10 % (w/v) seed extract followed by ammonium sulphate fractionation and the fraction (F) 0 to 40% of saturation (F0-40) was ion exchange chromatographed in Sephadex G-100. Nuclear Magnetic Resonance constituting one of the major methods for structure elucidation of biomolecules in general and this technique is used with polysaccharides. The aim of this work was to evaluate the use of *Zimomonas mobilis* levans insolubilized and ferromagnetic (FMZAG-12) to purify lectins fructose specific using preparations of lectins of *C. mollis* seeds. Hemagglutinating activity (HA) inhibition assays were used to evaluate the specific binding of Cramoll 1, Cramoll 1,4, Cramoll 3 and Con A to levans (ZAG-12 native form and fractionated by ethanol, Z-1-81, ZAP and CP-50). Con A, Cramoll 1,4, Cramoll 3 and F40-60 were incubated to FMZAG-12 which was used as affinity support; bound lectins were eluted with specific carbohydrates. Electrophoresis and HA were used to analyze obtained lectins. Con A and Cramoll 1,4 bound to FMZAG-12, eluted with glucose. The elution of Cramoll 1,4 showed its characteristic electrophoretic pattern (two polypeptide bands). Cramoll 3 did not bind. When F40-60 was incubated with FMZAG-12, only Cramoll 1 was purified, revealing one polypeptide band (isoelectin pattern). Levans inhibited differently the AH of lectins and FMZAG-12 was able to purify Cramoll 1 through a faster protocol.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura típica de uma levana com ligações β -2,6.

Figura 2. Micrografia eletrônica da bactéria *Zimomonas mobilis*.

Figura 3. Levana ferromagnética sob ação de um campo magnético (6.000 Oe).

Figura 4. Estrutura tridimensional do monômero da isoforma 1 da lectina de *Cratylia mollis* – Cramoll 1. Originada pelo programa MOLMOL (KORADI *et al.*, 1996).

Figura 5. Radiação Eletromagnética.

Figura 6. Espectro 1D (^1H NMR) das levanas de *Zymomonas mobilis*. Todos os espectros foram feitos a 60 °C para as amostras em solução de D_2O . 1: ZAG-12, forma nativa; 2: ZAG-12 f30; 3: ZAG-12 f70; 4: Z-1-81, forma nativa; 5: CP4, forma nativa; 6: levana de *Erwinia herbicola*.

Figura 7. Eluição da Con A (1,5 mg) pela FMZAG-12L, cada barra representa o desvio padrão de quatro experimentos.

Figura 8. Eluição da Cramoll 1 (1,5 mg) pela FMZAG-12L, cada barra representa o desvio padrão de quatro experimentos. Eletroforese para proteínas nativas e básicas, corada com negro de amido das amostras 14 e 15 (100 μg) (B).

Figura 9. Teste de saturação com diferentes concentrações da F40-60 [18(A) e 5(B) mg] para a eluição da Cramoll 1 pela FMZAG-12L. C mostra a melhor eluição para Cramoll com 10 mg da F40-60, cada barra representa o desvio padrão de quatro experimentos. Eletroforese para proteínas nativas e básicas, corada com negro de amido das amostras 14 e 15 (100 μg).

1. INTRODUÇÃO

1.1 Polissacarídeos

Polissacarídeos, também conhecidos por glicanas, consistem de unidades de monossacarídeos unidas por ligações glicosídicas. Eles são classificados como homopolissacarídeos ou heteropolissacarídeos quando constituídos por um ou mais tipos de monossacarídeos, respectivamente (Voet *et al.*, 1999). Essas macromoléculas naturais, presentes em quase todos os organismos vivos, exercem várias funções: fazem parte da estrutura das paredes celulares de plantas superiores ou algas marinhas (celulose, hemicelulose, pectina) ou de animais (quitina, mucopolissacarídeos); são reservas metabólicas de plantas (amido, dextranas, frutanas) e de animais (glicogênio); agem como substâncias protetoras de plantas, devido a sua capacidade de reter grandes quantidades de água, o que faz com que os processos enzimáticos não sejam interrompidos mesmo em condições de desidratação (Imrie e Tilbury, 1972; Brock e Madigan, 1991).

Diversos microrganismos produzem grandes quantidades de polissacarídeos sob uma ampla variedade de condições. Tais biopolímeros desempenham papéis específicos e sua produção está intimamente ligada à capacidade de sobrevivência a condições adversas do meio (Pace, 1987; Glazer e Nikaido, 1995; Pelczar *et al.*, 1997). Muitos polissacarídeos microbianos estão associados à superfície celular; porém os exopolissacarídeos estão totalmente dissociados da célula microbiana, apresentando considerável diversidade em composição e estrutura (Sutherland, 1990).

Os polissacarídeos microbianos (dentro de uma classe de polímeros ou gomas solúveis em água) são os de maior interesse comercial, sendo usados amplamente como espessantes, gelificantes, agentes suspensores ou colóides de proteção (Mulchandani *et al.*, 1988). Consta o uso de goma arábica como componente do fluido de embalsamamento usado pelos antigos egípcios e o cozimento de algas vermelhas pelos chineses, para produção de um gel que era flavorizado e adoçado para uso como alimento (Kang e Cottrell, 1979).

A produção de polissacarídeos para uso comercial por fermentação, comparada à extração destes de plantas e algas ou síntese química oferece muitas vantagens, dentre elas: a ampla diversidade de polímeros produzidos por microrganismos e a produção de goma em quantidade suficiente e qualidade independente de variações no meio ambiente (Sutherland, 1983). Espécies de fungos filamentosos e leveduriformes produzem polissacarídeos, porém os de origem bacteriana (*Aerobacter levanicum*, *Zymomonas mobilis*, *Escherichia coli*),

apresentam maior viabilidade industrial e comercial (Calazans *et al.*, 2000; Jang *et al.*, 2001; Lobato, 2003).

1.1.1 Levanas

Dois tipos de polímeros de frutose são encontrados na natureza: inulina, constituído por resíduos de D-frutose unidos por ligações β -2,1 e levana, composto por resíduos D-frutofuranosil unidos por ligações β -2,6 (Jang *et al.*, 2001). As levanas (Figura 1) podem ser produzidas por diversas espécies de plantas e bactérias, onde a distribuição do peso molecular e o grau de ramificação dependem da fonte produtora deste biopolímero. Levanas produzidas por vegetais apresentam baixo peso molecular e poucas ramificações; enquanto as produzidas por síntese microbiana ou enzimática exibem peso molecular elevado, da ordem de $2,5 \times 10^6$ daltons, e podem conter numerosas ramificações (Barros, 2002; Bekers *et al.*, 2005). O peso molecular de levanas produzidas por via fermentativa está relacionado com a força iônica do meio de produção.

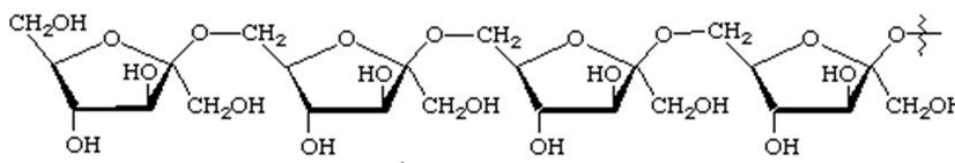


Figura 1. Estrutura típica de uma levana com ligações β -2,6.

Levanas obtidas por síntese microbiana são polímeros com solubilidade variada em água na temperatura ambiente, muito solúveis em temperaturas acima de 40° C e insolúveis em etanol. Elas são mais solúveis em água que as inulinas e são polímeros não redutores, susceptíveis à hidrólise por ácidos (Barros, 2002). Segundo Bekers *et al.* (2002), a concentração de sacarose e a temperatura são fatores muito importantes que regulam a atividade catalisadora da levanassacarase de *Zymomonas mobilis* na síntese de frutooligossacarídeos e produção de levana. Concentrações de sacarose entre 10-15 % a 25 °C levam a produção de etanol; enquanto que, sacarose a 50-70 % a 45-50 °C garantem a síntese de frutooligossacarídeos.

A estrutura química e as propriedades fisiológicas das levanas têm sido estudadas extensivamente em termos de peso molecular, tipo de ligação e viscosidade. Aplicações para estes polissacarídeos têm sido sugeridas na indústria alimentícia como emulsificante, estabilizante, espessante, carreador de sabores e fragrâncias e também na indústria

farmacêutica, em cosméticos (Bekers *et al.*, 2005); na medicina, como um substituto do plasma, prolongador de atividade de drogas, como agente antihiperlipidêmico e como um potencial agente antitumoral (Calazans *et al.*, 2002; Yoo *et al.*, 2004).

Zymomonas mobilis (Figura 2) é uma bactéria anaeróbica aerotolerante, Gram-negativa, produtora de etanol a partir de glicose utilizando a via de Entner-Doudoroff (2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato, KDPG) em conjunto com as enzimas piruvato descarboxilase e álcool desidrogenase. Essa bactéria apresenta uma maior produtividade de etanol (3-7 vezes) em relação às leveduras, com um rendimento teórico máximo de 97 %.

Além da alta produção de etanol, outras características favoráveis tais como condições simples para crescimento, tolerância a altas concentrações de açúcar (>400 g/L) e resistência a altas concentrações de etanol (>12 %) fariam da bactéria um bom competidor para as tradicionais leveduras se a faixa limite de substrato pudesse ser vencida. Por outro lado, o crescimento da bactéria em meio contendo sacarose é acompanhado pela formação extracelular de levana e sorbitol com significativa redução na produção de etanol, neste meio ela converte a sacarose em glicose e frutose usando três enzimas: uma levanassacarase extracelular (LevU, formando levana e glicose), uma invertase extracelular (InvB, formando glicose e frutose) e uma segunda invertase (InvA) cujo papel exato e localização, em *Z. mobilis*, ainda não se conhecem (Sprenger, 1996; Ananthalakshmy e Gunasekaran, 1999).

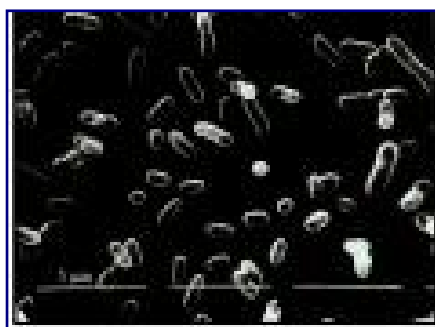


Figura 2. Micrografia eletrônica de *Z. mobilis*.

1.1.2 Magnetização

As partículas magnéticas (micropartículas, nanopartículas e ferrofluidos) são largamente estudadas para suas aplicações nas áreas biológica e biomédica. Os materiais magnéticos modificados são compostos de um núcleo de óxido de ferro coberto com um polímero. Essa cobertura, em geral, é biocompatível (tal como dextrana, PEG, etc.), ou possui

grupos ativos que podem ser conjugados a biomoléculas tais como proteínas e enzimas (Ma *et al.*, 2003; Yamaura *et al.*, 2004).

A utilização de partículas ferromagnéticas na área biomédica (Pardoe *et al.*, 2001) e industrial (Hong *et al.*, 2004) tem sido largamente explorada. Grande parte destas aplicações necessita de compostos quimicamente estáveis, solúveis em água, biocompatíveis, biodegradáveis e atóxicos. Polissacarídeos magnéticos (Figura 3) como a dextrana têm sido muito utilizados em diversas aplicações como agentes de contraste em ressonância magnética, imunoensaio, transporte de drogas magneticamente controlado, termoterapia contra câncer ou tumor, detecção de modificações da membrana celular (Roger *et al.*, 1999) e engenharia química (Hong *et al.*, 2004; Kawaguchi e Hasegawa, 2000; Kawaguchi *et al.*, 2001; Pardoe *et al.*, 2001; Paul *et al.*, 2004).

Técnicas de separação magnética têm muitas aplicações em várias áreas da biociência e da biotecnologia. Essas técnicas são usadas especialmente em biologia molecular para a separação de ácidos nucleicos e oligonucleotídeos (Bosnes *et al.*, 1997), em biologia para a separação de células alvo e organelas celulares, em microbiologia para a pré-concentração de microrganismos patogênicos (Šafařík e Šafaříková, 1999), em bioquímica para o isolamento de várias enzimas, lectinas e anticorpos (Šafařík e Šafaříková, 2000) e em química analítica para a pré-concentração de analitos (Šafařík e Šafaříková, 1999). Essas aplicações incluem também técnicas de imagem de ressonância magnética (MRI) para diagnóstico do câncer, terapia do câncer tal como drogas controladas por carreadores magnéticos e hipertermia, e remoção de elementos tóxicos de resíduos industriais (Yamaura *et al.*, 2004).

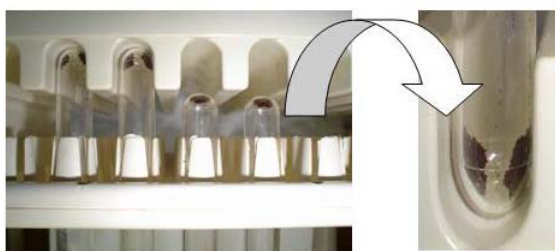


Figura 3. Levana ferromagnética sob ação de um campo magnético (6.000 Oe). (Maciel, 2005)

1.2 Lectinas

As lectinas são proteínas amplamente distribuídas entre plantas, animais e microorganismos (Rojo *et al.*, 2003; Banerjee *et al.*, 2004; Böckelmann *et al.*, 2004). Estas macromoléculas são conhecidas por sua capacidade de aglutinar células, especialmente

eritrócitos de diferentes espécies animais (Paiva e Coelho, 1992; Correia e Coelho, 1995; Reynoso-Camacho *et al.*, 2003).

O termo lectina (originado do latim *lectus*, que significa selecionado, escolhido) foi proposto por Boyd e Shapleigh (1954) para fazer designação de um grupo de proteínas que apresentavam uma característica comum: seletividade na interação com carboidratos. Este termo foi generalizado por Sharon e Lis (1972), englobando todas as proteínas presentes em fontes de natureza variada, de origem não imunológica, capazes de se ligarem a carboidratos, com especificidade ou não para eritrócitos de um determinado grupo sanguíneo.

A origem não imune das lectinas serve para distingui-las de anticorpos anticarboidratos que aglutinam células. Enquanto os anticorpos são estruturalmente similares, as lectinas diferem entre si quanto à composição aminoacídica, requerimentos de metais, peso molecular e estrutura tridimensional (Moreira *et al.*, 1998).

Avanços recentes na análise estrutural e molecular destas proteínas têm redefinido o termo lectina. De acordo com a nova definição, são consideradas lectinas as proteínas ou glicoproteínas que possuem pelo menos um sítio que se liga reversivelmente a mono ou oligossacarídeos específicos, sem apresentar função catalítica ou características imunológicas (Peumans e van Damme, 1995). Esta definição é mais abrangente, pois inclui uma série de proteínas com diferentes propriedades de aglutinação e/ou precipitação de glicoconjugados.

Cada lectina liga-se a um carboidrato específico ou grupos de carboidratos em oligossacarídeos ou glicoproteínas, através de seus sítios de ligação que tendem a se localizar na superfície da molécula protéica, essa interação é obtida através de ligações fracas como: pontes de hidrogênio, interação de Van der Waals, interações hidrofóbicas (Sharon e Lis, 2002). A maioria dessas interações, por sua vez, é feita pelas pontes de hidrogênio devido à maior disponibilidade do grande número de grupos hidroxilas nos açúcares, que permite a criação dessas pontes entre os aminoácidos da lectina e o açúcar. Pontes de hidrogênio mediadas por água também participam da interação lectina-carboidrato, e moléculas de água podem agir como pontes ou elementos estruturais fixos (Naismith e Field, 1996).

Várias lectinas requerem ainda cátions divalentes, como Ca^{2+} e Mg^{2+} , para estabilizar e fixar a estrutura dessas proteínas. Sem eles não é possível a formação dos domínios de reconhecimento de carboidratos a partir de grupos funcionais presentes em diferentes partes da cadeia peptídica (Rini, 1995).

O ensaio de atividade hemaglutinante com eritrócitos de diferentes animais e de inibição por carboidratos e/ou glicoconjugados é um excelente meio de caracterização lectínica, promovendo a descoberta quanto à ligação específica a eritrócitos, quanto à

especificidade a mono, di ou oligossacarídeos e quanto à capacidade de interação da lectina em estudo a outras moléculas como glicoproteínas, glicopeptídeos ou polissacarídeos (Moreira *et al.*, 1998; Machuka, 1999).

As lectinas de plantas são as únicas proteínas de origem vegetal capazes de reconhecer e de se ligar a glicoconjugados presentes na superfície de microorganismos ou no trato intestinal de insetos e mamíferos herbívoros; tais moléculas parecem desempenhar um importante papel de proteção do vegetal contra esses organismos predadores, afetando o crescimento e desenvolvimento de insetos e apresentando atividades tóxicas em animais herbívoros (Lehninger, 2002). Algumas lectinas já são conhecidas quanto à sua toxicidade, tais como a lectina de *Phaseolus vulgaris* (PHA), a lectina de *Robinia pseudoacacia* e a lectina de *Sambucus nigra* (Peumans *et al.*, 1998; Rabjins *et al.*, 2000).

Estas proteínas são particularmente abundantes em sementes de leguminosas (Konozy *et al.*, 2003), chegando a constituir até 10 % da proteína total (Sharon e Lis, 1990; Spilatro *et al.*, 1996). A maioria dos estudos indicou a presença de lectinas em células parenquimatosas de armazenamento e em vacúolos especializados denominados corpos protéicos. Outras pesquisas relataram que estas proteínas estão presentes no interior do citoplasma e associadas à parede celular (Santos *et al.*, 2004).

O papel fisiológico das lectinas nas plantas não está claramente definido, mas crescentes estudos sugerem que essas moléculas são proteínas de defesa contra ataques de predadores como vírus, fungos e insetos (Cavada *et al.*, 1998; Ratanapo *et al.*, 2001). Porém outras hipóteses estão sendo investigadas como, por exemplo, reconhecimento celular, simbiose, estoque de proteínas (Van Damme *et al.*, 1996), bem como a estimulação, proliferação e crescimento celular da planta (Wititsuwannakul *et al.*, 1998).

A disponibilidade de um grande número de lectinas, com diferentes especificidades para carboidratos, tem resultado na crescente utilização dessas versáteis proteínas como valiosos instrumentos em pesquisas médicas e biológicas. A associação de lectinas com carboidratos é um evento primário em alguns processos biológicos tais como, infecção e metástase. Em adição a este papel importante no reconhecimento celular, a interação de lectinas com carboidratos tem sido explorada em vários ramos de pesquisa onde a especificidade sacarídica é essencial (Baskin *et al.*, 2000; Sharon e Lis, 2001; Shibuya, 2001).

Estas proteínas são utilizadas como mediadores de liberação e adsorção, na mucosa, de drogas e micropartículas (Clark *et al.*, 2000); na visualização e caracterização bioquímica de polissacarídeos de biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* (Strathmann *et al.*,

2002); como agentes mitogênicos (Maciel *et al.*, 2004); ainda, pela sua versatilidade, as lectinas têm sido usadas para a tipagem de células vermelhas do sangue (Mo *et al.*, 2000).

Em células tumorais ocorre geralmente um aumento de glicoproteínas de membrana, resultante de modificações que ocorrem em regiões controladas por determinados genes (Hounssel *et al.*, 1992). Aumento na ramificação dos açúcares e alterações em complexos com ácido siálico em diferentes estágios da transformação tumoral aparentemente estão associados com o aumento da capacidade de tais células realizarem metástases (Dennis *et al.*, 1989). Com base nas transformações das glicoproteínas destas células, as lectinas estão sendo usadas para detectar alterações durante transformações (Beltrão *et al.*, 1998) e no reconhecimento de fatores envolvidos no crescimento de tumores (Sarui *et al.*, 2002). Além disso, já foi observada a capacidade antitumoral dessas proteínas, e elas já estão sendo avaliadas por esta propriedade (Wróbleski *et al.*, 2001; Andrade *et al.*, 2004).

Várias espécies de plantas têm sido descritas como tendo propriedade hipoglicêmica. Kavalali *et al.*, (2003) propuseram a lectina de sementes de *Urtica pilulifera* como princípio ativo responsável por atividade hipoglicemiante em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina. Outras propriedades biológicas já foram detectadas: antifúngica, nas lectinas isoladas da orquídea *Gastrodia elata* (Liu *et al.*, 2002) e das sementes de *Talisia esculenta* (Freire *et al.*, 2002) e lectina com atividade aglutinante contra bactéria patogênica, como a encontrada em *Anguilla japonica* (Tasumia *et al.*, 2004).

1.2.1 Purificação de Lectinas

As lectinas de diferentes fontes, para serem purificadas, em geral, requerem, inicialmente, a preparação de extratos em soluções aquosas salinas (Kawagishi *et al.*, 2001; Mladenov *et al.*, 2002). Alguns extratos com atividade lectínica são submetidos a purificações parciais por métodos como diálise exaustiva ou fracionamento salino, em especial, com sulfato de amônio (Coelho e Silva, 2000).

Posteriormente para o aumento da pureza e o rendimento da proteína, são utilizadas técnicas cromatográficas. Dentre as existentes, a cromatografia de afinidade é extremamente poderosa para o isolamento de macromoléculas, ocupando uma posição ímpar na tecnologia de separação de proteínas visto que se baseia em interações moleculares bioespecíficas do tipo não covalentes (Helmholz *et al.*, 2003). A aplicação deste tipo de cromatografia na purificação de lectinas é principalmente baseada na habilidade dessas proteínas se ligarem a carboidratos de um modo específico e reversível.

Diferentes matrizes de afinidades para lectinas, então, são escolhidas de acordo com a especificidade destas aos diferentes carboidratos (Tasumi *et al.*, 2004; Gerlach *et al.*, 2005) e alguns destes suportes já são disponíveis comercialmente, assim; lectinas específicas para glicose/manose ou seus derivados podem usar como matrizes de afinidade, Sephadex (polímero de dextrana) com diferentes limites de exclusão (Borrebaeck and Rougé, 1986; Koshte *et al.*, 1990; Won-Kyo *et al.*, 2003); aquelas com especificidade para N-acetil-D-glicosamina e seus oligosacarídeos, ou derivados de quitina podem ter quitina como matriz de afinidade (Shibuya *et al.*, 1986; Stoeva *et al.*, 2001; Trindade *et al.*, 2006) e as específicas para galactose e seus derivados podem ser purificadas utilizando agarose (Yamaguchi *et al.*, 1998; Gottschalk, *et al.*, 2003), goma de guar (Shet e Madaiah, 1988; Kabir e Daar, 1994), gel de guar (Alencar *et al.*, 2003), Sepharose (Panunto *et al.*, 2005) e Sepharose tratada com ácido (Barbieri *et al.*, 1980). Ainda algumas matrizes de afinidade têm sido preparadas por acoplamento de carboidratos ou glicoproteínas a diferentes suportes (Ooi *et al.*, 2004, Chumkhunthod *et al.*, 2006).

Estudos com base em desenvolvimentos de novos suportes de afinidade para purificação de lectinas estão sendo feitos com a finalidade de reduzir os custos das matrizes comercialmente utilizadas e em alguns casos otimizar o protocolo de purificação. Boi *et al.*, (2006) propuseram a utilização de membranas imobilizadas a polissacarídeos para purificação da lectina de sementes de *Momordica charantia*, através da associação destas proteínas ao complexo membrana-polissacarídeo. Outro exemplo de suporte desenvolvido são contas de alginato imobilizadas em gel de guar, utilizado em um novo protocolo alternativo para a purificação da jacalina, lectina obtida de sementes de jaca (Roy *et al.*, 2005). A partir da gema do ovo, conhecida por ser uma fonte rica em glicoproteínas, um novo suporte de afinidade para obtenção de lectinas foi desenvolvido, esta matriz purificou de forma rápida, simples e com boa reprodutibilidade, miligramas das lectinas testadas (Zoccatelli *et al.*, 2003).

Além da separação por afinidade são também utilizadas outras técnicas de cromatografia para purificação de lectinas, baseadas na carga ou tamanho da molécula. A cromatografia de troca iônica, método de separação baseado na adsorção reversível e diferencial dos íons da fase móvel pelo grupo trocador da matriz; essa diferença de afinidade se deve a diferenças de carga, e pode ser controlada por fatores como o pH e a força iônica (Spadaro, 1997). Exemplos de matrizes de troca iônica são DEAE-Cellulose (Anuradha e Bhide, 1999), CM-Cellulose (Han *et al.*, 2005), CM-Sephadex (Shashidharamurthy *et al.*, 2006), Sp-Sephadex (Kortt, 1985) e DEAE-Sepharose (Kolberg e Sletten, 1982; Yoshida *et al.* 2006).

A cromatografia de gel filtração, baseado no efeito de exclusão molecular, é um método usado para a separação de substâncias de acordo com o tamanho e forma moleculares (Kumar *et al.*, 2004). Estas peneiras moleculares são redes porosas tridimensionais, constituídas por cadeias lineares de polímeros que se entrecruzam e formam a matriz do gel. Os géis mais usados são os obtidos pela polimerização de cadeias de polisacarídeos, Sephadex, ou os constituídos pela polimerização de cadeias de poliacrilamida, Biogel (Pusztai *et al.*, 1981; Khang *et al.*, 1990).

Entre técnicas de alta resolução usadas para obter lectinas puras estão também os sistemas FPLC utilizando cromatografias de troca iônica sobre coluna de Mono Q ou Mono S (Xu *et al.*, 1998; Chung *et al.*, 2001) ou exclusão molecular (Jimbo *et al.*, 2000) e HPLC utilizado para estimar massas moleculares de lectinas purificadas (Yanagi *et al.*, 1990), para fracionar proteínas (Pratt *et al.*, 1990) e para separar fragmentos peptídicos, obtidos por digestão com endoproteinases, de lectinas purificadas (Kusui *et al.*, 1991).

1.2.2 Cramoll

O feijão camaratu ou camaratuba (*Cratylia mollis* Mart.) é uma forrageira da Região Semi-Árida do Estado de Pernambuco; a planta pertence à tribo *Phaseoleae*, subtribo, *Diocleinae*, que contém o gênero *Canavalia*, botanicamente relacionado com a *Cratylia*. Concanavalina A (Con A), extraída de sementes de *Canavalia ensiformis*, é uma das lectinas mais estudadas, constituindo um padrão de comparação de excelência para lectinas glicose/manose (Lee e Linhardt, 1992; Mandal e Brewer, 1992; Sheldon e Bowles, 1992). Quatro formas moleculares, isolectinas e isoformas já foram detectadas em sementes de *C. mollis*, estas apresentam diferentes atividades monossacarídicas e foram denominadas Cramoll 1, Cramoll 2, Cramoll 3 e Cramoll 4. Cramoll 1, Cramoll 2 e Cramoll 3 já foram reconhecidas como isolectinas. Cramoll 1, Cramoll 2, e Cramoll 4 pertencem ao grupo de especificidade glicose/manose, enquanto Cramoll 3 reconhece com maior afinidade galactose.

A purificação de Cramoll 1 aconteceu em 1995 por Correia e Coelho, através de um extrato das sementes a 10 % (p/v), posteriormente houve uma precipitação com sulfato de amônio a 40 to 60 % de saturação (F40-60). Esta foi então cromatografada em Sephadex G-75 (Cramoll 1,4), seguida por uma cromatografia de troca iônica em CM-Cellulose (Cramoll 1 e Cramoll 4). Desde então crescentes estudos de caracterização e aplicações biotecnológicas vêm sendo desenvolvidos com essa proteína. Esta lectina tem uma grande variedade de aplicações como: caracterização de células transformadas (Beltrão *et al.*, 1998); sensibilidade eletroquímica (Souza *et al.*, 2003); atividade mitogênica (Maciel *et al.*, 2004); inibição

tumoral (Andrade *et al.*, 2004), sendo de interesse obtê-la através de um protocolo mais rápido.

Cramoll 3 foi purificada por Paiva e Coelho, 1992, também através de um extrato das sementes a 10 % (p/v), seguido de uma precipitação com sulfato de amônio a 40 % de saturação (F0-40). Posteriormente foi realizada uma cromatografia de gel filtração em Sephadex G-100. As pesquisas envolvendo esta lectina ainda estão sendo desenvolvidas visto que existe uma maior dificuldade para obtê-la pura até a homogeneidade.

Cramoll 1 teve sua estrutura terciária (Figura 4) recentemente resolvida por cristalografia de raios-X com 1,77 Å de resolução, exibindo uma estrutura clássica de lectinas de leguminosa (De Souza *et al.*, 2003). Com 82 % de homologia em sequência primária com a Con A, esta lectina apresenta estrutura secundária composta exclusivamente por folhas β , todas conectadas por voltas. Em nível monomérico, ambas as lectinas exibem estruturas tridimensionais essencialmente idênticas, além de apresentarem formas similares de associações quaternárias. Por outro lado, Lima *et al.*, (1997) mostraram que Con A e Cramoll 1 mostram diferenças significativas em aplicações biológicas.

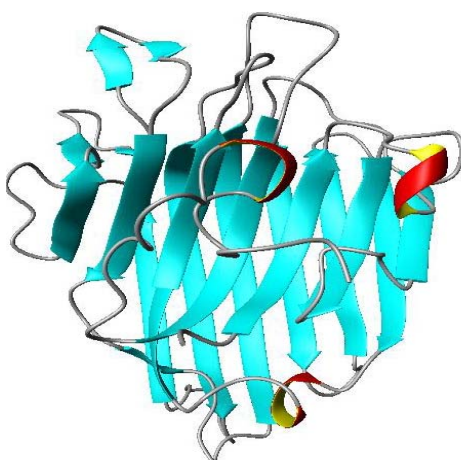


Figura 4 – Estrutura tridimensional do monômero da isoforma 1 da lectina de *Cratylia mollis* – Cramoll 1. Originada pelo programa MOLMOL (Koradi *et al.*, 1996).

1.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A espectroscopia é o estudo da interação da radiação eletromagnética com a matéria. Essa radiação pode ser vista como uma onda com duas componentes, uma elétrica e outra magnética, que oscilam perpendicularmente entre si, sendo ambas também perpendiculares à direção de propagação da luz (Figura 5). A interação entre a radiação eletromagnética e a

matéria pode ocorrer de duas formas: pela sua componente elétrica ou pela sua componente magnética.

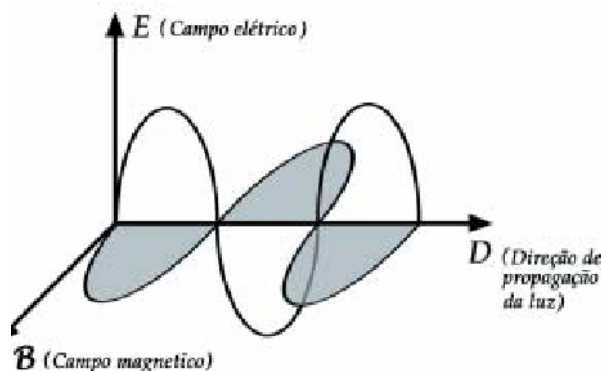


Figura 5 – Radiação eletromagnética.

A ressonância magnética nuclear (RMN) é um tipo de espectroscopia onde a interação da radiação eletromagnética com a matéria se dá com o campo magnético e não com o campo elétrico como, por exemplo, o infravermelho ou o ultravioleta. A RMN encontra-se nas radiofrequências (MHz). Em um campo magnético sob determinadas condições, uma amostra pode absorver radiação eletromagnética na região de radiofrequência, absorção essa governada por características da própria amostra. Essa absorção é função de determinados núcleos presentes na molécula que são sensíveis a radiação aplicada e, por isso, esses núcleos são alvo de estudo para compreensão da RMN (Nascimento e Bloch Jr., 2001).

Um espectrômetro de RMN consiste de três componentes: um *probe*, no qual a amostra está localizada; um magneto supercondutor, no qual o *probe* está localizado, e um console capaz de gerar pulsos de radiofrequência em combinações programadas.

Os espectros de RMN evidenciam o aparecimento de sinais em diferentes valores de frequência, isto indica que o campo magnético experimentado por cada núcleo depende da localização do mesmo na molécula como também a vizinhança de núcleos que a rodeiam. Cada núcleo possui um deslocamento químico (δ) de acordo com a nuvem eletrônica ao seu redor, cuja densidade varia com o ambiente químico. Essa nuvem eletrônica gera campos magnéticos secundários que são os principais responsáveis pela alteração do deslocamento químico de um núcleo em uma macromolécula. A unidade do deslocamento químico é representada por partes por milhão (ppm) que é a frequência de ressonância do núcleo sobre o campo magnético. O deslocamento químico é de extrema importância para os estudos de hidrogênios em proteínas por RMN, pois é possível distinguir diversos grupos de átomos de hidrogênio através do seu deslocamento químico característico (Traficante, 1989).

1.3.1 Experimentos Unidimensionais

Os experimentos unidimensionais são muito importantes porque podem evidenciar rapidamente informações quanto ao estado da amostra. Com apenas este experimento, problemas como concentração da molécula, grau de pureza e solubilidade são observados. O espectro unidimensional de uma proteína, por exemplo, contém informações quanto à dispersão do deslocamento químico, que pode nos informar sobre estrutura, pois quanto maior a dispersão do deslocamento químico, mais estruturada é a proteína (Harris, 1986).

Apesar deste, mostrar todos os picos da molécula é impossível o assinalamento somente com este espectro, devido à sobreposição dos picos. Para diminuir este tipo de problema é necessária a utilização de experimentos de duas ou mais dimensões.

1.3.2 Aplicações da Ressonância Magnética Nuclear

Apesar de relativamente recente, a RMN já é referência mundial para a análise de estruturas moleculares em diversas áreas do conhecimento. Na Bioquímica moderna, essa técnica permitiu, de forma inédita, a investigação de estruturas tridimensionais de biomoléculas em condições próximas do estado fisiológico (soluções aquosas) (Nascimento e Bloch Jr., 2001).

Algumas levanas já tiveram sua estrutura resolvida por RMN, estas se apresentam como um polímero de frutose unido por ligações β -2,6. *Erwinia herbicola* (Blake *et al.*, 1982); *Acetobacter xylinum* (Tajima, *et al.*, 1997) e *Bacillus subtilis* (Natto) Takahashi (Shih *et al.*, 2005) são exemplos de microorganismos que produzem autênticas levanas bacterianas caracterizadas por RMN. Contudo a bactéria *Zymomonas mobilis* fabrica um polissacarídeo que foi denominado de levana incomum com ligações α -2,1 e β -2,6 (Barrow *et al.*, 1984).

RMN também pode ser usada na confecção e análises de vacinas baseadas nos carboidratos de algumas bactérias e de alguns fungos já que esses polissacarídeos estão presentes na superfície destes microorganismos e tem um papel de fundamental importância na proteção desses patógenos e no estabelecimento da infecção (Jones, 2005).

Recentes avanços na metodologia com RMN multidimensional (4D) e de magnetos mais potentes têm permitido elucidar estruturas de proteínas de até 250 resíduos (Clore e Gronenborn, 1998). Tal fato possibilitou também um considerável avanço nos estudos de dinâmica molecular que, antes da RMN, limitava-se quase que exclusivamente a dados cristalográficos (Key, 2005).

O uso da RMN para proteínas permite a determinação estrutural e de dinâmica de trocas em diferentes regiões da molécula, mostra informações específicas de distâncias

obtidas entre resíduos de aminoácidos (Nuclear Overhauser Effect – NOE) e usa programas de cálculos para determinar essas distâncias e obter dados de ângulos. Por fim esses dados compilados são convertidos em função da sua energia e correlacionados com dados experimentais identificando assim a estrutura da proteína (Rosh, 2001). Proteínas de diferentes organismos, tecidos e com funções distintas vêm sendo caracterizadas por RMN, suas interações e seus sítios ativos também podem ser estudados por esta técnica (Ababou *et al.*, 2006; Chill *et al.*, 2006; Elmi *et al.*, 2006; Gombos *et al.*, 2006; Kulis-Jr. e Shuker, 2006; Transue *et al.* 2006).

Como já foi dito, a ressonância é também útil para avaliar a interação entre as biomoléculas. Por RMN, Hibertt *et al.* (2005) analisaram a ligação da IgE com seus diferentes receptores, de baixa e alta afinidade, avaliando assim a produção desta glicoproteína na resposta alérgica. Também por esta técnica foi avaliada a interação da ubiquitina com dois diferentes peptídeos (Burz *et al.*, 2006). Interações lipídeos-proteínas são importantes para avaliar as funções de proteínas integrais de membrana e com aplicação de STD-RMN, que é um modelo de ressonância onde envolve transferência de saturação, a caracterização deste tipo interação é mostrada (Sobias e Gawrisch, 2005).

Muitos processos biológicos importante, malignos e benignos, são baseados na interação proteína-carboidrato, a ressonância chega como uma técnica que consegue avaliar essa interação, estabelecer exatamente locais na proteína onde está o ligante (carboidrato), caracterizando esse processo (Henshall *et al.*, 2004; Pollock *et al.*, 2004). A ligação de diferentes peptídeos a heparina, um glicoaminoglicano sulfatado com atividade anticoagulante, tem sido bem caracterizada por RMN (Hricovíni e Tori, 1994; Hricovíni *et al.*, 1995; Hari *et al.*, 2000; Sanstrom *et al.*, 2004).

As lectinas, por possuírem essa propriedade de ligação específica a diferentes carboidratos, também são objetos de estudo da ressonância. Esta técnica então tem sido usada para investigar o conluio dos sítios dos diferentes complexos de lectinas-oligosacarídeos (Acensio *et al.*, 1995). Lectina de ervilha (*Pisum sativum*), específica para glicose/manose já teve seus sítios caracterizados por RMN (Cheong *et al.*, 1999). Outra lectina que teve seus sítios de ligação a distintos carboidratos caracterizados por RMN e se essa interação era dependente de Ca^{2+} foi a haveína, lectina da *Hevea brasiliensis*, espécie de onde é retirado o latex (Ascencio *et al.*, 1995). A lectina de germe de trigo (WGA) teve seus sítios caracterizados por esta técnica na interação com glicoproteínas presentes em células tumorais (Lycknert *et al.* 2004). Con A já possui esses sítios bem caracterizados tanto para monossacarídeos como para glicoconjugados pela ressonância (Brewer *et al.*, 1973; Turov *et*

al., 1997; Kim *et al.*, 2004) e pela associação com a calorimetria, através das constantes de afinidade (Brice *et al.*, 2001).

Investigações estrutural e bioquímica das moléculas são confinadas, artificialmente, a experimentos *in vitro*, contudo começa a surgir uma nova aplicação da espectroscopia de RMN dentro das células (STINT-NMR) que proporciona um meio de acompanhamento das interações proteína-proteína *in vivo* e suas resoluções atômicas (Selenko e Wagner, 2006). A ressonância foi usada para estudar a composição e os processos bioquímicos em bactéria (Gadian, 1995); o processo de fusão de membrana, como o usado no envelope viral, o qual o mais bem estudado é o mecanismo do vírus influenza para entrar na célula hospedeira (Martin *et al.*, 2003); recentemente um polissacarídeo capsular (CPS) da *Neisseria meningitidis* teve sua estrutura resolvida por esta técnica (Gudlavalleti *et al.*, 2006); é também uma ferramenta complementar para a ressonância magnética por imagens (MRI) em pequenos animais, adicionando dados bioquímicos sobre o estado metabólico dos tecidos saudáveis e doentes para informações anatômicas (Méric *et al.*, 2004).

2. REFERÊNCIAS

- Ababou, A., Gautel, M., Pfuhl, M. Disecting the N-terminal myosin binding site of human cardiac myosin binding protein C: Structure and myosin binding of domain C2. *In Press, J. Biol. Chem.*, 2006.
- Alencar, N. M. N., Assreury, A. M. S., Alencar, V. B. M., Melo, S. C., Ramos, M. V., Cavada, B. S., Cunha, F. Q., Ribeiro, R. A. The galactose-binding lectin from *Vateria macrocarpa* seeds induces in vivo neutrophil migration by indeirect mechanism. *The Internacional of Biochemistry and Cell Biology*, 35, 1674-1681, 2003.
- Ananthalakshmy, V. K., Gunasekaran, P. Overproduction of levan in *Zymomonas mobilis* by using cloned sac B gene. *Enzyme and Microbial Technology*, 25, 109-115, 1999.
- Anuradha, P., Bhide, S. V. An isolectin complex from *Trichosanthes anguina* seeds. *Phytochemistry*, 152, 751-758, 1999.
- Asensio, J. L., Canada, F. J., Bruix, M., Rodriguez-Romero, A., Jimenez-Barbero, J. The interaction of hevein with N-acetylglucosamine-containing oligosaccharides. Solution structure of hevein complexed to chitobiose. *Eur. J. Biochem.*, 230, 621-633, 1995.
- Banerjee, S., Chaki, S., Bhowal, J., Chatterjee, B. P. Mucin binding mitogenic lectin from freshwater Indian gastropod *Belamya bengalensis*: purification and molecular characterization. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 421, 125-134, 2004.
- Barbieri, L., Zamboni, M., Lorenzoni, Montanaro, L., Sperti, S., Stirpe, F. Inhibition of proteins synthesis *in vitro* by proteins from the seeds of *Mormandica charantia* (Bitter pear melon). *J. Biochem.*, 180, 443, 1980.
- Barros, V. V. R. Utilização de levana como suporte para imobilização de gentamicina. 2002. Dissertação (Mestrado em Bioquímica)-Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

- Barrow, K. D., Collins, J. G, Rogers, P. L., Smith, G. M. The structure of a novel polysaccharide isolated from *Zymomonas mobilis* determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy, *European Journal Biochemistry*, 145, 173-179, 1984.
- Baskin, A., Boissonaide, M-M., Santos-Magalhães, N.; Carvalho Jr, L.B.; Correia, M.T.S.; Coelho, L.C.B.B. *Cratylia mollis* lectin at the air-aqueous solution interface: adsorption and lectin-lipid interactions. *Colloids and Surfaces B: bionterfaces*, 17, 111-201, 2000.
- Bekers, M., Upite, D., Kaminska, E., Laukevics, J., Grube, M., Vigants, A., Linde, R. Stability of levan produced by *Zymomonas mobilis*. *Process Biochemistry*, 40, 1535-1539, 2005.
- Beltrão E. I. C., Correia, M. T. S., Figueredo-Silva, J. e Coelho, L. C.B. B. Binding evaluation of isoform 1 from *Cratylia mollis* lectin to mammary human tissues. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 74, 125-134, 1998.
- Blake, J. D., Clark, M. L., Jasson, P. E., McNeil, K. E. Fructan from *Erwinia herbicola*. *Journal of Bacteriology*, 151, 1595-1597, 1982.
- Böckelmann, U., Szewzyk, U., Grohmann, E. A new enzymatic method for the detachment of particle associated soil bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 55, 201-211, 2003.
- Boi, C., Cattoli, F., Facchini, R., Sorci, M., Sarti, G. C. Adsorption of lectins on affinity membranes. *Journal of Membrane Science*, 273, 12-19, 2006.
- Borrebaeck, C. A., Rouge, P. Mitogenic properties of structurally related Lathyrus lectins. *Arch. Biochem. Biophys.*, 248, 30-34, 1986.
- Bosnes, M., Deggerdal, A., Rian, A., Korsnes, L., Larsen, F. Magnetic separation in molecular biology. In: Häfeli, U.; Schütt, W.; Teller, J.; Zborowski, M., eds. *Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers*. New York: Plenum Press, 269-285, 1997.

Boyd, W. C., Shapleigh, E. Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). *Science*, 119, 419, 1954.

Brewer, C. F., Sternlicht, H., Marcus, D. M., Grollman, A. P. Binding of ^{13}C -Enriched α -Methyl-D-Glucopyranoside to Concanavalin A as Studied by Carbon Magnetic Resonance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 70, 1007-1011, 1073.

Bryce, R. A., Hillier, I. H., Naismith, J. H. Carbohydrate-Protein Recognition: Molecular Dynamics Simulations and Free Energy Analysis of Oligosaccharide Binding to Concanavalin A. *Biophysical Journal*, 81, 1373-1388, 2001.

Brock, T. D., Madigan, M. T. Biology of Microorganisms, 6th ed., Prentice-Hall, Old Tappan, N.J., 1991.

Burz, D. S., Dutta, K., Cowburn, D., Shekhtman, A. Mapping Estructural Interactions Using in Cell NMR – Spectroscopy (STINT-NMR). *Nature Methods*, 3, 91-93, 2006.

Calazans, G. M. T., Lima, R. C., França, F. P., Lopes, C. E. Molecular weight and antitumour activity of *Zymomonas mobilis* levans. *International Journal of Biological Macromolecules*, 27, 245-247, 2000.

Cavada, B. S., Madeira, S. V. F., Calvete, J. J., Souza, L. A. R., Dantas, A., Granjeira, T. B., Freitas, B. T., Ointo, V. P., Leite, K. B., Ramos, M. V. Purification, chemical, and immunochemical properties of a new lectin from Mimosoideae (*Parkia discolor*). *Preparative Biochemistry*, 30, 271-280, 2000.

Cheong, Y., Shim, G., Kang, D., Kim, Y. Carbohydrate binding specificity of pea lectin studied by NMR spectroscopy and molecular dynamics simulations. *Journal of Molecular Structure*, 475, 219–232, 1999.

Chill, J. H., Louis, J. M., Miller, C., Bax, A. NMR study of the tetrameric KcsA potassium channel in detergent micelles. *Protein Sci. In Press*, 2006.

Chumkhunthod, P., Rodtong, S., Lambert, S. J., Fordham-Skelton, A. P., Rizkallah, P.

- J., Wilkinson, M. C., Reynolds, C. D. Purification and characterization of an *N*-acetyl-D-galactosamine-specific lectin from the edible mushroom *Schizophyllum commune*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1760, 326-332, 2006.
- Chung, C. H., Peng, H. C., Huang, T. F. Aggrexin, a C-type lectin protein, induces platelet aggregation via integrin α (2) β (1) and GPIb in a phosphatidylinositol 3-kinase independent pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 285, 689-695, 2001.
- Clark, M.A., Hirst, B.H., Jepson, M.A. Lectin-mediated mucosal delivery of drugs and microparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 43, 207-223, 2000.
- Clore, G. M., Gronenborn, A. M. New methods of structure refinement for macromolecular structure determination by NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 5891–5898, 1998.
- Correia, M. T. S. e Coelho, L. C. B. B. Purification of a glucose/mannose specific lectin isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart (Camaratu bean). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 55, 261-273, 1995.
- Derome, A.E. Modern NMR Techniques for Chemistry Research Pergamon Press, New York, 1993.
- De Souza, G.A., Oliveira, P.S., Trapani, S., Santos, A.C.O., Rosa, J.C., Laure, H.J., Faca, V.M., Correia, M.T.S., Tavares, G.A., Oliva, G., Coelho, L.C.B.B., Greene, L.J. Amino acid sequence and tertiary structure of *Cratylia mollis* seed lectin. *Glycobiology*, 12, 961-972, 2003.
- Elmi, M. M., Amininasab, M., Hondo, T., Kikuchi, J., Kuroda, Y., Naderi-Manesh, H., Sarbolouki, M. N. Structural and functional characterization of a mutant of *Pseudocerastes persicus* natriuretic peptide. *Protein Pept. Lett.*, 13, 295-300, 2006.
- Freire, M. G. M., Gomes, V. M., Corsini, R. E., Machado, O. L. T., De Simone, S. G., Novello, J. C., Marangoni, S., Macedo, M. L. R. Isolation and partial characterization

of a novel lectin from *Talisia esculenta* seeds that interferes with fungal growth. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40, 61-68, 2002.

Gadian, D. G. NMR and its applications to living systems. Oxford University Press, Oxford- New York- Tokyo, 2^o edição, 1995.

Gerlach, D., Schlott, B., Zahringer, U., Schmidt, K.-H., N-acetyl-D-galactosamine/N-acetyl-D-glucosamine – Recognize Lectins from the Snail *Cepaea hortensis*: purification, cloning and expression in *E. coli*. *Immunology and Medical Microbiology*, 43, 223-232, 2005.

Glazer, A. N., Nikaido, H. Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology. 2nd ed., New York: W.H. Freeman and Company, 1995.

Gombos, Z., Yap, K. L., Ikura, M., Chakrabarty, A. NMR-driven secondary and tertiary structure model of Ca²⁺-loaded calyculin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. In Press, 2006.

Gottschalk, I., Gustavsson, P.-E., Ersson, B., Lundahl, P. Improved lectin-mediated immobilization of human red blood cells in superporous agarose beads. *Journal of Chromatography B*, 784, 203-208, 2003.

Gudlavalleti, S. K., Szymanski, C. M., Jarrell, H. C., Stephens, D. S. In vivo determination of *Neisseria meningitidis* Serogroup A capsular polysaccharide by whole cell high-resolution magicangle spinning NMR spectroscopy. *Carbohydrate Research*, 341, 557–562, 2006.

Han, C. H., Liu, Q. H., Ng, T. B., Wang, H. X. A novel homodimeric lactose-binding lectin from the edible split gill medicinal mushroom *Schizophyllum commune*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 336, 252-257, 2005.

Hari, S. P., McAllister, H., Chuang, W. L., Christ, M. D., Rabenstein, D. L. Interaction of Heparin with a Synthetic Pentadecapeptide from the C-Terminal Heparin-Binding Domain of Fibronectin. *Biochemistry*, 39, 3763-3773, 2000.

Harris, R.K. Nuclear Magnetic Resonance. A Physicochemical View Longman Scientific e Technical, England, 1986.

Helmholz, H., Cartellieri, S., He, L., Thiesen, P., Niemeyer, B. Process Development in Affinity Separation of Glycoconjugates with Lectins as Ligands. *Journal of Chromatography*, 1006, 127-135, 2003.

Henshaw, J. L., Bolam D. N, Pires, V. M, Czjzek, M., Henrissat, B., Ferreira, L. M., Fontes, C. M., Gilbert, H. J. The family 6 carbohydrate binding module CmCBM6-2 contains two ligand-binding sites with distinct specificities. *J. Biol. Chem.* 279, 21552-21559, 2004.

Hermanson, G.T. In: Bioconjugate techniques. New York: Academic Press, 134-185, 1996.

Hibbert, R. G., Teriete, P., Grundy, G. J., Beavil, R. L., Relji, R., Holers, V. M., Hannan, J. P., Sutton, B. J., Gould, H. J., McDonnell, J. M. The structure of human CD23 and its interactions with IgE and CD21. *J. E. M.*, 202, 751-760, 2005.

Hricovlani, M., Guerrini, M., Torri, G., Piani, S., Ungarelli, F. Conformational analysis of heparin epoxide in aqueous solution. An NMR relaxation study. *Carbohydrate Research*, 277, 11-23, 1995.

Hricovlani, M., Torri, G. Dynamics in aqueous solutions of the pentasaccharide corresponding to the binding site of heparin for antithrombin III studied by NMR relaxation measurements 1,2. *Carbohydrate Research*, 268, 159-175, 1995.

Hong, X., Guo, W., Yuan, H., Li, J., Liu, Y., Ma, L., Bai, Y., Li, T. Periodato oxidation of nanoescaled magnetic dextran composites. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 269, 95-100, 2004.

Imrie, F. K. E.; Tilbury, R. H. Polysaccharides in sugar cane and its products. *Sugar Technology Reviews* 1972, 1, 291-361.

Jang, K., Song, K., Park, B., Kim, C. H., Chung, B. H., Choue, R. W., Lee, K. S., Lee, C., Chun, U. C., Rhee, S. Levan production use of the recombinant levansucrase immobilized on titanium-activated magnetite. *Process Biochemistry*, 37, 339-434, 2001.

Jimbo, M., Yanohara, T., Koike, K., Koike, K., Sakai, R., Muramoto, K., Kamiya, H. The D-galactose-binding lectin of the octocoral *Sinularia lochmodes*: characterization and possible relationship to the symbiotic dinoflagellates. *Comp. Biochem. Physiol. B* 125:227–236, 2000.

Jones, Christopher. NMR assays for carbohydrate-based vaccines. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 38, 840-850, 2005.

Kabir, S., Daar, A. S. The composition and properties of jacalin, a lectin of diverse applications obtained from the jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seeds. *Immunol. Invest.*, 23, 167-188, 1994.

Kang, S. K., Cottrell, I. W. Polysaccharides. In: *Microbial Technology*, 2nd ed. 1

Kavalali, G., Tuncel, H., Göksel, S., Hatemi, H. H. Hypoglycemic activity of *Urtica pilulifera* in streptozotocin-diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 84, 241-245, 2003.

Kawagishi, H., Takagi, J., Taira, T., Murata, T., Usui, T. Purification and characterization of a lectin from the mushroom *Mycoleptodonoides aitchisonii*. *Phytochemistry*, 56, 53-58, 2001.

Kawaguchi, T., Hanaichi, T., Hasegawa, M., Maruno, S. Dextran-magnetite complex: conformation of dextran chains and stability of solution. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 12, 121-127, 2001.

Key, L. E. NMR studies of protein structure and dynamics. *Journal of Magnetic Resonance*, 173, 193–207, 2005.

- Khang N. Q., Jean-Luc, G., Hoebeke, J. A blood group A specific lectin from the seeds of *Crotalaria striata*. *Biochim Biophys Acta.*, 1033, 210-213, 1990.
- Kim, K. H., Lee, E. J., Kim, M. S. K., Han, S. Y., Jhon, G. J., Modification of Concanavalin A–Dependent Proliferation by Phosphatidylcholines Isolated From Deer Antler, *Cervus elaphus*. *Nutrition*, 20, 394–401, 2004.
- Kolberg, J., Sletten, K. Purification and properties of a mitogenic lectin from *Lathyrus sativus* seeds. *Biochim. Biophys. Acta.*, 704, 26-30, 1982.
- Konozy, E. H. E., Bernardes, E. S., Rosa, C., Faca, V., Greene, L. J., Ward, R. J. Isolation, purification and phsiochemical characterization of a D-galactose-binding lectin from seeds of *Erytlira speciosa*. *Archieves of Biochemistry and Biophysics*, 410, 222-229, 2003.
- Koradi, R., Billeter, M., Wüthrich, K. MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *Journal of Molecular Graphics*, 14, 51-55, 1996.
- Kortt, A. A. Characterization of the acidic lectins from winged bean seed (*Psophocarpus tetragonolobus* L.) DC. *Arch. Biochem. Biophys.*, 236, 544-54, 1985.
- Koshte, V. L., van Dijk, W., van der Stelt, M. E., Aalberse, R. C. Isolation and characterization of BanLec-I, a mannoside-binding lectin from *Musa paradisiac* (banana). *Biochem. J.*, 272, 721-726, 1990.
- Kulis-Jr., M. P., Shuker, S. B. Expression, purification, and refolding of mouse islet neogenesis associated protein-related protein for NMR studies. *Protein Expression and Purification. In Press*, 2006.
- Kusui, K., Yamamoto, K., Konami, Y., Osawa, T. *J. Biochem.*, 109, 899. 1991
- Kumar, V., Yu, S., Toback, F. G., Lieske, J. C. Renal epithelial cells constitutively produce a protein that blocks adhesion of crystals to their surface. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 1, 2004.

Lee, K.B., Kim, Y.S. e Linhardt, R.J. Lectin affinity electrophoresis for the separation of fluorescently labeled sugar derivatives. *Anal. Biochem.*, 256, 2735-2740, 1992.

Lenhinger, A.L. Lenhinger princípios da bioquímica/ David L. Nelson, Michael M. Cox. São Paulo: Sarvier, 2002. 975p. Bibliografia: p 89-189. ISBN 85-7378-125-4.

Lycknert, K., Edblad, M., Imberty, A., Widmalm, G. NMR and molecular modeling studies of the interaction between wheat germ agglutinin and the beta-D-GlcpNAc-(1->6)-alpha-D-Manp epitope present in glycoproteins of tumor cells. *Biochemistry*. 43, 9647-54, 2004.

Lima, V. L. M., Correia, M. T. S., Cechinel, Y. M. N., Sampaio, C. A. M., Owen, J. S., Coelho, L. C. B. B. Immobilized *Cratylia mollis* lectin as a potential matrix to isolate plasma glycoproteins, including lecithin-cholesterol acyltransferase. *Carbohydrate polymers*, 31, 27-32, 1997.

Liu W., Hu Y. L., Wang M., G Y., Hu Z., Wang D. C. Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a novel mannose-binding lectin from *Gastrodia elata* with antifungal properties. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 58, 1833-1835, 2002.

Lobato, A. V. Produção de oligossacarídeos por *Zymomonas mobilis*. 2003. 12-13f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

Ma, M., Zhang, Y., Yu, W., Shen, H., Zhang, H., Gu, N. Preparation and characterization of magnetite nanoparticles coated by amino silane. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 212, 219-226, 2003.

Maciel, E. V. M., Araújo-Filho, V. S., Nakazawa, M., Gomes, Y. M., Coelho, L. C. B. B., Correia, M.T.S. Mitogenic activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes. *Biologicals*, 32, 57-60, 2004.

Maciel, J. C. Levana Ferromagnética com matriz para imobilização de tripsina 2005, trabalho de conclusão de curso (Graduação – Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco.

Machuka, J. S., Okeola, O.G., Els, J. M. V. D., Chrispeels, M. J., Leuven, F. V., Peumans, W. J. Isolation and partial characterization of galactose-specific lectins from African yam beans, *Sphenostyles stenocarpa* Harms. *Phytochemistry*, 51, 721 -728, 1999.

Mandal, D. K., Brewer, C. F. Interactions of concanavalin A with glycoproteins: formation of homogeneous glycoprotein-lectin cross-linked complexes in mixed precipitation systems. *Biochemistry*, 31, 12602-12609, 1992.

Martin, M. L., Delpuech, J-J., Martin, G. J. Practical NMR Spectroscopy Heyden e Son Ltd, London, 1980.

Martin, I., Goormaghtigh, E., Ruyschaert, J. M. Attenuated total reflection IR spectroscopy as a tool to investigate the orientation and tertiary structure changes in fusion proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1614, 97– 103, 2003.

Matthews, P. S. C. Quantum Chemistry of Atoms and Molecules Cambridge University Press, Cambridge, 1986.

Méric, P., Autret, G., Doan, B. T., Gillet, B., Sébrié, C., Beloeil, J. C. In vivo 2D magnetic resonance spectroscopy of small animals. *MAGMA*, 17, 317–338, 2004.

Mladenov, I. V., Haralambieva, I. H., Iankov, I. D., Mitov, I. G. Characterisation of 20-kDa lectin-spermagglutinin from *Arum maculatum* that prevents *Chlamydia pneumoniae* infection of L-929 fibroblast cells. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 32, 249-254, 2002.

Mo, H. Winter, H.C. e Goldstein, I.J. Purification and characterization of a Neu5Acalpha2-6\galbeta 1-4Glc/ClcNAc-specific lectin from the fruiting body of the

polypore mushroom *polyporus squamosus*. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 23-29, 2000.

Moreira, R. A., Castelo-Branco, C. C., Monteiro, A. C. O., Tavares, R. O., Beltramini, L. M. Isolation and partial characterization of a lectin from *Artocarpus incisa* L. seeds. *Phytochemistry*, 47, 1183-1988, 1998.

Mulchandani, A., Luong, J. H. T., Leduy, A. Kinetics of microbial polysaccharide biosynthesis. *Biotechnology and Bioengineering*, 32, 639-646, 1988.

Nascimento, C. H. e Bloch Jr., C. Ressonância Magnética Nuclear: *Gradus Primus* Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, nº 21, 2001.

Ooi, L.S., Sun, S. S., Wang, H., Ooi, V. E. New mannose-binding lectin isolated from the rhizome of *Sarsaparilla Smilax glabra* Roxb. (Liliaceae). *J Agric Food Chem.*, 6, 6091-6095, 2004.

Pace, G. W. Microbial Gums. In: Bu'Lock, J.; Kristiansen, B. (eds). *Basic Biotechnology*, chapter 17, London: Academic Press, 1987.

Paiva, P. M. G., Coelho, L. C .B. B. Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (camaratu bean). *Appl. Biochem. Biotech.*, 36, 13-118, 1992.

Panunto, P. C., da Silva, M. A., Linardi, A., Buzin, M. P., Melo, S.E., Mello, S.M., Prado-Franceschi, J., Hyslop, S. Biological activities of a lectin from *Bothrops jararacussu* snake venom. *Toxicon.*, 47, 21-31, 2006.

Pardoe, H., Chua-Anusorn, W., Pierre, T. G. St., Dobson, J. Structural and Magnetic Properties of Nanoscale Iron Oxide Particles Synthesized in the Presence of Dextran or Polyvinyl Alcohol. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2001, 225, 41-46.

Paul, K.G., Frigo, T.B., Groman, J.Y., Groman, E.V. Synthesis of ultrasmall superparamagnetic iron oxides using reduced polysaccharides. *Bioconjugate Chem.*, 15, 394-401, 2004.

Pelczar Jr., M. J., Chan, E. C. S., Krieg, N. R. Microbiologia - Conceitos e Aplicações, 2ª ed, Makron Books do Brasil, 1997.

Peumans, W. J. e Van Damme, E. J. M. Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiol.*, 109, 347-352, 1995.

Peumans, W. J.; Roy, S.; Barre, A.; Rougé, P.; Van Leuven, F. e Van Damme, E. J. M. Elderberry (*Sambucus nigra*) contains truncated Neu5Ac(α -2,6)-Gal/GalNAc-binding type-2 ribosome-inactivating proteins. *FEBS Letters*, 425, 35-39, 1998.

Pollock, S., Kozlov, G., Pelletier, MF., Trempe, JF., Gregor Jansen, Sitnikov, D., Bergeron, J. J. M, Gehring, K., Ekiel, I., Thomas, D. Y. Specific interaction of ERp57 and calnexin determined by NMR spectroscopy and an ER two-hybrid system. *EMBO Journal*, 23, 1020–1029, 2004.

Pratt, R. C., Singh, N. K., Shade, R. E., Murdock, L. L., Bressan, R. A. Isolation and Partial Characterization of a Seed Lectin from Tepary Bean that Delays Bruchid Beetle Development. *PlantPhysiol.*, 93, 1453-1459, 1990

Pusztai, A, Clarke, E. M., Grant, G., King, T. P. The toxicity of *Phaseolus vulgaris* lectins. Nitrogen balance and immunochemical studies. *J. Sci. Food Agric.*, 32, 1037-1046, 1981.

Rabjins, A., Verboven, C., Rougé, P., Barre, A., Van Damme, E.J., Peumans, W.J., De Ranter, C.J. Structure of a legume lectin from the bark of *Robinia pseudoacacia* and its complex with N-acetylgalactosamine. *Proteins*, 40, 470-478, 2001.

Ratanapo, S., Ngamjunyaporn, W., Chalavatnatol, M. Interaction of a mulberry leaf lectin with phytopathogenic bacterium, *P. syringae* pv more. *Plant Science*, 160, 739-744, 2001.

- Reynoso-Camacho, R., De Mejia, G. E., Loarca-Pina, G. Purification and acute toxicity of a lectin extracted from tepary bean (*Phaseolus acutifolius*). *Food and Chemical Toxicity*, 41, 21-27, 2003.
- Roger, J., Pons, J. N., Massart, R., Halbreich, A., Bacri, J. C. Some biomedical applications of ferrofluids. *The European Physical Journal - Applied Physics*, 5, 321-325, 1999.
- Rojo M. A., Citores L., Jimenez P., Ferreras J. M., Arias F. J., Mendez E., Girbes T. Isolation and characterization of a new d-galactose-binding lectin from *Sambucus racemosa* L. *Protein Pept. Letters*, 10, 287-293, 2003.
- Rosh, P. Nuclear magnetic resonance studies of allergens. *Journal of Chromatography B*, 756, 165–177, 2001.
- Roy, I., Sardar, M., Gupta, M. N. Cross-linked alginate–guar gum beads as fluidized bed affinity media for purification of jacalin. *Biochemical Engineering Journal* 23, 193-198, 2005.
- Šafařík, I.; Šafaříková, M. One-step partial purification of *Solanum tuberosum* tuber lectin using magnetic chitosan particles. *Biotechnology Letters*, 22, 941-945, 2000.
- Šafařík, I.; Šafaříková, M. Use of magnetic techniques for the isolation of cells. *Journal of Chromatography B*, 722, 33-53, 1999.
- Sanders, J. K. M. and Hunter, B. K. Modern NMR Spectroscopy: A Guide for Chemistry Oxford University, New York, 1993.
- Sandstrom, C., Berteau, O., Gemma, E., Oscarson, S., Kenne, L., Gronenborn, A. M. Atomic. Mapping of the Interactions between the Antiviral Agent Cyanovirin-N and Oligomannosides by Saturation-Transfer Difference NMR. *Biochemistry*, 43, 13926-13931, 2004.

- Sarui, H., Nakayama, T., Takeda, N., Ishizuka, T., Yasuda, K. Alpha-fetoprotein-producing male breast cancer accompanied with hepatocellular carcinoma: assessment by lectin-affinity profile. *The American Journal of the Medical Sciences*, 322, 369-372, 2001.
- Sharon, N., Lis, H. How Proteins Bind Carbohydrates: Lessons from Legume Lectins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6586-6591, 2002.
- Sharon, N., Lis, H. The structural basis for carbohydrate recognition by lectins. *The Molecular Immunology of Complex Carbohydrates*, 2, 1-16, 2001.
- Sharon, N., Lis, H. Legume lectins - a large family of homologous proteins. *FASEB Journal*, 4, 3198-3208, 1990.
- Shashidharamurthy, R., Kemparaju, K. A neurotoxic phospholipase A (2) variant: isolation and characterization from eastern regional Indian cobra (*Naja naja*) venom. *Toxicon.*, *In Press*, 2006.
- Sheldon, P.S. e Bowles, D.J. The glycoprotein precursor of concanavalin A is converted to an active lectin by deglycosylation. *EMBO J.*, 11, 1297-1301.
- Shet, M. S., Madaiah, M. Chemical modification studies on a lectin from winged-bean *Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC tubers. *Biochem J.*, 254, 351-357, 1998.
- Shibuya, A. Childhood hypoplastic anemia with sugar chain anomaly of red cell membranes. *Pediatrics International: Official Journal of the Japan Pediatric Society*, 43, 597-604, 2001.
- Shih, I. L., Yu, Y. T., Shieh, C. J., Hsieh, C. Y. Selective Production and Characterization of Levan by *Bacillus subtilis* (Natto) Takahashi. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 8211-8215, 2005.
- Selenko, P., Wagner, G. NMR Mapping of Proteins Interactions in Living Cells. *Nature Methods*, 3, 80-81, 2006.

- Soubias, O., Gawrisch, K. Probing Specific Lipid-Protein Interaction by Saturation Transfer Difference NMR Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.*, 127, 13110-13111, 2005.
- Souza, S., Correia, M. T.S., Pessoa, M. M. A., Kennedy, J., Lima Filho, J. L., Coelho, L. C. B. B. A novel model to characterize the double electric layer of lectin from *Cratylia mollis* (Camaratu bean) and *Canavalia ensiformis* in metallic surface. *Carbohydrate Polymers*, 46, 191-193, 2001.
- Spilatro, S. R.; Cochran, G. R.; Walker, R. E.; Cablish, K. L.; Bittner, C. C. Characterization of a new lectin of soybean vegetative tissues. *Plant Physiology*, 110, 825-834, 1996.
- Sprenger, G. A. Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis*: a catabolic highway with some scenic routes. *FEMS Microbiology Letters*, 145, 301-307, 1996.
- Stoeva, S., Franz, M., Wacker, R., Krauspenhaar, R., Guthöhrlein, E., Mikhailov, A, Betzel, C., Voelter, W. Primary Structure, Isoforms, and Molecular Modeling of a Chitin-Binding Mistletoe Lectin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 392, 23-31, 2001
- Strathmann, M., Wingender, J., Flemming, H. C. Application of fluorescently labelled lectins for the visualization and biochemical characterization of polysaccharides in biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Microbiological Methods*, 50, 237-248. 2002
- Strauss, H. L. Quantum Mechanics – An Introduction Prentice Hall, Inc., New Jersey, 1968.
- Sutherland, I. W. Biotechnology of Microbial Exopolysaccharides. Cambridge University Press, 163, 1990.
- Tajima, K. Uenishi, N., Fujiwara, M., Erata, T., Munekata, M., Takai, M. The production of a new water-soluble polysaccharide by *Acetobacter xylinum* NCI 1005

and its structural analysis by NMR spectroscopy. *Carbohydrate Research*, 305, 117-122, 1998.

Tasumia, S., Yang, W., Usamia, T., Tsutsuia, S., Ohirac, T., Kawazoe, I., Wilderb, M. N., Aidac, K., Suzukia, Y. Characteristics and primary structure of a galectin in the skin mucus of the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Developmental e Comparative Immunology*, 325-335, 2004.

Traficante, D. D. *Concepts in Magnetic Resonance*, 1, 7-13, 1989

Transue, T. R., Gabel, S. A., and London, R. E. NMR and Crystallographic Characterization of Adventitious Borate Binding by Trypsin Bioconjugate. *Chem.* 17, 300-308, 2006.

Trindade, M. B., Lopes, J.L.S., Soares-Costa, A., Monteiro-Moreira, A.C., Moreira, R.A., Oliva, M.L.V. and Beltramini, L. M. Structural characterization of novel chitin - binding lectins from the genus *Artocarpus* and their antifungal activity. *In press, Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 2001.

Turov, V. V., Galagan, N. P., Pokrovskaya, O. V., Pokrovskii, V. A., Dembnovetskaia, L. I. A study of the effect of the adsorbed molecules of concanavalin A on characteristics of the bound water in the hydrate coat of the disperse silica by ^1H NMR of the frozen water suspensions. *Biofizika*, 42, 1040-1046, 1997.

Van Damme, E. J. M.; Barre, A.; V.; Rougé, P.; Van Leuven, F.; Peumans, W. J. The neuAc(α -2,6)-Gal/GalNAc-binding lectin from elderberry (*Sambucus nigra*) bark, a type-2 ribosome-inactivating protein with an unusual specificity and structure. *European Journal Biochemistry*, 235, 128-137, 1996.

Vina, I., Karsakevich, A., Bekers, M. Stabilization of anti-leukemic enzyme l-asparaginase by immobilization on polysaccharide levan. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11, 551-558, 2001.

Voet, D., Voet, J. G., Pratt, C. H. In: Fundamentals of Biochemistry New York: John Wiley, 1999.

Wititsuwannakul, R., Wititsuwannakul, D., Sakulborirug, C. A. Lectin from the bark of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Phytochemistry*, 47, 183-187, 1998.

Won-Kyo J., Pyo-Jam P., Se-Kwon K. Purification and characterization of a new lectin from the hard roe of skipjack tuna, *Katsuwonus pelamis*. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 35, 255-265, 2003.

Wróblewski, S., Berenson, M., Kopecková, P. e Kopecek, J.. Potential of lectin-N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide copolymer-drug conjugates for the treatment of pre-cancerous conditions. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 74, 283-293, 2001.

Xu, Q., Liu, Y., Wang, X., Gu, H., Chen, Z. Purification and characterization of a novel anti-fungal protein *Gastrodia elata*. *Plant. Physiol. Biochem.*, 36, 899-905, 1998.

Yamaguchi, M., Jimbo, M., Sakai, R., Koji Muramoto and Hisao Kamiya. Purification and characterization of *Microcystis aeruginosa* (freshwater cyanobacterium) lectin. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 119, 593-597, 1999.

Yamaura, M., Camilo, R. L., Sampaio, L. C., Macêdo, M.A., Nakamura, M., Toma, H. E. Preparation and characterization of (3-aminopropyl) triethoxysilane-coated magnetite nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 279, 210-217, 2004.

Yanagi, K., Ohyama, K., Yamakawa, T., Hashimoto, K., Ohkuma, S. Purification and characterization of anti-N lectin from *Vicia unijuga* leaves. *Int. J. Biochem.*, 22, 43-52, 1990.

Yamamoto, K., Konami, Y., Kusui, K., Osawa, T. Purification and characterization of a carbohydrate-binding peptide from *Bauhinia purpurea* lectin. *FEBS Lett.*, 281, 258-262, 1991.

Yoshida, N., Ishii, K., Okuno, T., Tanaka, K. Purification and Characterization of Cadmium-Binding Protein from Unicellular Alga *Chlorella sorokinian*. *Curr. Microbiol.*,. *In Press*, 2006.

Zoccatelli, G., Pellegrina, C. D., Vincenzi, S., Rizzi, C., Chignola, R., Peruffo, A. D. B. Egg-matrix for large-purification of plant lectins with different carbohydrates specificities. *Protein Expression and Purification*, 27, 182-185, 2003.

3. JUSTIFICATIVA

Cramoll 1, Cramoll 3, Cramoll 4 e Cramoll 1,4 são preparações lectínicas, obtidas de sementes de *Cratylia mollis*, que vêm sendo utilizadas em diferentes aplicações biológicas e em estudos eletroquímicos e de caracterização estrutural de lectinas, este último com o intuito de elucidar semelhanças ou diferenças entre lectinas obtidas de uma mesma espécie ou de espécies distintas. Métodos de purificação utilizando matrizes não comerciais, a custos mais baixos ou com menos etapas cromatográficas, vêm sendo estudados, mesmo para lectinas que já apresentam protocolos de purificação bem estabelecidos.

A utilização de matrizes naturais como a levana é bastante vantajosa e viável além de ser produzida constantemente pela bactéria *Zimomonas mobilis*. A tecnologia de separação magnética, utilizando partículas magnéticas, é um método rápido e fácil para recuperação de biomoléculas, sendo um adicional às vantagens proporcionadas pela matriz (polissacarídeo), pois facilita no manuseio das amostras. A Ressonância Magnética Nuclear foi utilizada para a avaliação do grau de pureza das levanas e elucidar seus componentes estruturais.

Levana ferromagnetizada foi preparada com o propósito de imobilizar de enzimas, porém a afinidade por frutose (monômero da levana) apresentada pela inibição da atividade hemaglutinante de Cramoll 1, Cramoll 3 e Cramoll 1,4, motivou o uso desta matriz como uma alternativa na purificação destas lectinas, através de um meio mais rápido de obtenção das mesmas. Adicionalmente, esta matriz poderá ser uma alternativa na purificação de lectinas que tenham afinidade pela frutose ou pelas levanas.

4. OBJETIVO GERAL

Avaliar o uso de levana de *Zymomonas mobilis* caracterizada por RMN, insolubilizada na sua forma magnetizada para purificar lectinas fructose seletivas usando preparações de lectinas de sementes de *C. mollis*.

4.1 Objetivos Específicos

4.1.1 Avaliar o padrão de ligação de Cramoll 1,4 e Cramoll 3 e Con A, através do ensaio de inibição de suas atividades hemaglutinantes, utilizando as diferentes preparações levanas;

4.1.2 Caracterizar através de RMN, o padrão estrutural de levanas em suas formas nativas e fracionadas por etanol obtidas de *Z. mobilis*;

4.1.3 Avaliar a utilização da levana ZAG-12 em sua forma ferromagnetizada (FMZAG-12) como suporte de afinidade para a purificação de lectinas através do perfil de ligação da Cramoll 1,4, Cramoll 3 e Con A;

4.1.4 Avaliar a capacidade de FMZAG-12 em purificar as isolectinas de *C. mollis* que se ligaram à levana a partir de frações parcialmente purificadas.

Artigo submetido ao periódico **Biotechnology Progress**

Ferromagnetic levan: an affinity matrix to purify *Cratylia mollis* seed lectin (Cramoll 1)

¹Angeli R.; ¹Da Paz, N.V.N.; ¹Alves, G.C.; ^{1,2}Maciel, J.C.; ¹Araújo, F.F.B.; ¹Paiva, P.M.G.; ^{1,2}Silva, M.P.C.; ^{1,2}Carvalho Jr., L.B.; ³Calazans, G.M.T.; ¹Coelho, L. C. B. B.; ⁴Valente, A.P.; ⁴Almeida, F. C. L.; ^{*1}Correia, M.T.S.

¹Departamento de Bioquímica – Laboratório de Glicoproteínas, ²Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA), ³Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, PE, ⁴Departamento de Bioquímica Médica – Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear de Macromoléculas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21941-590, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

*Corresponding author: Tel: +55-81-2126.8574; Fax: +55-81-21268576; e-mail address: terezacorreia@hotmail.com

Abstract

Molecular forms of *Cratylia mollis* seed lectin, Cramoll 1, Cramoll 3 and Cramoll 1,4 (preparation containing Cramoll 1 and Cramoll 4) have been purified and used in biotechnological applications. Cramoll 1,4 was obtained by chromatography on Sephadex G-75 of an ammonium sulphate fraction (F40-60). Cramoll 1 was a further purified on chromatography with CM-Cellulose. The aim of this work was to evaluate the binding of Cramoll preparations using ferromagnetic (FM) levan as an affinity support to purify lectins. Hemagglutinating activity (HA) and HA inhibition assays were used to evaluate the specific binding of Cramoll 1,4 and Cramoll 3 to levans from *Z. mobilis*. Con A (control lectin), Cramoll 1,4, Cramoll 3 and F40-60 were incubated to FMZAG-12; bound lectins were eluted with specific carbohydrates. PAGE and HA were used to analyze obtained lectins. ZAG-12 and ZAP inhibited all isolectin preparations. Con A and Cramoll 1,4 did bind to FMZAG-12 and were eluted with glucose. Bioselectively dissolved Cramoll 1,4 showed the same eletrophoretic pattern (two polypeptide bands). When F40-60 was incubated with FMZAG-12, only Cramoll 1 was purified, revealing one polypeptide band (isolectin pattern). Levans did bind Cramoll preparations and FMZAG-12 was able to purify Cramoll 1 through a faster protocol.

Keywords: *Cratylia mollis* lectin, levan, ferromagnetic levan.

1. Introduction

Oligosaccharides are considered to have several important functions in nutrition (energy source), material properties (protection from aging, lowering of water activity), and physiology (plant differentiation, growth promoting activities for some enteric bacteria, and stimulating effects on the immune system (1). In the recent decades, polysaccharides isolated from botanical sources (mushrooms, algae, lichens and higher plants) have attracted a great deal of attention in the biomedical field due to the broad spectrum of therapeutic properties and relatively low toxicity (2, 3).

Levan is a fructose polymer from sucrose transfructosylation by levansucrase, known as a promising material for the production of fructooligosaccharides. It is composed by β -2,6 linkages (4); also, it is a by product formed during sucrose fermentation. The chemical structure and physical properties of levans have been extensively characterized, in terms of molecular weight, linkage type, sugar components, and viscosity. Applications for levans have been suggested in food industries, as emulsifier, formulation aid, stabilizer, thickener, surface-finishing agent, encapsulating agent (5); also in medicine as a plasma substitute, drug activity prolongator, antihyperlipidemic agent (6, 7, 8) and a potential antitumor agent (9, 10). They are reductor polymers with variable solubility in cold water, very soluble in hot water and insoluble in ethanol, susceptible to hydrolysis by acids.

Zymomonas mobilis, a facultative anaerobic Gram-negative bacterium, is the main productive of levan in wide scale (11) and ethanol distilleries produce levans as a valuable bioproduct (12). Sucrose concentration and temperature are the most important factors which regulate the activity of *Z. mobilis* levansucrase which catalyze fructooligosaccharide synthesis and levan formation. At low sucrose concentrations (10–15% at 25 °C) ethanol is produced while at high sucrose concentration (50–70% at 45–50 °C) ensured fructooligosaccharide synthesis (12). Its fermentable substrate range is restricted to glucose, fructose, and sucrose.

Ferromagnetic particle in biomedical (13) and industrial (14) areas have been used. Most of these applications require magnetic fluids to be chemically stable, water-soluble, biocompatible, biodegradable and nontoxic. Magnetic polysaccharides such as magnetic dextran just meet these needs and have been used extensively like magnetically directed drug transport, localized therapeutic hyperthermia, immunoassays and MRI analysis (15). But dextrans or other polysaccharides are inert to most direct reactions with proteins or antibodies, and they must be chemically activated to conjugates to biomolecules. A common method, which introduces active functional groups at random positions in dextran, is to cleave the sugar rings with periodates to form magnetic polyaldehyde–dextran. Magnetic separation is an emerging technology using magnetism, sometimes in combination with conventional separation or identification methods, to purify cells, cell organelles and biologically active compounds (nucleic acids, proteins, xenobiotics) directly from crude samples (16).

Lectins are proteins that bind mono or oligosaccharides specifically and reversibly, are not products of an immune response and do not have catalytic activity (17). They are normally found in a variety of organisms (18); binding of lectins to glycoconjugates on cell surfaces have been involved in a variety of biological processes (19).

During the recent past, lectins have found extensive applications for cell differentiations, on account of their ability to specifically bind cell surface carbohydrates which play important roles in biological recognitions. Lectins find are ubiquitously distributed in nature, and occur in abundance in plants, especially seeds of legumes; they are purified to homogeneity with a broad repertoire of carbohydrate specificities (20). Commercial polysaccharide matrices are widely used as affinity chromatography support to lectin purification. Sephadex (glucose polymer), chitin (n-acetylglucosamine polymer) and guar gel (galactosamine polymer) are good examples of these supports (21, 22, 23).

A number of cellular recognition events are thought to involve the specific binding of a structure expressed on one cell surface to a particular receptor on another cell (24). Sugar moieties on the cell surface play important roles in these cellular recognition events (25). Therefore, it is important to understand the molecular bases for the specificity and affinity of these interactions, especially to assess the structures of sugar chains required for interaction with the lectins (24). Conventional hapten inhibitions of haemagglutination using various sugars and sugar derivatives as inhibitors and affinity chromatography on immobilized lectin columns are useful assays to study the carbohydrate-binding specificities of lectins (20).

Cratylia mollis (camaratu bean), is a native forage from the Semi-Arid Region of North Eastern Pernambuco State, Brazil, and belongs to Fabaceae family, taxonomically related with *Canavalia ensiformis* species from whose seeds Concanavalin A, Con A, is obtained. *C. mollis* seeds have been considered an important lectin source, giving multiple molecular forms (Cramoll 1, Cramoll 2, Cramoll 3 e Cramoll 4) with different carbohydrate specificities (26, 27). Cramoll 1, Cramoll 2 and Cramoll 4 are specific for glucose/mannose; Cramoll 3 is galactose specific. A preparation containing Cramoll 1 and Cramoll 4 (Cramoll 1,4) showed a high hemagglutinating activity when compared with the isolated Cramoll 1 and Cramoll 4, and as *Canavalia ensiformis* seed lectin (Concanavalin A, Con A). These lectins preparations (Cramoll 1, Cramoll 4, Cramoll1,4) are inhibited by different carbohydrates (D-glucose, D-mannose, α -D-methyl-mannoside, D-fructose, among others) in distinct concentrations. Cramoll 1,4 and Cramoll 1 were successfully used in different biological assays as well as in structural and electrochemical studies (28, 29, 30, 31, 32, 33, 34).

The aim of this work was to evaluate the use of insolubilized levan in the magnetized form to purify lectins that are inhibited by fructose using preparations containing *C. mollis* lectins and Con A, reducing the cost of the affinity adsorbents and at the same time to improve its properties and performance.

2. Experimental

2.1 Materials

Cramoll 1,4 and Cramoll 1 were obtained through a previously established protocol (27). A 10 % (w/v) seed extract was ammonium sulphate fractionated and the fraction (F) 40 to 60 % of saturation (F40-60) was affinity chromatographed in Sephadex G-75 (Cramoll 1,4) followed by ion exchange chromatography in CM-cellulose (Cramoll 1 and Cramoll 4). Cramoll 3 was obtained through a previously protocol (26). Cramoll 3 was obtained by the same 10 % (w/v) seed extract followed by ammonium sulphate fractionated and the fraction (F) 0 to 40% of saturation (F0-40) was exclusion molecular chromatographed in Sephadex G-100; Con A was obtained from SIGMA.

Levans (L) denominated ZAG-12L, Z-1-81L, CP4 and ZAPL were produced by *Z. mobilis* strain (ZAG-12, Z-1-81, CP4, ZAP) that belonging to the collection of the Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. Levans were obtained in native form and ethanol fractionated (f) by precipitation in different concentrations [10 % to 70 % (v/v)]. Ferromagnetic ZAG-12L (FMZAG-12L) was obtained as previously described (16).

All other chemical reagents used were of analytical grade.

2.2 Protein determination

The protein content was carried out by Lowry (35) using bovine serum albumin as standard. Reading of the absorbance at 280 nm was used to determine the relative concentration of column eluates.

2.3 Hemagglutinating activity and inhibition of lectin induced hemagglutination

Lectin sample solutions (50 μ l) were serially 2-fold diluted in 0.15 M NaCl, in microtiter U-plates, incubated with of a 2.5 % (v/v) suspension of glutaraldehyde treated rabbit erythrocytes (50 μ l), and the titer, defined as the lowest sample dilution which showed hemagglutination, was read after 45 min incubation according to Correia and Coelho (27). Hemagglutinating activity (HA) corresponded to the reciprocal of titer and specific HA (SHA) corresponded to HA divide by the protein concentration.

HA inhibition (HAI) was assayed by lectin sample solutions (50 μ l) serially 2-fold diluted in 50 μ l of levan solutions (25, 50, 100 and 200 mM) followed by a 15 min incubation and addition of erythrocyte suspension. HAI was obtained by HA read after 45 min.

2.4 Levans by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR)

^1H unidimensional spectra were recorded in a BRUKER DRX 400MHz with a triple resonance 5-mm probe. About 1 mg of levan was dissolved em 0.5 ml of 99.8 D_2O . All spectra were recorded at 60 $^\circ\text{C}$.

2.6 Binding evaluation of Con A, Cramoll 1,4, Cramoll 3 and F40-60 with FMZAG-12L

Con A, Cramoll 1,4, Cramoll 3 and F40-60 were incubated with FMZAG-12L particles (1 ml) with 2 h of constant agitation, at 4 $^\circ\text{C}$ and the supernatant were removal. The remaining proteins were eluted with 0.15 M NaCl by several washes (1 ml). The adsorbed lectins were eluted with 0.3 M D-glucose (Con A and Cramoll 1,4) or D-galactose (Cramoll 3 incubation) solutions in 0.15 M NaCl with several washes (1 ml each); fractions with the highest absorbance were pooled and analyzed by HA and PAGE for native and basic proteins according to Reisfeld (36). The supernatant from each wash was obtained using a 6,000 Oe magnetic field. The support was re-equilibrated with 0.5 M followed by 0.15 M NaCl after biospecific elution.

3. Results and discussion

The availability of Cramoll 1 in milligram quantities and more quickly is interesting owed its biotechnological applications (28, 30, 31, 32, 33, 34). The levans from *Z. mobilis* are easily obtained and ferromagnetic appear like an alternative support to immobilize and purify proteins.

NMR can yield important conformational information on oligosaccharides, constituting one of the major methods for structure elucidation of biomolecules in general (37) and was used to analyze the structure of levans. *Zymomonas mobilis*'s levans evaluated, revealed six peaks in the spectra, and these peaks corresponded to the protons constructing the fructose residues. The simplicity of the spectra reflects that these polysaccharides are homopolymers of fructose (Figure 1). *Erwinia herbicola* (38); *Acetobacter xylinum* (39) e *Bacillus subtilis* (Natto) Takahashi (40) produced levans with the same characteristics when analyzed by NMR spectroscopy.

Previous studies of Cramoll 1,4 specificity using different monosaccharides showed that D-fructose inhibited Cramoll 1,4 HA at the same proportion than D-mannose. This fact justifies the binding evaluation of Cramoll 1,4 and Cramoll 3 to different levans to investigate analogies or differences among isoelectin binding sites. According to Calazans (41), in the same temperature, different *Z. mobilis* strains produce levans with distinct molecular weights. Besides, the same *Z. mobilis* strain submitted to different temperatures or precipitation by fractionation technique using solvents also results in levans with distinct molecular weights. The results (mean of four assays) showed that assayed levans did bind differently to isoelectins (Table 1). ZAG-12L and ZAPL were able to inhibit Cramoll 1,4, Z-1-81L and CP4L, did not; Cramoll 3 and Con A were inhibited by levans. Also some levans fractionated by ethanol did not inhibit the lectins. Few works have been described in literature about levans and lectins; however distinct levans could be useful and cheap tools for a better characterization of carbohydrate binding site of lectins. Mo (42) compared the carbohydrate binding properties of banana (*Musa acuminata*) lectin and Con A (structurally similar to Cramoll 1,4), both glucose/manose specific. Con A did bind to D-fructofuranosyl groups present in plant and microorganism levans whereas banana lectin reacted only with microorganism levans.

The use of magnetized support has been proposed as an easy and cheap method of biomolecule purification. Matrices can be conjugated to magnetite (Fe_3O_4) and been immediately recovered by the magnetic strength without loss of protein activity (16). This process insolubilized the levan. The inhibition of lectins by levans suggested that magnetized levans could be potential affinity matrices to investigate or purify lectins that recognize fructose. Evaluation of Cramoll 1,4, Cramoll 3 and Con A specific binding to FMZAG-12L was based on the success to obtain magnetized FMZAG-12L and by the high inhibition of lectins by ZAG-12L. When FMZAG-12L particles were used as affinity matrix to analyze the specific binding of Con A (Figure 2) and Cramoll 1,4 (1.5 mg/ml) by batch assay retained protein was obtained. The eluted Cramoll 1,4 showed a similar pattern to the chromatographed sample (two bands) by polyacrylamide electrophoresis to basic and native proteins (Figure 3); none specific binding to FMZAG-12L was detected when Cramoll 3 was used. Recently, the importance of protein-protein interaction has been pointed out in certain oligomeric lectins since differences among their quaternary organizations appear to be related directly to those among their functions (43). Characterization of lectin binding sites has been studied by many workers to understand more deeply these versatile proteins (22, 24, 44).

The evaluation of FMZAG-12L to purify Cramoll lectins was assayed with F40-60, the ammonium sulphate preparation used to obtain Cramoll 1,4 by one step (affinity chromatography on Sephadex G-75) and Cramoll 1 by two steps (affinity chromatography on Sephadex G-75 using Cramoll 1,4 followed by ion exchange chromatography on CM-Cellulose). When F40-60 (10 mg) was incubated with FMZAG-12L a peak protein was obtained. A matrix saturation assay was performed with different concentrations of F40-60 (18; 10 and 5 mg). A peak protein was obtained with the best concentration (10 mg) when F40-60 was incubated with FMZAG-12L. Polyacrylamide gel electrophoresis to basic and native proteins revealed a unique band, the same pattern of Cramoll 1 (Figure 3). This pure lectin showed HA of 256 and was inhibited by all levans as Cramoll 1,4. The lectin purified by levan showed the same SA and the best yield. This new method to purify Cramoll 1, a glucose/mannose-binding lectin, valuable in biomedical research, is faster and reproducible.

4. Conclusions

NMR spectra of *Zymomonas mobilis*'s levans showed polysaccharides as homopolymers. Carbohydrate polymers such as levans could be used to characterize lectin binding sites; Cramoll 1,4 and Cramoll 3 distinguished levans with distinct molecular weights

and magnetized levans could be useful matrices to purify fructose recognition lectins. FMZAG-12L showed to be an excellent and alternative affinity support to obtain Cramoll 1, by one step purification.

5. Acknowledgements

This paper was financially supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). The authors are deeply grateful to the technical assistance of Mrs. Maria Barbosa Reis da Silva and Mr. João Virgínio da Silva.

References

1. Lim, Y. S., Kang, S. K., Lee, S. O., Jae Lee, Dong; Lee, Tae Ho. Purification and characterization of a levanase from *Streptomyces* sp. 366L. *Journal of Biotechnology*, **1998**, 61, 33–41.
2. Paulsen B.S. Plant polysaccharides with immunostimulatory activities. *Curr. Org. Chem.*, **2001**, 5, 939–950.
3. Wasser S.P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2002**, 60, 258-274.
4. Kang, S. K., Lee, S. O., Lim, Y. S., Jang, K. L., Lee, T. H. Purification and characterization of novel levanooctase-producing levanase from *Pseudomonas* strain K-52. *Biotechnology Applied Biochemistry*, **1998**, 27, 159-166.
5. Bekers, M., Upite, D., Kaminska, E., Laukevics, J., Grube, M., Vigants, A., Linde, R. stability of levan produced by *Zymomonas mobilis*. *Process Biochemistry*, **2005**, 40, 1535-1539.
6. Liepa, V., Zakenfelds, G., Valpe, E., Koronova, Z., Lapsa, R., Laivenieks, M. B. M. and Pospishil, I. Levan prolongs the life-span of tumor-bearing or irradiated mice and enhances the antitumor activity of leukocytes. *Proc. Latv. Acad. Sci.*, **1993**, 5, 59–64.
7. Ishihara K. Antihyperlipidemic and antiobesity agent comprising levan or hydrolysis products thereof obtained from *Streptococcus salivarius*. US patent, **1996**, 5, 527-784.
8. Yamamoto Y., Takashi Y., Kawano M., Jizuka M., Matsumoti T., Saeki S. and Yamaguchi H. In vitro digestibility and fermentability of levan and its hypocholesterolic effects in rats. *J. Nutr. Biochem.*, **1999**, 10, 13–18.
9. Calazans, G. M. T., Lima, R. C., França, F. P., Lopes, C. E. Molecular weight and antitumour activity of *Zymomonas mobilis* levans. *International Journal of Biological Macromolecules*, **2000**, 27, 245-247.
10. Yoo, Sang-Ho, Yoon, Eun Ju, Chac, Jaeho, Lee, Hyeon Gyu. Antitumor activity of levan polysaccharides from selected microorganisms. *International Journal of Biological Macromolecules*, **2004**, 34, 37-41.
11. Ananthalakshmy, V. K., Gunasekaran, P. Overproduction of levan in *Zymomonas mobilis* by using cloned sac b gene. *Enzyme and Microbial Technology*, **1999**, 25, 109-115.
12. Bekers, M., Laukevics, J., Upite, D., Kaminska, E., Vigants, A., Viesturs, U., Pankova, L., Danilevics, A. Fructooligosaccharide and levan producing activity of *Zymomonas mobilis* extracellular levansucrase. *Process Biochemistry*, **2002**, 38, 701-706.
13. Pardoe, H., Chua-Anusorn, W., Pierre, T. G. St., Dobson, J. Structural and Magnetic Properties of Nanoscale Iron Oxide Particles Synthesized in the Presence of Dextran or Polyvivyl Alcoh. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **2001**, 225, 41-46.

14. Hong, X., Guo, W., Yuan, H., Li, J., Liu, Y., Ma, L., Bai, Y., Li, T. Periodato oxidation of nanoescaled magnetic dextran composites. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **2004**, 269, 95-100.
15. Paul, K.G., Frigo, T.B., Groman, J.Y., Groman, E.V. Synthesis of ultrasmall superparamagnetic iron oxides using reduced polysaccharides. *Bioconjugate Chem.*, **2004**, 15, 394-401.
16. Carneiro – Leão, A. M. A., Oliveira, E. A., Carvalho Jr, L. B. Immobilization of protein on ferromagnetic dacron. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **1991**, 31, 53-58.
17. Fento – Navarro, B., Arreguín – L, B., García – Hernández, E., Heimer, E., Aguilar, M. B., Rodríguez – A, C., Arreguín – Espinosa, R. *Toxicon*, **2003**, 42, 525-532.
18. Hong, M., Cassely, A., Mechref, Y., Novotny, M. V. Sugar – lectin interactions investigated through affinity capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography*, **2001**, 752, 207-216.
19. Hayashida, M., Fujii, T., Hamasu, M., Ishiguro M. and Hata, Y. Similarity between protein–protein and protein–carbohydrate interactions, revealed by two crystal structures of lectins from the roots of pokeweed. *Journal of Molecular Biology*, **2003**, 334, 551-565.
20. Surolia, A., Satish, P. Exploiting lectin affinity chromatography in clinical diagnosis. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, **2001**, 49, 625-640.
21. Won-Kyo J., Pyo-Jam P., Se-Kwon K. Purification and characterization of a new lectin from the hard roe of skipjack tuna, *Katsuwonus pelamis*. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, **2003**, 35, 255-265.
22. Roy, I., Sardar, M., Gupta, M. N. Cross – linked alginate – guar gum vedas as fluidized bed affinity media for purification of jacalin. *Biochemical Engineering Journal*, In press **2005**.
23. Trindade, M. B., Lopes, J.L.S., Soares-Costa, A., Monteiro-Moreira, A.C., Moreira, R.A., Oliva, M.L.V. and Beltramini, L. M. Structural characterization of novel chitin -binding lectins from the genus *Artocarpus* and their antifungal activity. In press, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, **2001**.
24. Yamamoto, K., Ito, S., Yasukawa, F., Konami, Y., Matsumoto, N. Measure ment of the carbohydrate-binding specificity of lectins by a multiplexed bead – based flow cytometric assay. *Analytical Biochemistry*, **2005**, 336, 28-38.
25. Gabius, H.J., Andre S., Kaltener, H., Siebert, H.C. The sugar code: functional lectinomics. *Biochimica et Biophysica Acta*, **2002**, 1572, 165-177.
26. Paiva, P. M. G., Coelho, L. C. B. B. Purification and partial characterization of two lectins isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (camaratu bean). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **1992**, 36, 113-118.

27. Correia, M. T. S., Coelho, L. C. B. B. Purification of a glucose/mannose specific, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu bean). Applied Biochemistry Biotechnology, **1995**, 55, 261-273.
28. Baszkin, A., Boissonnade, M., Santos – Magalhães, N. S., Carvalho Jr, L. B., Correia, M. T. S., Coelho, L. C. B. B. *Cratylia mollis* lectin at air – aqueous solution interface: adsorption and lectin interactions. Colloids and Surfaces, **2000**, 17, 191-201.
29. Souza, S., Correia, M. T.S., Pessoa, M. M. A., Kennedy, J., Lima Filho, J. L., Coelho, L. C. B. B. A novel model to characterize the double electric layer of lectin from *Cratylia mollis* (Camaratu bean) and *Canavalia ensiformis* in metallic surface. Carbohydrate Polymers, **2001**, 46, 191-193.
30. Nascimento, C. O., Coelho, L. C. B. B., Correia, M. T. S., Cunha, M. G. C. Liquid – liquid extraction of lectin from *Cratylia mollis* seeds with reversed micelles. Biotechnology Letters, **2002**, 24, 905-907.
31. Souza, S. R., Dutra, R. F., Correia, M. T. S., Pessoa, M. M. A., Lima – Filho, J.L., Coelho, L. C. B. B. Electrochemical potential of free and immobilized *Cratylia mollis* seed lectin. Bioresource Technology, **2003**, 88, 255-258.
32. Andrade, C. A. S., Correia, M. T. S., Coelho, L. C. B. B., Nascimento, S., Santos-Magalhães, N. S. Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes. International Journal of Pharmaceutic, **2004**, 278, 435-445.
33. Maciel, E. V. M., Araújo – Filho, V. S., Nakazawa, M., Gomes, Y. M., Coelho, L. C. B. B., Correia, M. T. S. Mitogenic activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes. Biologicals, **2004**, 32, 57-61
34. Santos, A.C.O., Peixoto, C.A., Coelho, L. C. B. B. Ultrastructural analysis and immunocytochemical localization of isolectins in *Cratylia mollis* seeds. Micron, **2004**, 35, 613–618.
35. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. The Journal of Biological Chemistry, **1951**, 193, 265-275.
36. Reisfeld, R. A., Lewis, U. J., Williams, D. E. Nature, **1962**, 195, 281.
37. Neumann, D., Lehr, C. M., Lenhof, H. P., Kohlbacher, O. Computational modelling of the sugar-lectin interaction. Advanced Drug Delivery Review, **2004**, 56, 437-457.
38. Blake, J. D., Clark, M. L., Jasson, P. E., McNeil, K. E. Fructan from *Erwinia herbicola*. Journal of Bacteriology, **1982**, 151, 1595-1597.
39. Tajima, K. Uenishi, N., Fujiwara, M., Erata, T., Munekata, M., Takai, M. The production of a new water-soluble polysaccharide by *Acetobacter xylinum* NCI 1005 and its structural analysis by NMR spectroscopy. Carbohydrate Research, **1998**, 305, 117-122
40. Shih, I. L., Yu, Y. T., Shieh, C. J., Hsieh, C. Y. Selective Production and Characterization of Levan by *Bacillus subtilis* (Natto) Takahashi. J. Agric. Food Chem. **2005**, 53, 8211-8215.

41. Calazans, G. M. T., Lopes, C. E., Lima, R. M. O. C., França, F. P. Antitumor activities of levans produced by *Zymomonas mobilis* strains. *Biotechnology Letters*, **1997**, 19, 19-21.
42. Mo, H., Winter, H. C., Van Damme, E. J. M., Peumans, W. J., Misaki, A., Goldstein, I. J. Carbohydrate binding properties of banana (*Musa acuminata*) lectin. *European Journal Biochemistry*, **2001**, 268, 2609-2615.
43. Vina, I., Karsakevich, A., Bekers, M. Stabilization of anti-leukemic enzyme l-asparaginase by immobilization on polysaccharide levan. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2001**, 11, 551-558.
44. Banerjee, S., Chaki, S., Bhowal, J., Chatterjee, B. P. Mucin bindind mitogenic lectin from fresh water Indian gastropod *Belamyia bengalensis*: purification and molecular characterization. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **2004**, 421, 125-134.

FIGURE CAPTIONS

Figure 1 – ^1H NMR spectra of levans from *Zymomonas mobilis*. All spectra were recorded at 60 °C for samples in D_2O solution. 1: ZAG-12, native form; 2: ZAG-12 f30; 3: ZAG-12 f70; 4: Z-1-81, native form; 5: CP4, native form; 6: *Erwinia herbicola* levan.

Figure 2 – Con A (1.5 mg) elution from FMZAG-12L particles, each bar represents the mean $\pm$ S.D. of four experiments.

Figure 3 – Cramoll 1,4 (1.5 mg) elution from FMZAG-12L particles (A), each bar represents the mean $\pm$ S.D. of four experiments. Electrophoresis to native and basic protein, stained with amido black of aliquots 14 and 15 (100 μg) (B).

Figure 4 – Matrix saturation assay with different concentrations of F40-60 [18(A) and 5(B) mg] to Cramoll 1 elution from FMZAG-12L particles. C shows the best elution of Cramoll 1 with 10 mg of F40-60, each bar represents the mean $\pm$ S.D. of four experiments. Electrophoresis to native and basic protein, stained with amido black of aliquots 10 and 11 (100 μg).

Table 1- Hemagglutinating activity inhibition of Cramoll 1, Cramoll 1,4, Cramoll 3 and Con A

	Cramoll 1,4	Cramoll 1	Cramoll 3	Con A
HA				
ZAG-12				
Native form	32	2	0	2
f10	16	4	0	64
f20	16	0	0	8
f30	32	0	0	8
f40	4	0	0	0
f50	8	0	0	16
f60	128	0	8	8
f70	64	4	8	16
ZAP				
Native form	64	2	0	16
CP4				
Native form	1024	8	32	64
Z-1-81				
Native form	1024	8	8	16
Levan (sigma)	1024	8	8	8
Fructose	2	2	2	4

Hemagglutinating activity (HA): Cramoll 1,4 = 4096; Cramoll 1 = 256 ; Cramoll 3 = 512; Con A = 2048. HA was made with 2.5% (v/v) suspension of glutaraldehyde treated rabbit erythrocytes.

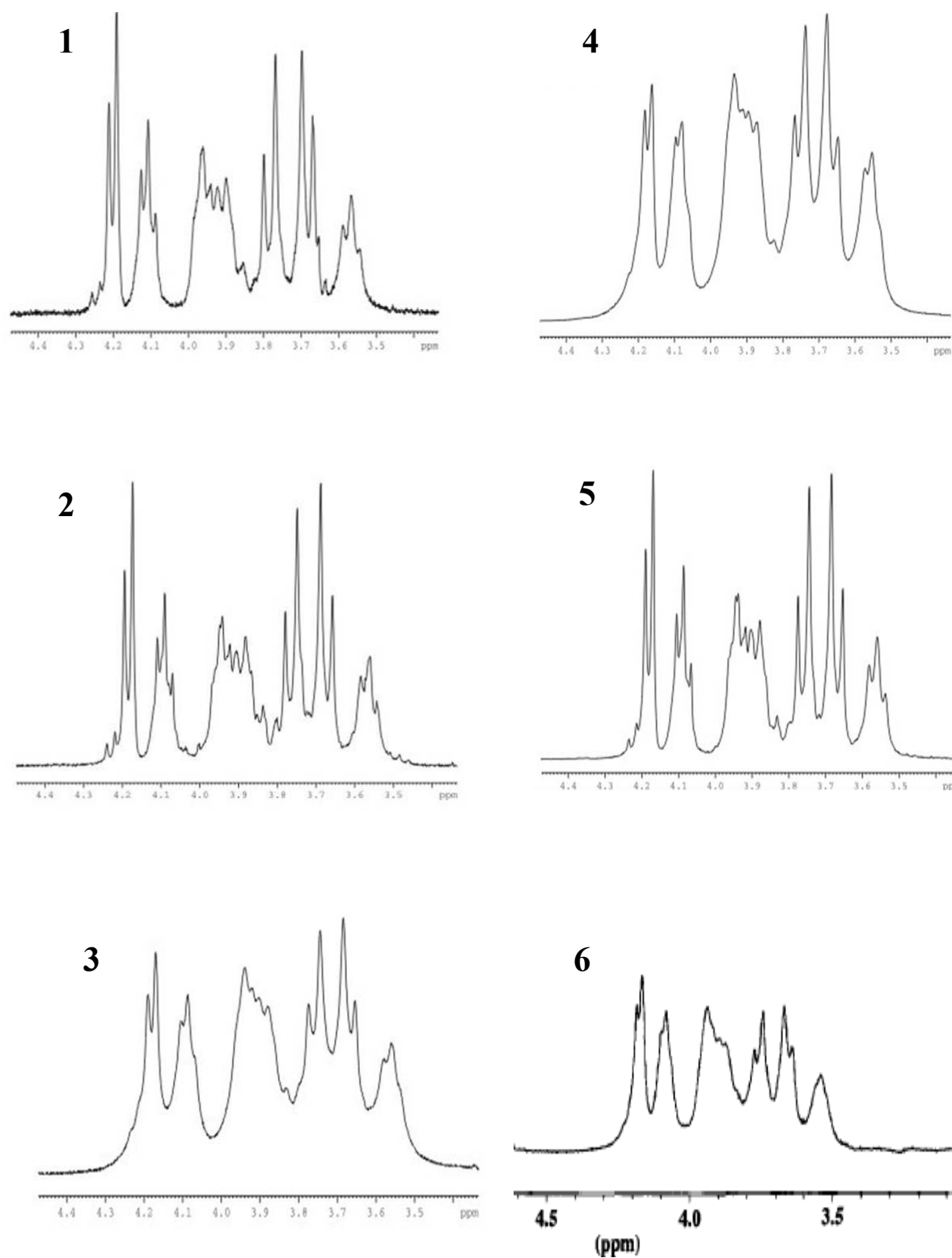
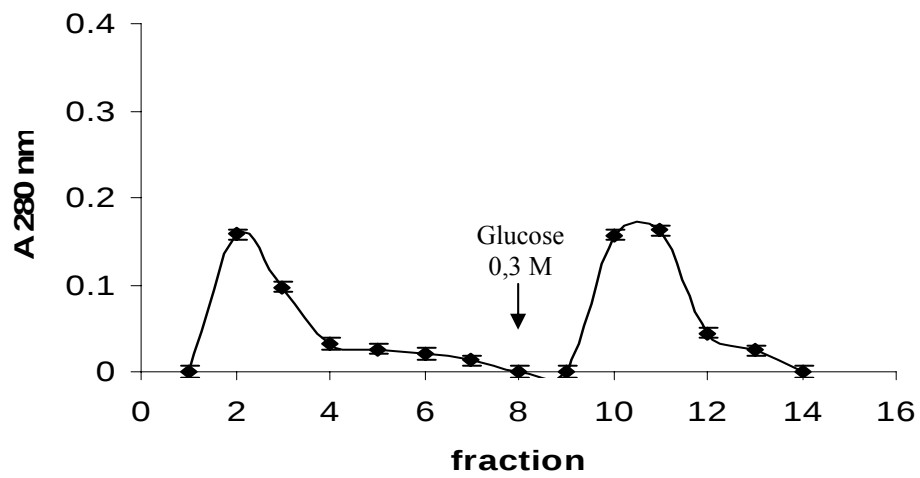


Figure 1

**Figure 2**

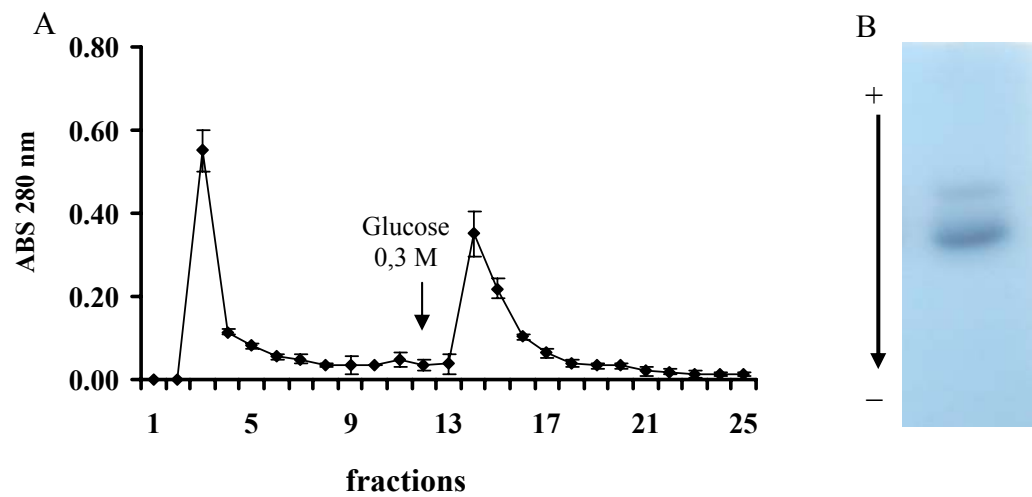


Figure 3

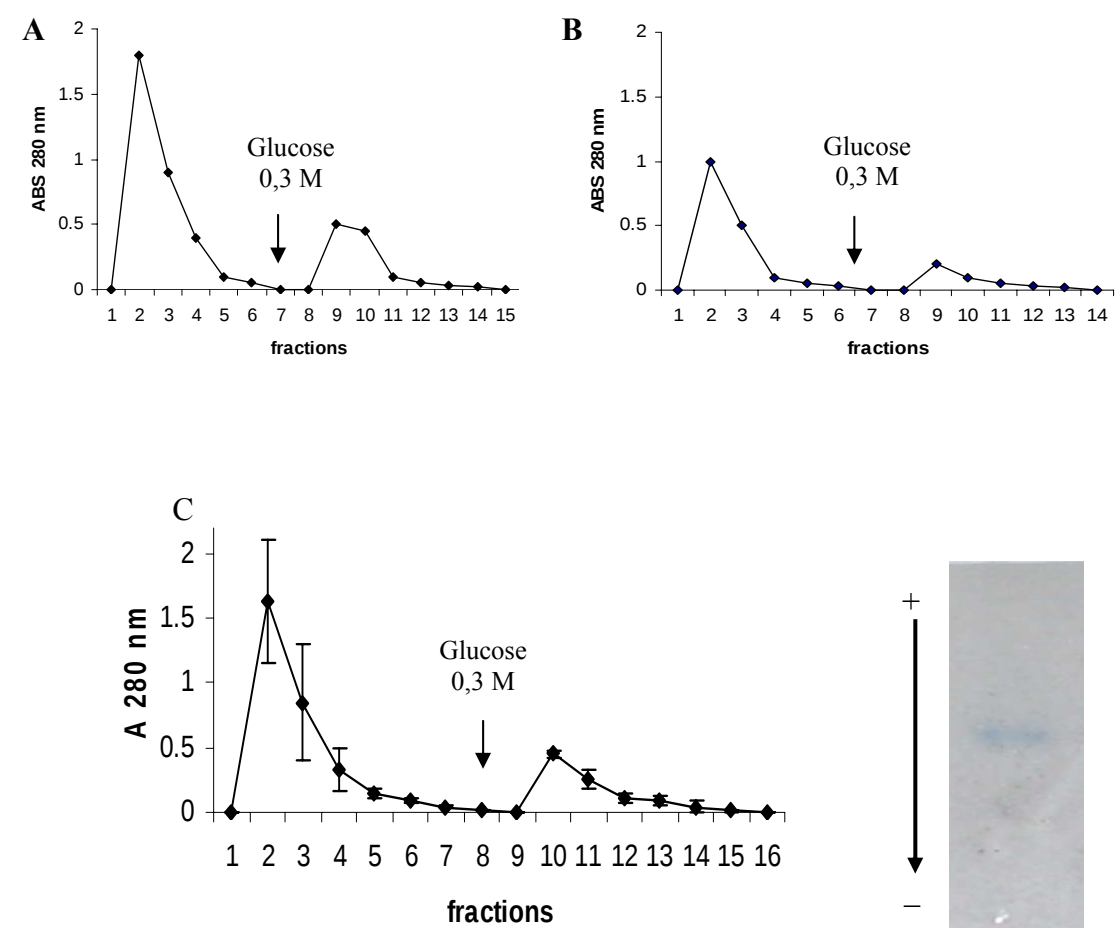


Figure 4

5. CONCLUSÕES

5.1 Diferentes levanas inibem de modo diferente as atividades hemaglutinantes das isolectinas de *C. mollis* e de Con A; enquanto ZAG-12 e ZAP nas formas nativas e fracionadas inibiram a AH de todas as lectinas, CP4, Z-1-81 e a levana comercial obtida da SIGMA inibiram fracamente a AH de Cramoll1,4;

5.2 As levanas de *Z. mobilis* têm um padrão similar visualizado pela Ressonância Magnética Nuclear, apresentando seis picos no espectro que correspondem aos carbonos que constituem os resíduos de frutose. Houve diferença nas larguras de linhas devido aos distintos tamanhos das levanas;

5.3 ZAG-12 em sua forma ferromagnetizada (FMZAG-12) utilizada como suporte de afinidade foi capaz de ligar bioespecificamente a Con A e a Cramoll 1,4 e de purificar Cramoll 1 por cromatografia de afinidade a partir da preparação obtida por fracionamento salino (F40-60) utilizando uma única etapa cromatográfica.