

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

CARACTERIZAÇÃO E EMPREGO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS
REVESTIDAS COM LEVANA COMO MATRIZ DE PURIFICAÇÃO DE LECTINAS

Aluna: Daiane Laise da Silva
Orientador: Prof Dr Luiz Bezerra de Carvalho Júnior
Co-orientadora: Prof^a Dr^a Maria Tereza dos Santos Correia

RECIFE

2015

DAIANE LAISE DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO E EMPREGO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS
REVESTIDAS COM LEVANA COMO MATRIZ DE PURIFICAÇÃO DE LECTINAS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biologia Aplicada à Saúde. Área de Concentração: Biotecnologia.

Orientador:

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Junior

Departamento de Bioquímica, CCB/UFPE;

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA.

Co-orientadora:

Prof^a Dr^a Maria Tereza dos Santos Correia

Departamento de Bioquímica, CCB/UFPE.

RECIFE

2015

Catálogo na fonte

Elaine Barroso

CRB 1728

Silva, Daiane Laise da

Caracterização e emprego de nanopartículas magnéticas revestidas com levana como matriz de purificação de lectinas/ Daiane Laise da Silva– Recife: O Autor, 2015.

78 folhas: Il., fig., tab.

Orientador: Luiz Bezerra de Carvalho Júnior

Coorientadora: Maria Tereza dos Santos Correia

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas, Biologia Aplicada à Saúde, 2015

Inclui bibliografia

- 1. Nanopartículas 2. Lectinas 3. Biotecnologia I. Carvalho Júnior, Luiz Bezerra de (orientador) II. Correia, Maria Tereza dos Santos (coorientadora) III. Título**

620.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2015-261

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO, DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO, NO DIA 16 DE MARÇO 2015.

Aos dezesseis dias do mês de março de dois mil e quinze (2015), às nove horas, no Auditório do Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami da Universidade Federal de Pernambuco, em sessão pública, teve início a defesa da Dissertação intitulada "CARACTERIZAÇÃO E EMPREGO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS REVESTIDAS COM LEVANA COMO MATRIZ DE PURIFICAÇÃO DE LECTINAS" da aluna **Daiane Laise da Silva**, na área de concentração em Biologia Aplicada à Saúde, sob a orientação da **Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior**. A Mestranda cumpriu todos os demais requisitos regimentais para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Aplicada à Saúde. A Banca Examinadora foi indicada pelo Colegiado do Programa de Biologia Aplicada à Saúde "Ad Referendum" e homologada pela Diretoria de Pós-Graduação, através do Processo Nº 23076.012294/2015-29 em 12 de março de 2015, composta pelos Professores: Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior, do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco; Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto, do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Federal Rural de Pernambuco; Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho, do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco. Após cumpridas as formalidades, a candidata foi convidada a discorrer sobre o conteúdo da Dissertação. Concluída a explanação, a candidata foi argüida pela Banca Examinadora que, em seguida, reuniu-se para deliberar e conceder a mesma a menção de **Aprovada** da referida Dissertação. E, para constar, eu **Luiz Bezerra de Carvalho Júnior** (orientador da Dissertação), lavrei a presente Ata que segue por mim assinada e pelos demais membros da Banca Examinadora.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior

Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto

Dra. Luana Cassandra Breitenbach B. Coelho

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por seu imenso cuidado e apoio durante todos os dias da minha vida. Dele vem toda a sabedoria e por isso este trabalho foi possível.

Aos meus pais, Edson e Mauricéa e ao meu irmão Edson Jr. pelo amor e carinho dedicados, pelo apoio em todos os momentos e pelo incentivo fundamental quanto aos estudos.

Ao amor da minha vida, Valdir Santos, pela amizade, cumplicidade e por sonhar junto comigo e me incentivar em cada passo que dou na minha carreira. Esse trabalho é uma conquista nossa!

Ao Prof. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior, por sua bondade em ter aceitado orientar a mim neste mestrado. Aprendi muito com seus ensinamentos, com as discussões sobre resultados, com os conselhos e também com os “puchões de orelha”! Sentirei imensa falta da sua orientação e lhe serei grata por toda a vida.

À Prof.^a Maria Tereza dos Santos Correia, pelo apoio e ensinamentos, e por sempre estar disponível para esclarecer dúvidas. E aos alunos do Laboratório de Glicoproteínas, Rose, Carina e Carlos, pelos ensinamentos passados.

À Mariana Cabrera, por sua orientação quanto à síntese e caracterização de materiais magnéticos. Eu jamais teria conseguido concluir/ entender esta etapa, sem você, Mari! Você tem minha admiração pela grande profissional e amiga que você é. Muito obrigada por seus conselhos e por sempre estar comigo na bancada nos momentos em que mais precisei.

Ao meu querido amigo, Igor Texeira, que me socorreu em todos os momentos com as “benditas eletroforeses.” Por sua paciência, ensinamentos e por tornar o ambiente de trabalho tão leve com sua companhia. Nunca esquecerei da sua disposição e entusiasmo tanto ao me ensinar como em aprender junto comigo!

À Jackeline Maciel por sua disposição e ensino desde o momento da defesa do projeto para entrada neste programa, como ao decorrer da dissertação ao responder e-mails para retirar dúvidas sobre experimentos. Jacke, muito obrigada por sua doçura!

Ao querido Rafael Padilha, que me ajudou nos processos de liofilização, sonicação e na microscopia eletrônica de varredura das amostras, sempre se mostrando disponível e paciente em ajudar. Muito obrigado, Rafa!

Aos meus amigos do IMOBIO, Thiago Vêras, Luiza Lima, Aurenice, Gabriela Ayres, Rodrigo e Camila por me receberem tão bem e estarem sempre disponíveis para retirar dúvidas no dia a dia do Laboratório de Bioquímica. Em especial a Sinara, por ter feito a revisão deste trabalho e ter melhorado este consideravelmente após sua avaliação.

Às colegas de laboratório do SLC, Rafaela, Milena e Marcela Araújo (em especial) que tiraram dúvidas sobre métodos de diálise, e me ajudaram com dosagem de proteínas e uso de equipamentos do Laboratório de Bioquímica.

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia, Carol, Silvia, Yasmim, por nos receberem tão bem durante a reforma do Laboratório de Bioquímica. Em especial a Roberto por estar sempre disposto a explicar os processos de diálises e eletroforese; e José Manoel por me ensinar a dosar proteínas pelo método BCA e por sempre ter boa vontade em ajudar. A todos vocês, muito obrigada!

Aos colegas do Laboratório da Patologia, Jéssica, Matheus Bezerra, Arthur Clark, Carmelita e Marina pela ajuda nas mais variadas situações.

Aos amigos Vera, Felipe, Moisés, Sr. Otaviano e Edson por sempre receberem a todos, inclusive a mim, com muita disponibilidade para ajudar no que for preciso no dia a dia do LIKA.

Aos secretários do PPGBAS, Eliete e Fábio por sempre serem organizados e eficientes quanto ao atendimento das necessidades dos alunos.

A todos os professores do PPGBAS pelos ensinamentos, discussões interessantes e contribuição científica na formação dos alunos desta pós-graduação.

À CAPES e CNPq pelo suporte financeiro.

RESUMO

Os métodos empregados para o isolamento de lectinas são diversos e podem combinar diferentes processos que em sucessivas etapas chegam a purificar estas moléculas. Suportes magnéticos como nanopartículas de óxidos de ferro podem ser empregados a fim de conseguir o isolamento de proteínas e enzimas através do uso da separação magnética. O objetivo deste trabalho foi avaliar se nanopartículas magnéticas revestidas com levana (MNPs-levana) podem ser usadas como matriz de purificação de lectinas a partir de extratos brutos (EB) de sementes de *Cratylia mollis* e *Canavalia ensiformis*. As MNPs-levana obtidas pelo método de síntese por co-precipitação foram incubadas com extrato bruto (EB) de sementes de *Cratylia mollis* e *Canavalia ensiformis*. A determinação de proteínas, atividade hemaglutinante (HA), inibição da atividade hemaglutinante (HAI) e SDS-PAGE confirmaram a purificação das lectinas Cramoll 1,4 e Concanavalina A. Para caracterização dos materiais, MNPs-levana foram comparadas com nanopartículas magnéticas (MNPs) e MNPs-levana após incubação com extratos brutos (MNPs-levana com lectinas ligadas), pelas análises MEV, EDX e MET. MEV mostrou diferenças entre as superfícies das nanopartículas, com aspectos lisos e rugosos em MNPs, superfícies rugosas em MNPs-levana e superfícies planas e rugosas em MNPs-levana após incubação com extrato bruto. Análise por MET mostraram diferenças entre as dimensões maiores (M) e menores (m) das nanopartículas sintetizadas (MNPs com $M_D = 15 \text{ nm} \pm 3 \text{ nm}$ e $m_D = 12 \text{ nm} \pm 3 \text{ nm}$; e MNPs-levancom $M_D = 23 \text{ nm} \pm 5 \text{ nm}$ e 18 nm $m_D = \pm 4 \text{ nm}$) e revelaram um perfil homogêneo de agregação e forma esférica das nanopartículas. MNPs-levana também apresentarampossuir estrutura “núcleo-concha”, devido à presença da levana. Análise de EDX realizada mostrou picos mais elevados de C e O, conforme segue: MNPs-levana com lectinas ligadas>MNPs-levan>MNPs. Também se observou a presença de Fe em todas as amostras.As MNPs-levana mostraram ser matrizes de purificação eficientes, com vantagens como a possibilidade de reutilização (quatro vezes); baixo custo e simplicidade, quando comparadas com os métodos geralmente usados para purificar essas lectinas.

Palavras chaves: nanopartículas magnéticas, levana, matriz de purificação, lectinas.

ABSTRACT

The methods used for lectins isolation are diverse and can combine several processes in successive steps to purify these molecules. Magnetic supports such as iron oxides nanoparticles can be employed to achieve the isolation of proteins and enzymes through the use of magnetic separation. The aim of this work was to evaluate if magnetic nanoparticles coated by levan (MNPs-levan) can be used as purification matrix of lectins from *Cratylia mollis* and *Canavalia ensiformis* seeds crude extracts (CE). The MNPs-levan obtained by co-precipitation synthesis method were incubated with crude extracts (CE) of *Cratylia mollis* and *Canavalia ensiformis* seed. Protein determination, hemagglutinating activity (HA), hemagglutinating activity inhibition (HAI) and SDS-PAGE confirmed the purification of lectins Cramoll 1,4 and Concanavalin A. For material characterization, MNPs-levan were compared with iron oxide magnetic nanoparticles (MNPs), and MNPs-levan after incubation with crude extracts (MNPs with bonded lectins), by SEM, EDX and TEM analyses. SEM analysis showed differences between nanoparticles surfaces, with smooth and rough aspects in MNPs, rough surfaces in MNPs-levan, and flat and rough surfaces in MNPs-levan after CE incubation. TEM analysis showed differences between the large and small dimensions of nanoparticles synthesized (MNPs with $L_D = 15 \text{ nm} \pm 3 \text{ nm}$ and $S_D = 12 \text{ nm} \pm 3 \text{ nm}$; and MNPs-levan with $L_D = 23 \text{ nm} \pm 5 \text{ nm}$ and $S_D = 18 \text{ nm} \pm 4 \text{ nm}$) and an homogeneous profile of aggregation and spherical shape. MNPs-levan also presented a core-shell structure due to the levan presence. EDX analysis performed showed higher peaks of C and O as follows: MNPs-levan with bonded lectins > MNPs-levan > MNPs. Also were observed the presence of Fe in all samples due to the presence of magnetite. The MNPs-levan showed to be an efficient purification matrix, with advantages as possibility of fourfold reuse, low cost and simplicity when compared with methods generally used to purificate these same lectins.

Key words: magnetic nanoparticles; levan; purification matrix; lectins.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS (REVISÃO BIBLIOGRÁFICA)

Figura/ Tabela		Pág
Figura 1	Categorias das lectinas quanto à estrutura. A. Merolectina; B. Hololectina; C. Quimerolectina; D. Superlectina.	3
Tabela 1	Aplicações biotecnológicas das lectinas.	6
Figura 2	Estrutura molecular terciária da Cramoll.	8
Figura 3	Estrutura molecular da Concanavalina A. (A) Estrutura primária e secundária da Con A; (B) Estrutura cristalina tridimensional da Con A; (C) Estrutura quaternária da Con A	14
Tabela 2	Processos de purificação das lectinas Cramoll e Con Aa partir dos extratos brutos de sementes de <i>C. mollis</i> e <i>C. ensiformis</i> .	22
Figura 4	Extração de fase sólida- separação magnética	26
Figura 5	Procedimento geral de separação magnética com partículas magnéticas estabilizadas e bio-funcionalizadas.	31

LISTA DE FIGURAS E TABELAS (ARTIGO)

Fig/Table		Pág
Fig 1	Scanning electron microscopy images of MNPs (A,B), MNPs-levan (B,C) and MNPs-levan incubated with crude extracts (E,F).	61
Fig 2	Transmission electron microscopy images of MNPs (A, B) and MNPs-levan (C,D) regarding to homogeneous morphology and size distribution. MNPs-levan show core-shell structure (D).	62
Fig 3	EDX analysis. Spectrum and quantitative weight estimation of chemical elements (%) in MNPs (A, B), MNPs-levan (C,D), MNPs-levan with bonded lectin (E,F), Levan (G,H).	64
Fig 4	Affinity binding of lectins from crude extracts on MNPs-levan. Fractions (1 mL) were collected and their absorbance at 280nm measured. Each bar represents the mean $\pm$ SD of MNPs-levan washes (first utilization). Each experiment was performed in triplicates incubating 100mg of MNPs-levan with crude extract of <i>Cratylia mollis</i> seeds (A) and <i>Canavalia ensiformis</i> seeds (B).	65
Fig 5	Reutilization profile of MNPs-levan. MNPs-levan were fourfold used and lectins from crude extracts bonded on MNPs-levan were eluted using 0,3 M glucose. Fractions (1 mL) were collected and their absorbance at 280nm measured. Each bar represents the mean $\pm$ SD of each wash. Four experiments were performed in triplicate using 100 mg of MNPs-levan incubated with crude extract of <i>Cratylia mollis</i> seeds (A) and <i>Canavalia ensiformis</i> seeds (B).	65
Table 1	Hemagglutinating activity inhibition of lectins isolated from crude extracts of <i>C. mollis</i> and <i>C. ensiformis</i> seeds.	66

SDS–PAGE stained with Silver (A) and Coomassie Brilliant Blue (B). (A) show pattern of bands (70µg) obtained from the 10th to 24th fractions of experiment using MNPs-levan incubated with *C. mollis* seeds CE (1, 2), bands of *C. mollis* seeds CE proteins (3) and standard (4). (B) show bands of standard proteins (1), *C. ensiformis* seeds CE proteins (2), and bands of lectins (600µg from 10th to 24th fractions) isolated from *C. ensiformis* CE using the system of bond with MNPs-levan (3, 4).

LISTA DE ABREVIACÕES/ SIGLAS

Ab - Antibody = anticorpo

ApcSP - proteína de *Glycinemax*.

BmoLL-Lectina purificada a partir da *Bauhinia monandra*

BpLec - Lectina de *Bothrops pauloensis*

BSA - Bovineserumalbumin = Albumina de soro bovino

CEA - Carcinoembryonic antigen = antígeno carcinoembrionário

Cis- L- Cisteína

Con A – Concanavalina A

cMoL –Lectina de *Moringa oleifera*

Cramoll- Lectina de *Cratylia mollis*

CrataBL– Lectina da *Crataeva tapia*

DENV1, DENV2 e DENV3 – Sorotipos I, II e III do vírus da dengue

DEX-G- Derivados de dextrana

DIRBL - Lectina de *Dicentrarchus labrax*

DNA- Deoxyribonucleic acid = Ácido Desoxirribonucléico

EDX - Energy-dispersive X-rayspectroscopy

FMZAG-12L – Compósitos ferromagnéticos com levana

GEA- quitosana - Quitosana acrilada glicosiloxietil

GOD - Glucose oxidase

HA- Hemagglutinating Activity

HIA- Lectin Hemagglutinating Inhibition

HIV- HumanImmunodeficiencyVirus= Vírus da Imunodeficiência Humana

HRP- Horseradishperoxidase=Peroxidase de rábano

IFN- γ - Interferon gama

IgG – Imunoglobulina G

IL – Interleucina

K_M - Constante de Michaelis-Menten

LPS - Lipopolissacarídeo

LTA- Ácido lipoteicóico

MAA - Aglutinina de *Maackia amurensis*

MARV- Vírus Marburg

MCH - Mercaptohexanol

MEV- Microscopia Eletrônica de Varredura

MET- Microscopia eletrônica de transmissão

MNPs – Nanopartículas magnéticas

MNPs-levan – Bionanopartículas magnéticas revestidas com levana

MP- Membrana plasmática

MuBL/MuHL – Lectinas de *Myracrodruon urundeuva*

NnL– Lectina de *Nemopilemanomurai*

NP, NPs - Nanopartículas

NoV - Norovírus

PANI - Polianilina

PBS- Phosphatebuffered saline = tampão fosfato salino

PCMS- Poli p-clorometilestireno

PEG- Derivados de poli(etileno glicol)

PNA – Aglutinina Peanut

POL – Lectina de *Pleurotusostreatus*

PVB- Polivinil formol clorofórmio

PVM -Poli-Cloreto de Vinilo-vinil ácido maleico acetato

SDS-PAGE - Polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulphate

SEM - Scanning electron microscope

SCID - Severe combined immunodeficiency = imunodeficiência combinada severa

SNV– Scytovirina

T – Tesla

T CD4⁺– Célula T com grupamento de diferenciação 4

TCD8⁺ - Célula T com grupamento de diferenciação 8

TEM - Transmission electron microscopy

Th1 – Células T helper 1

Th17 – Células T helper 17

UEA-I- Aglutinina I de *Ulex europaeus*

V_M - Velocidade máxima

ZEBOV- Vírus Zaire Ebola

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Lectinas: Aspectos gerais	3
2.2 Lectinas ligadoras de glicose/manose: Cramoll e Concanavalina A	7
2.2.1 Aplicações de lectinas purificadas a partir de sementes de <i>Cratylia mollis</i>	8
2.2.2 Aplicações de lectinas purificadas a partir de sementes de <i>Canavalia ensiformis</i>	13
2.3 Métodos utilizados para a purificação de lectinas	21
2.4 Técnicas de separação utilizando suportes magnéticos	25
2.5 Nanopartículas magnéticas: suportes de ligação para biomoléculas	26
2.5.1 Nanopartículas magnéticas de óxidos de ferro	28
2.5.1.1 Síntese de nanopartículas de óxido de ferro por co-precipitação	29
2.5.1.2. Estabilidade e funcionalização de nanopartículas magnéticas	30
2.6 Levana como polímero de revestimento de nanopartículas magnéticas	31
3. REFERÊNCIAS	33
4. OBJETIVOS	53
4.1 Objetivo geral	53
4.2 Objetivos específicos.	53
5. ARTIGO: THE USE OF NANOPARTICLES OF MAGNETITE/LEVAN COMPOSITE TO PURIFY LECTINS FROM SEED CRUDE EXTRACTS	54
6. CONCLUSÕES	78

1. INTRODUÇÃO

Métodos de purificação de biomoléculas têm sido de grande interesse na área biotecnológica para o emprego de enzimas, proteínas ou polímeros na indústria de alimentos, cosmética e farmacêutica (LEIBOVICI e STARK, 1985; YAMAMOTO et al., 2000; RICHARDS et al., 2002; GHASEMI et al., 2014;). Esses métodos podem envolver diversos processos para obtenção da biomolécula pura desejada, e o aumento do número de etapas envolvidas na purificação pode levar a perda da amostra. Além disso, o processo total de isolamento pode tomar muito tempo, ser laborioso e caro, o que inviabiliza a aplicabilidade desses em larga escala (SUMMER e HOWELL, 1936; KHAN e NAEEM, 2011; HE et al., 2013; GAÑÁN et al., 2013; HOU et al., 2013).

Particularmente, lectinas das mais variadas fontes de animais, plantas e microorganismos, têm se destacado pela possibilidade de aplicações na área da saúde (LAM; NG, 2011). Por exemplo, a lectina scytovirina (SNV) isolada de cianobactéria foi capaz de inibir a replicação o vírus Zaire Ebola; a lectina CrataBL isolada a partir da casca de *Crataeva tapia* é capaz de conduzir animais em condições diabéticas a níveis hipolipídêmicos, como os apresentados pela insulina; e a cMoL purificada a partir de *Moringa oleifera*, demonstrou possuir atividade anticoagulante, prolongando o tempo requerido de coagulação sanguínea, com o tempo de ativação parcial da tromboplastina aumentado em mais de 300s. (LUZ et al., 2013; ALVES et al., 2013; GARRISON et al., 2014).

As lectinas isoladas a partir de sementes das plantas *Canavalia ensiformis* e *Cratylia mollis*, chamadas Concanavalina A e Cramoll, respectivamente, têm sido empregadas em diversos estudos que vão desde a demonstração de atividades isetocidas, sistemas de liberação de insulina, e biossensores para identificação de Norovírus e sorotipos I,II e III do vírus da dengue, a demonstração de propriedades antitumorais (FITCHES et al.,2001; LIU et al., 2010; AVELINO et al., 2014; LUNA et al., 2014; HONG et al., 2015). Estas biomoléculas têm sido purificadas por métodos tradicionalmente aplicados como cromatografias, mas também têm sido alvos de buscas alternativas para seus respectivos isolamentos, devido ao custo e tempo demandados nos processos de purificação comumente empregados (SUMMER; HOWELL, 1936; CORREIA; COELHO, 1995; ANGELI et al., 2009; SOARES et al., 2011).

Como método alternativo, técnicas de separação magnética têm mostrado possuir vantagens sobre os processos de cromatografias tradicionais, por sua simplicidade; por possibilitarem uma separação suave de biomoléculas mesmo que sejam grandes complexos; e por evitarem a quebra destes. Estas técnicas envolvem o emprego de suportes magnéticos de escala micrométrica ou nanométrica, que podem ser facilmente empregados em purificações de larga-escala devido aos menores custos e tempo requeridos (CHEN et al., 2010; SHAO et al., 2011, ZHANG et al., 2013a; HE et al., 2014). Estes suportes magnéticos podem ser associados a outros componentes como polímeros ou anticorpos, e se tornarem novas matrizes de afinidade, que podem ser recuperadas da mistura a que estas são expostas pela simples submissão a um ímã. Ainda como vantagem, estes suportes podem ser reutilizados em processos de isolamento posteriores (LEE et al., 2008; ANGELI et al., 2009; MALTAS et al., 2011).

Nanopartículas magnéticas têm sido de grande interesse em processos de separação por possuírem uma grande área de superfície na qual é possível o ancoramento e o maior carregamento de moléculas como enzimas e proteínas imobilizadas ou ligadas para posterior eluição (KHOSHNEVISAN et al., 2011; SHAO et al., 2011; ZIEGLER-BOROWSKA et al., 2014). A possibilidade de utilização de polímeros como revestimento de nanopartículas, não só aumenta da estabilidade destas, mas pode contribuir com grupos denominados funcionais, ou até mesmo podem servir como intermediários para a biofuncionalização desses suportes a fim de alcançar propriedades necessárias para o estabelecimento da ligação com o molécula de interesse (LI et al., 2013; RAMIMOGHADAM et al., 2014).

Neste estudo, foi investigada a possibilidade de purificação de lectinas a partir dos extratos brutos de sementes de *C. mollis* e *C. ensiformis* utilizando como matriz de afinidade nanopartículas magnéticas revestidas com um polímero de D-frutose (levana) isolado a partir de *Erwinia herbicola*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Lectinas: Aspectos gerais

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas de origem não imune, que se ligam de forma reversível e específica a mono ou oligossacarídeos, sem, contudo, alterar a estrutura dos carboidratos ligantes (SHARON; LIS, 2002; SHARON, 2007; LAM; NG 2011). As lectinas podem ser agrupadas em diferentes famílias de acordo com o número de sítios de ligação a carboidratos exibidos, em: merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas (Figura 1). As merolectinas apresentam apenas um sítio de ligação para carboidratos e por isto não são capazes de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados; as hololectinas possuem apenas domínios ligadores de carboidratos com no mínimo dois sítios de ligação idênticos ou similares; quimerolectinas, por sua vez, possuem sítios de ligação a carboidratos além de outro sítio independente, com atividade catalítica ou biológica; e por último, as superlectinas são aquelas capazes de se ligar a diferentes carboidratos por causa da presença de pelo menos dois sítios de ligação com diferentes especificidades (PEUMANS;VAN DAMME, 1998; LAM;NG 2011).

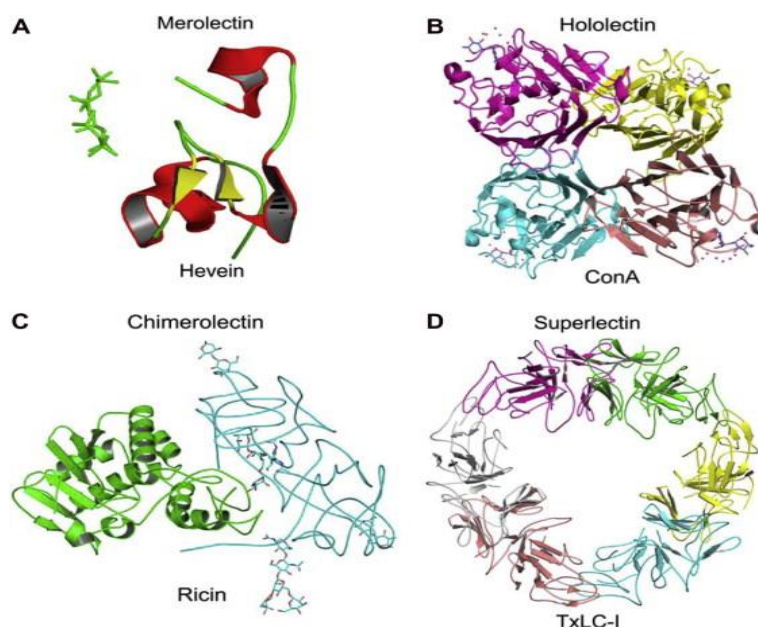


Figura 1. Categorias das lectinas quanto à estrutura. A. Merolectina; B. Hololectina; C. Quimerolectina; D. Superlectina (LIU et al., 2010).

As lectinas podem também ser classificadas com base na especificidade dos carboidratos reconhecidos, como: específica para glicose/manose; galactose/N-acetilgalactosamina; fucose; ou ácidos siálicos (KUMAR et al., 2012). Por causa de suas especificidades, as lectinas podem ser empregadas em diversas áreas. Um exemplo é o uso imunológico de lectina reconhecedora de galactose oriunda de sementes da *Vatairea macrocarpa* (VML) que devido à capacidade de interação com moléculas endógenas da imunidade inata e adaptativa, tem sido utilizada para induzir a infiltração de leucócitos no modelo de edema de pata, migração de neutrófilos por mecanismos indiretos e indução de mediadores quimiotáticos através da ativação de macrófagos (ALENCAR et al., 2004; ALENCAR et al., 2003; ALENCAR et al., 2007). As lectinas glicose/ manose específicas extraídas das espécies de plantas *Cratylia mollis* e *Canavalia ensiformes*, chamadas de Cramoll 1,4 e Concanavalina A (Con A) respectivamente, mostram-se aplicáveis na terapêutica de câncer (LI et al., 2011; ANDRADE, 2004; MELO, et al., 2010), em biosensores,(YANG et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2011a) e associadas a matrizes de bioafinidade para imobilização ou purificação de biomoléculas (ANSARI ; HUSAIN, 2012; NAPOLEÃO, 2013).

As lectinas podem ser isoladas de diversos organismos, existem registros na literatura da presença destas proteínas em microorganismos, animais e plantas (LAM; NG, 2011). Lectinas como a POL, purificada da espécie *Pleurotus ostreatus* foi utilizada como adjuvante na vacina de DNA contra o vírus da hepatite B e a lectina isolada do *Aspergillus fumigatus*, importante por sua contribuição na patogenicidade deste em infecções, são exemplos de lectinas purificadas a partir de fungos. São exemplos de lectinas provenientes de animais a DIRBL, ligadora de ramnose, isolada do soro do peixe *Dicentrarchus labrax* capaz de aglutinar e opsonizar bactérias patogênicas gram-positivas e gram-negativas; a BpLec isolada do veneno da serpente *Bothrops pauloensis*, capaz de inibir bactérias gram-positivas e de aglutinar formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*; e a NnL isolada da espécie de água viva chamada *Nemopilema nomurai*, capaz de aglutinar eritrócitos de cavalos e bactérias *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli* (GAO et al.,2013; KUBOI et al.2013, CAMMARATA et al. 2014; CASTANHEIRA et al., 2013; ALVES et al, 2013; IMAMICHIAND ;YOKOYAMA, 2010; UPADHYAY et al., 2010). Adicionalmente são vários os exemplos de lectinas extraídas de plantas com aplicações biológicas e biomédicas diversas, que têm sido de grande interesse por serem de fácil acesso e adequadas ao

isolamento e análise de glicoconjugados animais e humanos (PEUMANS e VAN DAMME, 1998).

As lectinas oriundas de plantas são divididas em doze famílias de acordo com a especificidade a carboidratos, são elas: (1) Aglutininas homólogas de *Agaricus bisporus*, (2) Amaranthins, (3) Homólogos de quitinase Classe V com atividade de lectina, (4) família Cyanovirin (5), a família do EEE, (6) Família GNA (7), proteínas com domínios heveína, (8) Jacalinas, (9) proteínas com domínios de lectina de leguminosas, (10) domínio LysM, (11) Família Nictaba (anteriormente cucurbitáceas lectinas floema), (12) Família de Ricina-B (VAN DAMME et al., 2008; FU et al., 2011).

Essas lectinas podem ser encontradas em diversas partes das plantas de origem, como em sementes, flores, frutos, folhas, cascas e raízes (RATANAPO et al., 2001). Em algumas partes, essas proteínas são encontradas em grandes quantidades, como por exemplo, 100 g de tubérculos de *Remusatia vivípara* rende 390 mg de lectinas (BHAT et al. 2010); e 100g de sementes do feijão francês nº 35 *Phaseolus vulgaris* rende 1.1 g de lectinas (LAM; NG, 2010).

Lectinas purificadas a partir de plantas mostram-se promissoras em atividades biológicas importantes como: (1) indução à morte de células cancerígenas por apoptose, como membros das famílias de Ricina-B e da família GNA (FU et al., 2011); (2) estímulo da proliferação mitogênica de linfócitos humanos, pelas lectinas Cramoll e Con A (MACIEL et al, 2004); (3) atividade inseticida contra colônias de *Nasutitermes corniger*, apresentada pela lectina purificada a partir do extrato aquoso da casca da *Crataeva tapia* (CrataBL) (ARAÚJO et al., 2011); (4) atividade antimicrobiana, como a apresentada pela lectina purificada a partir de *Archidendron jiringa*, com atividade antifúngica contra *Exserohilum turcicum*, *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum cassiicola*, e antibacteriana contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, e *Candida albicans* (CHARUNGCHITRAK et al., 2011); (5) atividade analgésica e antiinflamatória, como a da CcL purificada a partir da alga verde *Caulerpa cupressoides* (VANDERLEI et al., 2010). A tabela 1 mostra exemplos da diversidade de aplicações biotecnológicas das lectinas nas áreas de biologia e medicina devido à grande capacidade destas moléculas em ligarem carboidratos específicos.

Tabela 1. Aplicações biotecnológicas das lectinas

Atividade	Lectina (fonte)	Detalhes	Referências
Hipoglicêmica	CrataBL - casca da <i>Crataeva tapia</i>	Tratamento por 10 dias nas doses de 10 e 20 mg/kg/dia em camundongos diabético-induzidos	ALVES et al., 2013;
Anticoagulante	cMoL - purificada a partir de <i>Moringa oleífera</i>	Prolongamento do tempo de ativação parcial da tromboplastina e protrombina	LUZ et al., 2013;
Pró-inflamatórias e anti-inflamatórias	Lectina oriunda de sementes da <i>Vatairea macrocarpa</i> ; Lectina proveniente de <i>Lonchocarpus sericeus</i>	Indução da migração de neutrófilos em cavidade intraperitoneal; Inibição da inflamação causada no modelo de peritonite;	ALENCAR et al., 2005 a; ALENCAR et al., 2005 b;
Elucidação do glicocódigo de tecidos transformados	Galectina-3 – proteína animal ligadora de β -galactosídeo;	Avaliação da expressão de galectina-3 por meio de técnicas imunohistoquímicas em vários tipos de câncer;	LEE et al., 2009; CHIU et al., 2010; ARFAOUI-TOUM et al., 2010; HUANG et al., 2008; CAY, 2012;
	Lectina isolada de sementes de <i>Salvia bogotensis</i> ;	Alta afinidade e especificidade para o antígeno Tn que é comumente encontrado em células tumorais;	VEGA; PÉREZ, 2006;
	Lectinas Con A, aglutinina Peanut (PNA), aglutinina I de <i>Ulex europaeus</i> (UEA-I), e a aglutinina de <i>Maackia amurensis</i> (MAA);	Lectinas conjugadas ao éster de acridina para a investigação de glicofenótipos em tumores cutâneos	LIMA et al., 2013;
Biosensor para diagnóstico através da sorotipagem do vírus da dengue	BmoLL- purificada a partir da <i>Bauhinia monandra</i> ;	Imobilizada num compósito formado por nanopartículas de ouro-polianilina (AuNpPANI-BmoLL);	ANDRADE et al., 2011a;
Inseticidas	MuBL e MuHL, isoladas a partir da casca e madeira de <i>Myracrodruon urundeuva</i> ;	Atividade larvicida contra o inseto <i>Aedes aegypti</i> ;	SÁ et al., 2009;
	CrataBL; isolada a partir da casca da <i>Crataeva tapia</i> .	Atividade inseticida contra cupins da espécie <i>Nasutitermes corniger</i> ;	ARAÚJO et al., 2012;
	cMoL, uma lectina extraída de sementes de <i>Moringa oleífera</i> ;	Efeito dose-dependente no peso médio de larvas da mariposa <i>Anagasta kuehniella</i> ;	OLIVEIRA et al., 2011b;
Antimicrobiana	Lectina SPL, ligadora de quitina isolada a partir do rizoma de <i>Setcreasea purpurea</i> ;	Atividades antifúngica a <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , <i>Penicillium italicum</i> e <i>Helminthosporium maydis</i> e antiviral, inibindo HIV-1 (IIIB) e HIV-2;	YAO et al., 2010;
	Lectina SVN, purificada a partir da cianobactéria	Inibição do vírus Zaire Ebola (ZEBOV) e do vírus de Marburg	GARRISON et al., 2014;

	<i>Scytonema varium</i> ;	(MARV)	
	Lectinas Dviol, DRL e ConBr isoladas das espécies <i>Dioclea violacea</i> , <i>Dioclea rostrata</i> e <i>Canavalia brasiliensis</i> , respectivamente;	Atividade antifúngica a leveduras isoladas de secreções vaginais;	GOMES et al., 2012;
Antitumoral	Lectina de <i>Phaseolus vulgaris</i> ;	Inibição da proliferação de células MCF-7 de câncer de mama, por indução da apoptose;	LAM e NG, 2010;
	Lectinas pertencentes à família Ricina-B; como a RBA isolada de farelo de arroz	Indução da morte celular programada em vários tipos de câncer; como inibição da proliferação de células HL-60 de Leucemia promielocítica humana via mecanismos citotóxicos.	FU et al, 2011; MIYOSHI et al., 2001;
	BIL, lectina tipo-C ligadora de galactose, isolada do veneno da cobra <i>Bothrops leucurus</i> ;	Indução da morte celular de melanoma B16-F10;	ARANDA-SOUZA et al., 2014
	Lectina ML-I, uma lectina pertencente à família Ricina-B.	Utilizada como droga anti-neoplásica ou terapêutico adjuvante na quimioterapia e radioterapia em países europeus.	DE MEJÍA; PRISECARU, 2005; LIU et al. 2010.

2.2 Lectinas ligadoras de glicose/manose: Cramoll e Concanavalina A (Con A)

Especificamente, lectinas ligadoras de glucose/manose têm sido reportadas na literatura devido às suas diversas aplicações que incluem, por exemplo, efeitos anti-inflamatórios sob diferentes modelos experimentais, diminuindo a migração celular (ASSREUY et al. 1997, 1999). Nos casos das lectinas Cramoll e Con A, ambas pertencentes à família Leguminosae, tribo *Phaseoleae* e à subtribo *Diocleinae*, mas isoladas de espécies diferentes, é amplamente relatada a possibilidade de aplicação destas lectinas ligadoras de glicose/manose. Estas lectinas taxonomicamente relacionadas e com características em comum, apresentam diferentes perfis de ligação a glicoproteínas e mostram-se de grande importância nas áreas biomédica e biotecnológica (SOUZA et al, 2003; ANDRADE et al, 2011b; PEREIRA et al., 2012; AVELINO et al., 2014; LI et al., 2010).

2.2.1 Aplicações de lectinas purificadas a partir de sementes de *Cratylia mollis* (Cramoll)

Formas moleculares distintas da lectina Cramoll (Figura 2) têm sido caracterizadas e purificadas a partir de sementes de *Cratylia mollis* Mart., conhecida popularmente como feijão camaratu. Esta planta é nativa da região do semiárido do estado de Pernambuco, nordeste do Brasil e pertencente à família Leguminosae (CORREIA; COELHO, 1995).

As primeiras isoformas da Cramoll a serem purificadas foram as isoformas 2 e 3, como descrito no trabalho realizado por Paiva e Coelho (1992), e logo após as isoformas 1 e 4 foram isoladas a partir do trabalho realizado por Correia e Coelho (1995). A Cramoll 1 (isoforma 1) é a maior lectina isolada a partir da *C. mollis*, contendo 236 resíduos de aminoácidos e 82% de sua sequência, além de também sua arquitetura topológica basicamente idênticas a da Con A (CORREIA;COELHO, 1995; SOUZA *et al.*, 2003).

Estudos de caracterização das isoformas revelaram que as formas moleculares 1, 2 e 4 são ligadoras de glicose-manose, enquanto que a isoforma 3 é galactose-específica. As isoformas 1 e 3 são as isolectinas mais abundantes das sementes de *C. mollis* (CORREIA ;COELHO, 1995; PAIVA ;COELHO, 1992; SANTOS *et al.*, 2004).

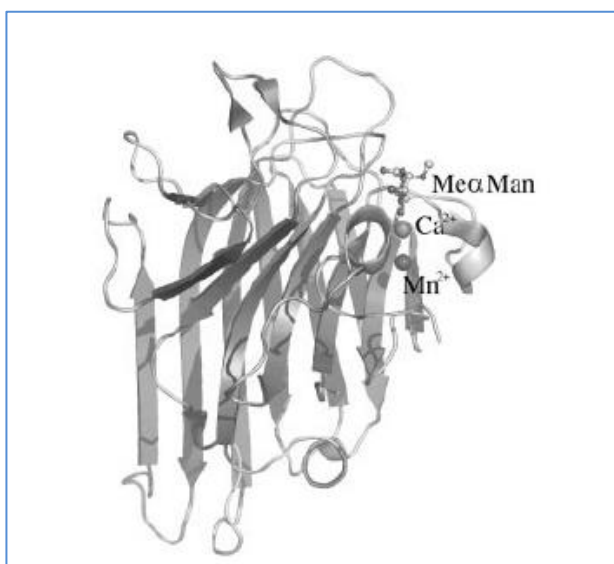


Figura 2. Estrutura molecular terciária da Cramoll (SOUZA *et al.*, 2003).

Devido às suas diferentes propriedades, são descritas várias aplicações da Cramoll. Particularmente a preparação contendo as isoformas 1 e 4, a Cramoll 1,4, tem sido avaliada quanto a sua influência em atividade mitogênica de linfócitos e esplenócitos, mostrando a estimulação da proliferação celular *in vitro*; e sua atividade imunomoduladora sobre linfócitos, induzindo a alta produção de IFN- γ e devido a isso uma resposta Th1; e a supressão da produção de óxido nítrico, exibindo atividade anti-inflamatória (MELO et al., 2010; MELO et al, 2011a; MACIEL et al.,2004). Além disso, a Cramoll 1,4 induziu a produção das citocinas IL-6, IL-17A e IL-22 em culturas de esplenócitos de camundongos BALB/c, com produção de IL-6 e IL-22, 5 vezes e 3,8 vezes maiores, respectivamente, que a produção induzida pela Con A. Ainda, a Cramoll 1,4 induziu a produção de todas as citocinas citadas anteriormente, incluindo a IL-23 em culturas de células mononucleares de sangue periférico humano, mostrando ter uma aplicabilidade biotecnológica importante para a via Th17 de produção de citocinas. Adicionalmente, a preparação 1,4 foi capaz de gerar memória imunológica, propriedade que não foi apresentada pela Con A em nenhuma das condições testadas para IL-6, IL-17A, IL-22 e IL-23 (OLIVEIRA et al., 2013).

Os efeitos da Cramoll 1,4 foram também avaliados em modelos murinos infectados na cauda e por via subcutânea com *Schistosomiasis mansoni*. Os animais infectados foram tratados diariamente com 7mg kg⁻¹ por sete dias; tratados com única dose de 50mg kg⁻¹ quarenta dias após a infecção e não tratados. No 35º dia após infecção, os ovos das fezes dos animais foram contados a cada três dias até o 56º dia após o tratamento, quando os animais tiveram fígados e baços coletados para a contagem e teste de coloração histoquímica de granulomas. O tratamento com Cramoll 1,4 reduziu o número de vermes adultos no sistema portal-hepático, cerca de 79% no grupo tratado após 40 dias e 71% no grupo tratado por 7 dias, ambos em relação ao grupo sem tratamento. Houve redução em 40% e 70% do número de granulomas nos grupos tratados por 7 dias e 40 dias após infecção, respectivamente, além de diminuição do número de ovos liberados nas fezes dos animais. Na histoquímica, as lectinas conjugadas a peroxidase também demonstraram diferenças no padrão de distribuição de carboidratos na superfície dos granulomas, revelando a Cramoll 1,4 como um potencial biomacador e sua potencial atividade anti-helmíntica (MELO et al, 2011b).

No trabalho realizado por Melo et al. (2011c), a Cramoll 1,4 foi utilizada para o tratamento de feridas cutâneas em camundongos saudáveis e imunocomprometidos com metotrexato e vários parâmetros foram observados incluindo edema, hiperemia, sarna,

tecidos de granulação e cicatrização, e a contração das feridas. Nas lesões tratadas, foi visto que na fase fibroblástica houve maior deposição de fibras de colágeno e na fase de maturação a atividade cicatrizante da Cramoll 1,4 mostrou-se completa no 10º dia, enquanto que a do grupo controle, apenas no 12º dia. Além disso, todos os grupos mostraram-se contaminados pela presença de microrganismos, como *Staphylococcus* sp. e *Micrococcus* spp, porém os grupos tratados com Cramoll não apresentaram contaminação de suas lesões experimentais. Os grupos tratados apresentaram alto edema e chegada de células polimorfonucleares nos sítios lesionados, além de excelente mecanismo de reparo e fechamento das feridas, mostrando a Cramoll como um potencial composto cicatrizante.

Em 2012, no trabalho realizado por Pereira et al., uma associação da Cramoll 1,4 com um hidrogel foi testada em queimaduras de segundo grau. O estudo foi realizado com dois grupos experimentais formados por ratos machos Wistar, *Rattus norvegicus*. Ambos os grupos foram submetidos à lesão por queimaduras de 2º grau e tratados por 35 dias consecutivos com 100µL de hidrogel: o grupo 1 (G1) tratado com 100µg de Cramoll 1,4/mL de hidrogel e o grupo 2 (G2), apenas com o hidrogel. Durante os 35 dias de tratamento foram observados parâmetros clínicos, retração das feridas, avaliações hematológicas e bioquímicas, além da histopatologia. Foi concluído que o hidrogel com Cramoll 1,4 foi capaz de acelerar a granulação, apresentando o aumento de fibroblastos e organização de colágeno no centro da lesão, e a retração das feridas, pois o G1 apresentou alta contração de suas lesões em comparação ao G2. Além disso, o tempo requerido para processo de reepitelização foi menor no grupo tratado com a lectina, sendo iniciado no 14º dia. Esses dados indicam a possibilidade do tratamento de queimaduras térmicas utilizando a Cramoll 1,4 em associação com bioprodutos como o hidrogel (PEREIRA et al.,2012).

A Cramoll ainda teve sua atividade avaliada como antitumoral. No trabalho de Andrade et al. (2004), a Cramoll foi encapsulada dentro de lipossomas, com uma taxa de encapsulação de 84% (700µg/ml) e sua atividade antitumoral foi testada em camundongos albinos suíços, que tiveram células ascíticas tumorais injetadas subcutâneamente em sua região inguinal. Nestes animais, foi vista uma inibição de 71% de Sarcoma 180 e foram avaliados histopatologicamente o tumor, fígado, rins e baço. O encapsulamento da Cramoll preveniu a citotoxicidade nos rins e baço.

No estudo realizado por Lima et al (2010), as isoformas Cramoll 1,4 e Cramoll 3 foram conjugadas a Peroxidase de rábano (HRP) e aplicadas na avaliação histoquímica de tecidos prostáticos humanos normais, hiperplasia e carcinoma da próstata. A Cramoll 1,4

corou fracamente o citoplasma de células normais da próstata, e não corou o estroma de tecidos normais; já os casos de hiperplasia foram corados intensamente por esta lectina; e nos casos de carcinoma prostático a intensidade de coloração foi diminuída, mas apresentou-se em grau moderado e mais evidente ao utilizar os conjugados com Cramoll 1,4 em comparação com a Con A. Além disso, a Cramoll 3 destacou-se por corar intensamente a membrana apical e secreção luminal de células tumorais, enquanto o estroma foi moderadamente corado por esta isoforma. Assim, as duas isoformas da Cramoll mostraram-se capazes de ligar diferentemente células normais e tumorais e detectar mudanças neoplásicas sutis de patologias histologicamente relacionadas, devido à variação do glicocódigo expresso nestas células (LIMA et al., 2010).

Além das aplicações descritas anteriormente, a Cramoll foi também empregada em biosensores com diferentes funções. Trabalhos publicados em 2011 e mais recentemente em 2014 mostram a versatilidade e funcionalidade destas lectinas. No estudo realizado por Oliveira et al. (2011c), um biosensor eletroquímico, PVM–AuNpCis–CramoLL, baseado em nanopartículas de ouro- L-cisteína modificado por uma camada a 0,2% de PVM (Poli-Cloreto de Vinilo-vinil ácido maleico acetato) e Cramoll, foi criado para o reconhecimento de LPS (lipopolissacarídeos) das bactérias *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Salmonella enterica* e *Klebsiella pneumoniae*, considerado um fator de virulência presente nestes microorganismos de importância para saúde pública, controle alimentar e biodefesas. A Cramoll manteve sua atividade biológica mesmo após a exposição à superfície do eletrodo e foi capaz de reconhecer os resíduos de glicose e manose na estrutura do LPS de bactérias como da *S. marcescens*. Este sensor biológico composto com o auxílio da Cramoll obteve alta sensibilidade, estabilidade e reprodutibilidade, e mostrou ter sua sensibilidade inibida ao LPS pelo teste de inibição da lectina por outros carboidratos, o que destaca a importância crucial do sistema biosensível criado (OLIVEIRA et al. 2011c).

Biosensores com Cramoll também foram desenvolvidos para a detecção de componentes relacionados à dengue. Um exemplo é o biosistema desenvolvido por Oliveira et al. (2011d), que consiste de um eletrodo de ouro e Cramoll para a detecção de glicoproteínas de soro de pacientes contaminados com sorotipos diferentes do vírus da dengue. O eletrodo de ouro teve sua superfície modificada por PVB–Fe₃O₄–Cramoll-BSA, um sistema composto por soluções de polivinil formol clorofórmio, nanopartículas de Fe₃O₄, Cramoll e albumina de soro bovino. O biosensor foi incubado com o soro de pacientes

infectados pelos sorotipos I, II e III. Neste estudo foi visto que o biosensor foi capaz de detectar efetivamente a presença de vírus da dengue em cerca de minutos em pequenos volumes de amostra, o que foi devido à capacidade da Cramoll em reconhecer diferentes padrões de glicoproteínas relacionadas a sintomas específicos. O biosensor baseado na especificidade desta lectina, mostrou ter boa sensibilidade e reprodutibilidade, podendo ser utilizado para detectar proteínas anormais no soro de pacientes infectados (OLIVEIRA et al., 2011d).

Trabalho semelhante foi realizado por Avelino et al. (2014), onde um biosensor baseado em um nanocompósito híbrido formado por nanopartículas, polianilina e Cramoll (AuNps-PANI-Cramoll), foi utilizado para detectar glicoproteínas anormais de pacientes infectados com os sorotipos I, II e III do vírus da dengue, além de análises eletroquímicas de pacientes com febre da dengue clássica e febre hemorrágica. Microscopia eletrônica de varredura realizada com o biosensor em diferentes incubações com os sorotipos mostrou uma adsorção heterogênea das glicoproteínas à superfície do eletrodo, havendo maior agregação quando o sistema foi incubado ao sorotipo III. Essa característica heterogênea foi atribuída à capacidade da Cramoll em ligar diferentes glicoproteínas no plasma humano, exibindo alta afinidade a α -D-glucose, α -D-mannose. Em suma, o sensor desenvolvido além de demonstrar boa sensibilidade e reprodutibilidade, foi capaz também de identificar os diferentes estágios de infecção da doença (AVELINO et al., 2014).

Lectinas purificadas a partir de sementes de *Cratylia mollis* também têm sido utilizadas para purificação/isolamento de outras biomoléculas, por meio de sua imobilização em matrizes de purificação. Este tipo de aplicação vem sendo relatada desde 1997, quando o trabalho de Lima et al. descreveu o emprego da Cramoll imobilizada em Sepharose CL-4B, formando assim uma coluna de afinidade, que foi capaz de isolar glicoproteínas a partir de plasma humano, incluindo a lecitina-colesterol aciltransferase. Esta matriz Cramoll-Sepharose-4B foi eficiente em precipitar as glicoproteínas (cerca de 10% das glicoproteínas do plasma humano), por causa da alta taxa de imobilização à Sepharose (95 %). A coluna produzida com Cramoll quando comparada a outra matriz de purificação formada por Con A-Sepharose, mostrou elevado grau de pureza do produto obtido, a lecitina-colesterol aciltransferase, que nem mesmo foi retida pela matriz com Con A (LIMA et al, 1997).

Em 2003, no trabalho realizado por Paiva et al., um inibidor de tripsina de sementes de *Echinodorus paniculatus* foi isolado a partir da cromatografia de afinidade utilizando as isolectinas Cramoll 1, 2, 3 imobilizadas em Sepharose (Cra Iso 1,2,3-Sepharose). Cerca de 90% das isolectinas ofertadas foram ligadas efetivamente a Sepharose 4B e, devido aos sítios de ligação a carboidratos disponíveis destas isolectinas, foi possível o isolamento do inibidor de tripsina com rendimento de 32%. A matriz produzida pode, portanto ser utilizada para caracterização do sítio glicosilado do inibidor. Além disso, houve a constatação de que as isolectinas mantiveram sua atividade mesmo após a imobilização, o que sugere a utilidade desta matriz de afinidade para a purificação de moléculas glicosiladas (PAIVA et al., 2003).

Silva et al. (2011) imobilizaram a preparação 1,4 da Cramoll em Sepharose CL-4Be empregaram a matriz resultante para a purificação da proteína ApcSP de sementes de soja, *Glycine max*. Com o protocolo utilizado, foi obtida uma imobilização de 100% das lectinas ofertadas, com 10mg de proteína/mL de gel. A coluna formada por esta matriz, Cramoll 1,4-Sepharose CL-4B, removeu 20,4% das proteínas da fração dialisada F0-40, contendo a AscSP. Esta glicoproteína demonstrou atividade anticoagulante e antiplaquetária *in vitro*. Destaca-se, portanto, a importância e utilidade da matriz empregada por sua afinidade a moléculas glicosiladas (SILVA et al., 2011).

Matrizes utilizando isoformas da Cramoll, Cramoll 1,2,3-Sepharose e Cramoll 3-Sepharose, foram empregadas para o isolamento de glicoproteínas de soro fetal bovino, ovo branco de galinha, colostro humano e plasma de sangue humano. A matriz formada por Cramoll 1,2,3-Sepharose foi avaliada como suporte para purificação de glicoproteínas encontradas no soro bovino, tendo-se uma proteína eluída similar ao padrão da fetuína bovina comercial no SDS-PAGE. Enquanto a matriz Cramoll 3-Sepharose destacou-se por ligar a ovoalbumina e outras proteínas encontradas no ovo de galinha, e a duas principais proteínas plasmáticas de sangue humano semelhantes em peso molecular a albumina e fetuína. Quanto às glicoproteínas encontradas no colostro humano, nenhuma das matrizes foi capaz isolar tais moléculas. O isolamento das glicoproteínas das misturas complexas foi alcançado devido à presença de resíduos de carboidratos como manose, hexosaminas e ácido siálicos (NAPOLEÃO et al., 2013).

2.2.2 Aplicações de lectinas purificadas a partir de sementes de *Canavalia ensiformis*

A partir de sementes da *Canavalia ensiformis*, uma planta que é nomeada popularmente como feijão de porco, pertencente à família Leguminosae e utilizada

comumente na alimentação humana e animal no Brasil, é possível isolar a Concanavalina A (Con A), uma lectina ligadora de glicose-manose e dependente de íons $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ (GOLDSTEIN et al, 1965; EDELMAN et al, 1972; SOARES et al, 2011). O estudo da estrutura tridimensional e covalente dessa lectina elucidou sua forma monomérica com 238 resíduos de aminoácidos, porém esta hemaglutinina também pode ocorrer em dímeros e tetrâmeros a depender do pH do meio em que estas são expostas (Figura 3) (EDELMAN et al., 1972; AGRAWAL e GOLDSTEIN, 1965; LI et al., 2011).

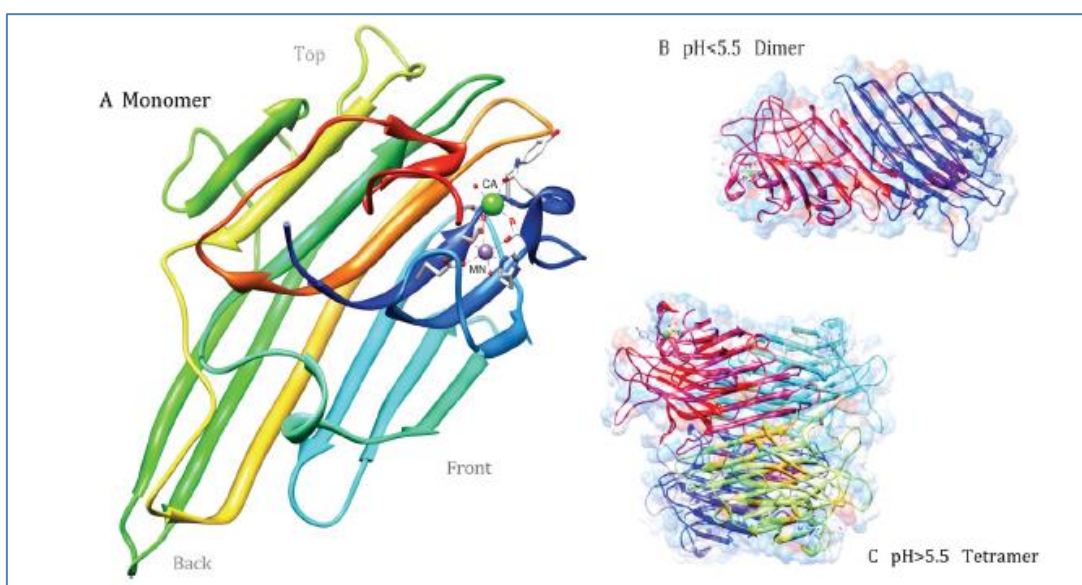


Figura 3. Estrutura molecular da Concanavalina A. (A) Estrutura primária e secundária da Con A; (B) Estrutura cristalina tridimensional da Con A; (C) Estrutura quaternária da Con A (Li et al., 2011).

A Con A foi a primeira aglutinina a ser isolada em forma cristalina e a primeira lectina a ser purificada, sendo uma das lectinas mais estudadas e caracterizadas por suas propriedades únicas (SUMMER; HOWELL, 1936; CORREIA; COELHO, 1995). Esta lectina tem sido investigada amplamente devido a sua habilidade em formar complexos específicos com biomoléculas que carregam grupos de manose ou glicose e tem sido por isso descrita na literatura como aglutinadora de eritrócitos de cães, gatos, cavalos, coelho entre outros animais; aglutinadora de bactérias como *Mycobacterium* e *Actinomyces* e capaz de precipitar globulinas e mucinas gástricas (SUMMER; HOWELL, 1936; BAHAR;

TUNCEL, 2004). Desde a sua descoberta e caracterização inicial, a Con A tem sido aplicada em diversas áreas ao longo de anos de pesquisas, que envolvem desde a sua utilização no controle de insetos até ao tratamento de tumores e aplicação em microhidrogéis para a liberação de insulina (FITCHES et al., 2001; LI et al., 2010; YIN et al., 2012).

A respeito de sua influência no câncer, a Con A tem sido reportada em vários estudos como possuidora de atividades antitumoral e antiproliferativa de células cancerígenas. As vias pelas quais ela atua envolvem a morte celular programada (apoptose) de células cancerígenas, atuando via mitocondrial em diversos tipos celulares como células PU-1.8, células A375 de melanoma humano e células HepG2 de carcinoma hepatocelular de fígado (LI et al., 2010; LIU et al., 2009; LIU et al., 2010); inibição da sobrevivência de células cancerígenas pelas vias de anti-angiogênese IKK-NF- κ B-COX-2, SHP-2-MEK-1-ERK, e SHP-2-Ras-ERK; e autofagia, induzindo a morte de células por internalização da Con A ao se ligar a resíduos de manose presentes na membrana, o que leva à entrada desta lectina na mitocôndria e gera uma diminuição do potencial de membrana com início da autofagia (CHANG et al., 2007; LI et al., 2011).

Em estudos pré-clínicos com animais, a Con A levou células cancerígenas à morte por uma imunomodulação induzindo a mitogênese de células T, além da autofagia citotóxica, demonstrando um efeito terapêutico anti-hepatoma por inibição da formação de tumores e a maior sobrevivência dos animais. Este efeito ocorreu por meio da deposição de Con A em nódulos hepáticos ativando e recrutando células para dentro do fígado, inclusive células T CD4⁺ e T CD8⁺, para as quais os antígenos das células do hepatoma são processados e apresentados, levando a uma resposta específica de células T contra esses tumores (LEI e CHANG, 2007). A Con A foi também capaz de estabelecer memória imunológica contra tumores, induzindo a erradicação do hepatoma e prevenção da formação de tumores futuros no estudo realizado por Chang et al. (2007). Porém, a Con A exibiu ter um efeito inibidor direto na formação de nódulos tumorais de câncer de fígado, independentemente da ativação linfocitária, em camundongos com imunodeficiência combinada severa (SCID) (LEI e CHANG, 2009). Assim, a morte ou inibição da formação de novos tumores induzidos pelos mecanismos moleculares de ação da Con A, abrem uma nova perspectiva envolvendo o uso desta como agente terapêutico contra o câncer (LI et al., 2011).

A Con A também tem sido empregada na síntese de sensores/biosensores com diversas aplicações, sendo desenvolvida uma série de trabalhos recentes que têm revelado a empregabilidade desta lectina para detecção de toxinas bacterianas, glicoproteínas, vírus e câncer, por exemplo (SILVA et al., 2014; LUNA et al., 2014; HONG, et al., 2015; YANG et al., 2014).

No trabalho de Silva et al (2014), um sensor eletroquímico baseado em filmes de Polianilina (PANI) e Con A foi sintetizado com o intuito de detectar o LPS de *Escherichia coli* e o ácido lipoteicóico (LTA) de *Staphylococcus aureus*. Os filmes de PANI desenvolvidos na superfície de eletrodos de aço inoxidável foram modificados com glutaraldeído (sistema PANIG) a fim de possibilitar a imobilização da Con A, e logo após o sistema foi envolvido por uma solução de BSA a fim de preencher os sítios ativos do sistema. Uma vez criados, os eletrodos modificados com PANIG–ConA–BSA foram expostos a concentrações variadas (50-200µg/mL) dos componentes bacterianos. Os resultados mostraram que a Con A mantém a sua capacidade de ligação aos carboidratos mesmo após sua imobilização no eletrodo e que houve um reconhecimento de glicoconjugados da *E. coli* e *S. aureus*. O mecanismo de detecção da toxina na interface da Con A foi semelhante ao estabelecido para Cramoll devido à presença de resíduos de carboidratos encontrados no LPS da *E. coli*, que possui resíduos de galactosamina, ramnose, glucose e galactose, possibilitando a interação do sistema com a estrutura do LPS. Em algumas formas de ácido teicóico são encontrados resíduos D-Glc ou GlcNAc, o que possibilitou a ligação da Con A e o sucesso do biosensor na detecção de toxinas bacterianas (OLIVEIRA et al., 2011c; SILVA et al., 2014).

Devido à necessidade do desenvolvimento de meios rápidos e específicos para diagnóstico nos estágios iniciais da dengue, um biosensor composto de um eletrodo de ouro com superfície modificada pela adição de monocamada lipídica por imersão em solução com lipossomas e adição de Con A, foi desenvolvido com o objetivo de identificar especificamente glicoproteínas em soros de pacientes infectados com sorotipos do vírus da dengue (DENV1, DENV2 e DENV3). Logo após sua formação, o eletrodo Au-Lipid-Con A foi exposto aos soros de sangue de pacientes infectados e foi visto que o sistema apresentou resposta linear às diferentes concentrações de soro com os sorotipos I, II e III. Os biosensores foram úteis na identificação de glicoproteínas no soro dos pacientes com dengue por meio do reconhecimento específico para manose da Con A, presentes por exemplo, na

proteína C3 decorrente da ativação do sistema complemento, que contém subunidades de carboidratos como Man 5-9 (GlcNAc)₂ (MIKI et al., 1986; LUNA et al., 2014).

Hong et al.(2015) utilizaram Con A para construção de biosensor útil para o reconhecimento do norovírus (NoV), um patógeno que pode causar doenças gastrointestinais e que tem grande relevância quanto à sua detecção como forma de prevenir intoxicações alimentares. Para isto, a Con A foi imobilizada em um eletrodo de ouro nanoestruturado seguida do tratamento com Mercaptohexanol (MCH), e incubado com seis concentrações diferentes de NoV (10^1 cópias/mL a 10^6 cópias/mL). O sensor criado mostrou ser extremamente seletivo e sensível (aproximadamente 98%) tendo os norovírus ligados seletivamente a Con A; ter boa reprodutibilidade (cinco eletrodos testados) e boa estabilidade térmica (HONG et al., 2015).

Um imunossensor amperométrico composto por nanotubos de carbono (CNTs) funcionalizados também com a Con A, anticorpos secundários carcinoembrionários e peroxidase de rábano (HRP-Ab₂) foi criado para a detecção de antígeno carcinoembrionário (CEA), uma glicoproteína ácida muito utilizada como marcador em tumores. A Con A foi utilizada neste estudo a fim de ser obtido um duplo sinal de amplificação, por sua introdução na sonda baseada em CNTs. A Con A possibilitou a formação de um microambiente biocompatível para maior deposição de HRP-Ab₂ (anticorpos marcados com peroxidase de rábano) na superfície da sonda. O imunossensor formado por CNTs-PDDA-HRP-Con A-HRPAb₂ foi capaz de exibir alta sensibilidade, baixo limite de detecção, longo tempo de bioatividade e boa análise de efetividade-custo (YANG et al, 2014).

Além das propriedades anteriormente citadas, a Con A também tem sido empregada para a purificação/isolamento de biomoléculas, por meio de sua imobilização. A invertase de *Saccharomyces cerevisiae* foi purificada através do uso de um carreador polimérico formado por uma polimerização de esferas de poli (p-clorometilestireno) (PCMS), no qual a Con A foi ligada covalentemente à superfície. Os parâmetros cinéticos da invertase purificada comparados com a invertase bruta demonstraram que a atividade específica da invertase purificada foi 4,2 vezes maior que a bruta; enquanto a K_M da invertase purificada foi igual a 1: 06%, tendo uma maior afinidade para o seu substrato do que a da invertase bruta. A forma purificada mostrou-se mais estável à temperatura devido aos seus grupos glicosilados. Ou seja, as formas glicosiladas da invertase são predominantemente isoladas pela Con A devido à

alta afinidade que a lectina apresenta no processo de purificação eficiente da invertase, bem como de outras glicoproteínas (BAHAR; TUNCEL, 2004).

No trabalho realizado por Lee et al. (2008), a Con A foi imobilizada em esferas magnéticas de estreptavidina com o objetivo de isolar proteínas de membranas plasmáticas de vários tipos celulares. A Con A biotinizada foi adicionada à superfície esférica e a matriz resultante foi exposta a diferentes preparações de membrana plasmática (MP) que incluíram MP de fígado de ratos, de células PC-3 e de células HeLa. O uso das esferas magnéticas-Con A como um método de cromatografia de afinidade mostrou-se eficiente para o isolamento de proteínas de membranas plasmáticas a partir de tecidos ou células, o que pode ser importante para a elucidação/identificação de biomarcadores em membranas (LEE et al., 2008).

Devido a estas aplicações em purificação, um estudo sobre PEGlação da Con A, com vistas à melhoria da estabilidade desta lectina imobilizada, foi realizado por Wen e Niemeyer (2011). A Con A foi imobilizada em suporte Toyopearl e logo após foi PEGlada com derivados de poli(etileno glicol) (PEG), um polímero altamente biocompatível, anfifílico, não-tóxico e não-imunogênico. A Con A-PEGlada e Con A nativa tiveram suas taxas de ligação e especificidade de ligação a glucose oxidase (GOD) investigadas por adsorção isotérmica. A adsorção da GOD na Con A-PEGlada não alterou a capacidade de ligação a carboidratos da Con A, e a capacidade de adsorção do Toyopearl-ConA-PEG foi altamente conservada (cerca de 90% da capacidade de adsorção inicial). Além disso, a Con A-PEGlada exibiu maior estabilidade em condições de mais extremas, tais como a exposição a solventes orgânicos e altas temperaturas. Ou seja, a Con A-PEGlada pode ser utilizada em processos de biosseparação como a cromatografia de afinidade (WEN; NIEMEYER, 2011).

No trabalho realizado por Yang et al. (2012), a Con A foi associada a partículas magnéticas, desta vez com o objetivo de isolar e identificar glicoproteínas de membrana de células vivas. O objetivo deste trabalho girou em torno da importância biológica das funções das glicoproteínas expressas na membrana de células, que tem um papel crucial principalmente com respeito às mudanças da expressão destas em muitas doenças (YANG et al., 2011, YANG et al., 2012). Células HepG-2 foram incubadas com partículas magnéticas conjugadas a Con A (CMPCs) e as células ligadas então foram tratadas com um kit de extração de glicoproteínas de membrana e as proteínas isoladas foram analisadas. Os resultados mostraram que as CMPCs ligaram as células por intermédio da Con A e a ligação

estabelecida desta lectina com glicanos de superfície. Estes resultados não foram obtidos por partículas magnéticas sem a presença de Con A, que comprovadamente não foram capazes de ligar as células e isolar glicoproteínas. Com a utilização das CMPCs, 37 glicoproteínas foram isoladas e dentre estas, 25 pertenciam à região extracelular, o que pode ser aplicado ao estudo do perfil de glicoproteínas de células em doenças variadas (YANG et al., 2012).

O conjunto de aplicações da Con A inclui a utilização desta lectina em microhidrogéis e hidrogéis para liberação controlada de insulina. Sistemas de liberação de insulina têm sido desenvolvidos em diversas pesquisas a fim de ajudar pacientes com diabetes mellitus que são insulino-dependentes a controlar suas taxas de glicose sanguínea (GORDIJO; SHUHENDLER; WU, 2010; YIN et al., 2012). Neste tipo de sistema, a Con A possibilitou que a glicose livre se ligasse aos sítios específicos do complexo formado pela Con A-polímero, o que levou à dissociação do complexo e à formação de um sistema de liberação regulada (KIM; PARK, 2001).

Por exemplo, no estudo realizado por Yin et al. (2012), microhidrogéis baseados em metacrilato derivados de dextrana (Dex-G) e Con A (Con A-E) foram desenvolvidos, e os microhidrogéis então foram carregados de insulina. Em seguida, os microhidrogéis foram avaliados quanto à liberação de insulina *in vitro* por meio de incubação a 37 °C em PBS (pH 7,4), com agitação em função do tempo e uma mudança gradual na concentração de glicose (0, 4, 10 mg/mL). Foi observado que o aumento da concentração de glicose, promovia liberação cumulativa de insulina, com mudanças significativas a cada momento em que a concentração de glicose era substituída, e, além disso, quando a concentração de glicose foi diminuída para 0mg/mL, a liberação de insulina diminuiu, devido à afinidade reversível da Con A e Dex-G, o que indicou a reprodutibilidade dos microhidrogéis. Além disso, um ensaio de citotoxicidade *in vitro* com células do tipo fibroblastos (L929), revelou que os microhidrogéis não possuíam citotoxicidade, mantendo a viabilidade da cultura de células L929 durante os ensaios de 24, 48 e 72 horas, mostrando boa biocompatibilidade *in vitro* (YIN et al., 2012).

Com o mesmo objetivo de aplicação, mas matriz diferenciada, estudo posterior demonstrou a produção de microhidrogéis baseados em quitosana acrilada glicosiloxietil (GEA-quitosana) e Con A ligados por ligação cruzada a genipina para liberação controlada de insulina com resposta à glicose. Assim como nos resultados obtidos no estudo realizado por Yin et al. (2012), a liberação de insulina *in vitro* foi influenciada pela exposição à

concentrações de glicose. A insulina liberada também provou manter sua estrutura terciária mesmo após sua liberação do microgel. Este microgel também não mostrou toxicidade em células L929, sendo mantidas mais de 90% das células com viabilidade após 72 horas. Testes de avaliação da taxa de perda da Con A revelaram que a lectina imobilizada ligou-se através de grupos amino a genipina, tendo uma perda insignificativa. Assim como os microhidrogéis desenvolvidos anteriormente por este grupo de pesquisa, o microgel formado por quitosana-Con A-genipina mostraram-se eficientes para liberação de insulina, constituindo mais uma alternativa no possível tratamento do diabetes mellitus (YIN et al, 2014).

A Con A ainda é descrita como possuidora de propriedades inseticida. Em trabalhos publicados em 2001 e 2004 por Fitches et al e Sauvion et al, respectivamente, a Con A demonstrou ser altamente tóxica ou inibir o crescimento de espécies de insetos que se destacam por afetarem culturas importantes economicamente. No trabalho realizado por Fitches et al. (2001), larvas de traça de tomate, *Lacanobia oleracea* que foram expostas a uma dieta semiartificial com a Con A, tiveram um acúmulo desta lectina no intestino, túbulos de malpighi e na hemolinfa, além de serem acumuladas no corpo da larva. Análise tecidual comprovou que a Con A foi capaz de se ligar a glicoproteínas presentes ao longo do trato digestivo dos insetos. A Con A mostrou altos níveis de toxicidade contra as larvas alimentadas, principalmente devido ao seu acúmulo nos tecidos do animal, mostrando uma ação inseticida (FITCHES et al., 2001).

O estudo realizado por Sauvion et al (2004) sobre a influência da Con A em afídeo de ervilha, *Acyrtosiphon pisum*, demonstrou por meio de técnicas eletroforética, imunohistoquímica e histofluorescência que esta lectina interage com receptores glicosilados na superfície de células epiteliais do estômago do afídeo, o que afeta diretamente o metabolismo e a função celular do inseto. A Con A age como um inibidor da alimentação. O estômago foi o alvo primário da Con A, e quando esta foi ingerida em altas concentrações, foi vista a sua presença ao longo de todo trato digestivo. Esta lectina foi capaz de provocar inchaço das células epiteliais, além de hipersecreção e deslocamento da membrana apical do intestino médio, fatores que revelam como esta lectina é capaz de afetar esses insetos (SAUVION et al., 2004).

2.3 Métodos utilizados para a purificação de lectinas

A purificação de lectinas pode envolver diferentes métodos como fracionamento em sulfato de amônio, cromatografia de afinidade, cromatografia de troca iônica, cromatografia de exclusão molecular/filtração em gel, extração micelar reversa, e sistema de duas fases aquosas, que em associação podem isolar estas biomoléculas a partir das mais diferentes fontes como sementes, fungos e cianobactérias (SILVA et al., 2012; HE et al., 2015; NASCIMENTO et al., 2013; ZHAO et al., 2009; GARRINSON et al., 2014).

Por exemplo, a CrataBL foi purificada a partir da casca da *Crataeva tapia*, onde o pó da casca foi primeiramente suspenso em NaCl 0,15 M, deixado em agitação por 16 horas a 4 °C, após isto o mesmo foi filtrado e centrifugado. O sobrenadante considerado o extrato bruto foi então fracionado em sulfato de amônio, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, a concentração de 30–60%. A fração precipitada (30–60 F), logo após foi dialisada e submetida à cromatografia em CM-celulose (carboxi-metil celulose) e a lectina foi eluída da coluna com NaCl 0,5 M (ROCHA et al., 2013). Além de passar por esses processos, a CrataBL ainda foi exposta a cromatografia de filtração em gel na coluna Hiprep16/60 Sephacryl S-300 e eluída também em NaCl 0,5 M no trabalho realizado por ARAÚJO et al. (2012).

A purificação da lectina cMoL a partir da farinha das sementes de *Moringa oleifera*, envolveu incubação em NaCl 0,15 M por 6 horas em temperatura ambiente. As proteínas do extrato bruto obtido foram precipitadas em fracionamento com sulfato de amônio 0-60%, a fração 0-60% obtida após centrifugação foi então dialisada e submetida a cromatografia em coluna de gel guar, e a cMoL finalmente foi eluída em NaCl 0,3 M ou NaCl 1,0 M (OLIVEIRA et al., 2011b; LUZ et al., 2013).

No caso da BfL, lectina purificada a partir de sementes de *Bauhinia forficata*, o método utilizado envolveu os seguintes passos: as sementes foram pulverizadas e homogeneizadas em tampão fosfato de sódio 0,1M contendo NaCl 0,15M a 4°C. Esta mistura foi então centrifugada e o sobrenadante considerado o extrato bruto teve suas proteínas precipitadas por sulfato de amônio usando saturação de 0-40% e 40-80%. A fração 40-80% foi dialisada e aplicada em coluna DEAE-Sephadex, as proteínas não adsorvidas correspondentes a fração D1 foram eluídas em tampão Tris-HCl, que continha lectinas. A fração D1 foi aplicada em coluna de Sepharose-4B e mais uma vez a fração contendo lectinas (S1) não foi adsorvida à coluna. A S1 foi submetida à cromatografia de afinidade em coluna de quitina, e a fração Q2 de lectinas adsorvidas à matriz foi eluída com ácido acético 1,0 M (SILVA et al, 2012).

Para purificação de uma lectina a partir do cogumelo *Inocybe umbrinella*, corpos de frutificação foram homogeneizados por uma hora em NaCl 0,15 M, e deixados em repouso a 4°C, logo após os mesmos foram centrifugados e as proteínas do extrato foram então precipitadas com sulfato de amônio (80%) e este precipitado foi suspenso em água e dialisado. O extrato bruto foi submetido à cromatografia em DEAE-celulose e duas frações de proteínas que foram adsorvidas à coluna, foram eluídas utilizando NaCl 50,0 mM (fração D3) e NaCl 1,0 M (fração D4). A fração D3 que apresentou atividade hemaglutinante, foi então submetida à cromatografia de troca iônica em CM-celulose e as proteínas adsorvidas a esta coluna foram eluídas com um gradiente de 0-0,3 M de NaCl em 10 mM de tampão fosfato. Esta nova fração foi então submetida à filtração em gel por cromatografia líquida de proteínas em coluna Superdex 75 HR 10/30 (ZHAO et al., 2009).

Assim, pode-se perceber que os processos envolvidos na purificação de lectinas podem ser os mais variados e envolver combinações diversas para o isolamento da biomolécula de interesse. Por vezes, uma lectina pode ter um protocolo de purificação já bem estabelecido, mas ser alvo de tentativas de métodos alternativos que procuram facilitar o isolamento da mesma por sua importância biotecnológica. São exemplos deste tipo de lectina, a Cramoll e Con A que são destacadas na literatura por suas atividades biológicas e que têm sido submetidas a técnicas de isolamento diferenciadas (OLIVEIRA et al., 2011; NASCIMENTO et al., 2013; GUO; RUCKESTEIN, 2001). A tabela 2 apresenta os métodos de purificação já utilizados para o isolamento destas moléculas.

Tabela 2. Processos de purificação das lectinas Cramoll e Con A a partir dos extratos brutos de sementes de *Cratylia mollis* e *Canavalia ensiformis*.

Lectina	Processo de purificação a partir do extrato bruto (nº de passos)	Referências
Cramoll 2	1. Fracionamento com sulfato de amônio (40-60%) 2. Diálise 3. Cromatografia em coluna 4. Sephadex G-75 5. Coluna de Bio-Gel P-200	PAIVA; COELHO, 1992
Cramoll 3	1. Fracionamento com sulfato de amônio (0-40%) 2. Coluna de CM-celulose 3. Cromatografia em coluna de Sephadex G-75	PAIVA; COELHO, 1992

Cramoll 1,4	1. Fracionamento com sulfato de amônio (0-40%) 2. Fracionamento com sulfato de amônio (40-60%) 3. Diálise 4. Coluna de Sephadex G-75	CORREIA; COELHO, 1995
	Sistema aquoso de duas fases: 1. APTS PEG/Citrato com extrato	NASCIMENTO et al., 2013
Cramoll 1	1. Fracionamento com sulfato de amônio (0-40%) 2. Fracionamento com sulfato de amônio (40-60%) 3. Diálise 4. Coluna de Sephadex G-75 5. Diálise 6. Cromatografia em CM-celulose 7. Coluna de Bio-Gel P-2	CORREIA; COELHO, 1995
Concanavalina A	1. Extração com acetona a 32% 2. Filtração 3. Adição de álcool 4. Filtração 5. Adição de solução com 0,2% de 6. Fosfato neutro e NaCl a 1% 7. Filtração 8. Adição de NaCl (5%) 9. Filtração 10. Diálise 11. Adição de NaCl (10%), e dissolução de cristais em ácido clorídrico 12. Adição de fosfato neutro e hidróxido de sódio 13. Diálise 14. Adição de NaCl saturado a 40 °C	SUMMER; HOWELL, 1936
	1. Incubação da Con A com células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (como ligante) previamente mortas por exposição a aquecimento em banho maria (70°C), associada a separação por ultrafiltração. 2. Exposição a fibra de poros ligada à bomba peristáltica	MATTIASSON e RAMSTORP, 1984
	Sistema aquoso de duas fases: 1. APTS- PEG/citrato com extrato	SOARES et al., 2011

1. Fracionamento com sulfato de amônio (30-60%) por 12 horas
2. Diálise
3. Exposição a esferas de cálcio alginato-celulose

KHAN; NAEEM, 2011

Em adição a estes métodos de purificação, Angeli et al. (2009) indicaram a utilização de compósitos ferromagnéticos com levana (FMZAG-12L) como uma matriz de purificação de lectinas. Em seu trabalho, os compósitos foram avaliados quanto à ligação da Con A comercial, Cramoll 1,4 e Cramoll 3 previamente purificadas pelos métodos descritos por Paiva e Coelho (1992) e Correia e Coelho (1995), e lectinas da preparação F 40-60 de sementes de *C. mollis*. As partículas foram incubadas por 2h a 4°C com 1 mL das lectinas e preparações citadas acima, foram lavadas com NaCl 0,15 M para o desprendimento de proteínas não adsorvidas à matriz. As lectinas ligadas à FMZAG-12L foram eluídas com glicose 0,3M. A Con A e Cramoll 1 e 4 se ligaram especificamente ao compósito por sua afinidade aos resíduos de frutose presentes na levana. A matriz utilizada mostrou ser eficaz para o isolamento destas lectinas, e a purificação da Cramoll foi realizada utilizando apenas dois passos (fracionamento em sulfato de amônio e ligação à matriz), ao contrário dos quatro passos comumente utilizados. Este método além de ser eficiente, mostrou-se simples tanto na síntese do compósito como na recuperação das partículas magnéticas pela fácil aplicação de um campo magnético; e ainda barato, principalmente devido à possibilidade de reutilização dos compósitos (ANGELI et al., 2009).

Partículas/ esferas magnéticas em escala micrométrica ou nanométrica têm sido utilizadas em várias aplicações na área biológica, por exemplo, as mesmas podem ser acopladas a proteínas por meio de técnicas de imobilização, ou associadas a polímeros e se tornarem novas matrizes de afinidade, que diferentemente das matrizes tradicionais compostas, por exemplo, de acrilamida ou agarose, podem ser facilmente recuperadas da mistura a que são expostas pela submissão destas a um ímã (técnica de separação magnética). Ainda como grande vantagem no processo de separação, estes suportes magnéticos podem substituir a centrifugação (LEE et al., 2008; ANGELI et al., 2009; MALTAS et al., 2011).

2.4 Técnicas de separação utilizando suportes magnéticos

Entre as técnicas de separação comumente utilizadas, a extração em fase sólida tem sido uma das mais destacadas devido à sua eficiência quanto à seletividade e recuperação de moléculas alvo. Neste tipo de extração as moléculas adsorvidas ao suporte sólido de afinidade, que podem ser nanomateriais ou materiais mesoporosos, podem se ligar de forma irreversível à matriz e o processo muitas vezes pode envolver centrifugação e a co-precipitação de contaminantes, levando à perda da amostra (HE et al., 2013; GAÑÁN et al., 2013; HOU et al., 2013).

Sólidos magnéticos podem ser utilizados na identificação de biomoléculas, ou até mesmo de compostos orgânicos e inorgânicos e ainda serem uma alternativa em processos de separação como na técnica de separação magnética (AGUILAR-ARTEAGA et al., 2010).

No caso da separação magnética como técnica de extração de fase sólida, o material magnético é empregado como adsorvente, por exibir afinidade à molécula de interesse. Este material que é exposto diretamente à amostra com os componentes alvos (analito), é incubado por um tempo e após isto as moléculas adsorvidas são eluídas a partir do adsorvente, com captura e recuperação possíveis devido à aplicação de um campo magnético que atrai o suporte de afinidade utilizado na separação (Figura 4) (CHEN et al., 2011; TOH et al., 2012).

Esta técnica que vem sendo muito estudada ao longo dos anos tem vantagens sobre outros métodos de separação de biomoléculas por envolver uma separação suave e não destrutiva, inclusive de grandes complexos, como proteínas, que podem ser facilmente quebrados na cromatografia tradicional. Além disso, o material utilizado nesta técnica tem boa compatibilidade, grande área de superfície para ligação, são facilmente manipulados quanto à sua funcionalização e ainda podem ser empregados em larga escala por sua eficiência e por demandar menos tempo para a purificação/isolamento de biomoléculas (CHEN et al., 2010; SHAO et al., 2011, ZHANG et al., 2013a; HE et al., 2014).



Figura 4. Extração de fase sólida- separação magnética. *Reproduzido e adaptado de Wang et al., 2013*

Geralmente a separação magnética pode ser realizada diretamente, pela exposição da amostra contendo os compostos de interesse às partículas magnéticas de afinidade, mas também indiretamente, pela exposição anterior da amostra com o analito alvo a um intermediário, por exemplo, anticorpo, que primeiramente se liga ao analito em questão formando um complexo que posteriormente é ligado por afinidade às partículas magnéticas. Nos dois tipos de separação citados, ambos eficientes, as moléculas de interesse adsorvidas aos sólidos magnéticos são separadas destes por eluição e aplicação de um separador magnético (SHAO et al., 2011; UYTENDAELE et al., 2000).

2.5 Nanopartículas magnéticas: suportes de ligação para biomoléculas

Comumente é descrito na literatura a aplicação de nanomateriais na indústria farmacêutica e na medicina como sistemas de liberação de drogas, biosensores ou na detecção de doenças (GUPTA e GUPTA, 2005; CHOMOUCKA et al., 2010). E as nanopartículas magnéticas (MNPs) têm sido também envolvidas em processos importantes na área da saúde, como em terapia gênica assistida magneticamente, engenharia de tecidos e em terapia de doenças pela liberação de drogas, que direciona estas para sítios específicos onde ocorre a doença, um tratamento-alvo que não causa efeitos sobre outras partes do corpo (SHINKAI, 2002; CORCHERO e VILLAVARDE, 2009; CHOMOUCKA et al., 2010).

No entanto, novas aplicações destes materiais têm sido feitas na área biotecnológica, como em catálise orgânica e em processos de bio-separação, que são possíveis através da modificação da superfície das nanopartículas magnéticas pela utilização de macromoléculas e moléculas orgânicas ou inorgânicas que cobrem o núcleo magnético, oferecendo maior estabilização química e funcionalização desses materiais (ZIEGLER-BOROWSKA et al., 2014).

As nanopartículas (NPs) geralmente produzidas apresentam tamanhos menores que 100 nm em pelo menos uma dimensão, esta diminuição pode alterar as propriedades físicas levando ao aumento do número de átomos de superfície, bem como de sua energia, diminuindo ainda as imperfeições das NPs produzidas (PARASHAR et al., 2009; FARAMARZI e SADIGHI, 2013).

Por estarem em dimensões nanométricas, as MNPs dispõem de uma grande área de ligação e por isto, estes sólidos têm sido aplicados como superfície de imobilização para biomoléculas como peptídeos, enzimas, ácidos nucleicos e anticorpos. Além disso, estes suportes apresentam baixa toxicidade e podem ser facilmente separados de uma mistura complexa devido às suas propriedades magnéticas com subsequente reutilização (WILHEIM et al., 2002; DYAL et al., 2003; KHOSHNEVISAN et al., 2011; EASO e MOHANAN, 2013; ZIEGLER-BOROWSKA, 2014).

Devido à disponibilidade de grande área superfície específica, o que possibilita maior carregamento de moléculas por unidade de massa de partícula, as MNPs têm sido envolvidas em uma série de trabalhos de ligação de biomoléculas, especialmente relacionados à imobilização, um processo que pode levar a melhoria da estabilidade, modulação de propriedades catalíticas, maior atividade, seletividade e reuso de enzimas e proteínas (FARAMARZI e SADIGHI, 2013; PANEK et al., 2013; KHOSHNEVISAN et al., 2011; JIANG et al., 2009; MATEO et al., 2007; POLIZZI et al., 2007). São exemplos: (1) MNPs de Fe_3O_4 revestidas de quitosana utilizadas para imobilização de acetil xilano esterase recombinante, uma enzima produtora de ácido peracético utilizado na degradação de poluentes industriais. (2) As MNPs imobilizadoras de trealose sintase recombinante, enzima que converte a maltose em trealose e que pode ser aplicada em medicina e indústrias cosmética e farmacêutica. (3) MNPs com estrutura “core/shell” (núcleo/ concha) de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZnO}$ que imobilizaram a lipase, enzima amplamente utilizada na síntese orgânica devido a características úteis apresentadas como estabilidade a temperaturas extremas e

grande especificidade a substratos (ROTHBART et al., 2012; SARAVANAKUMAR et al., 2014; PANEK et al., 2013; RICHARDS et al., 2002; GHASEMI et al., 2014).

Além de serem utilizadas em imobilização, as MNPs podem também ser empregadas em processos de bio-separação com o objetivo de purificar moléculas. São exemplos disso, as MNPs de Fe_3O_4 /Au-ANTA- Co^{2+} , com superfície modificada por ácido mercaptopropiônico (MPA), seguida por conjugação de N α , N α -Bis (carboximetil)-L-lisina hidratado (ANTA) e subsequentemente o Co^{2+} , utilizadas para a purificação da proteína His-Tag, com uma capacidade de ligação de 74 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de nanopartículas; e as MNPs revestidas de amido que purificaram a imunoglobulina G (IgG), obtendo-se uma média de recuperação de 98% das IgGs que foram ligadas, por miligrama de MNPs (ZHANG et al., 2013b; GAGNON, et al., 2014).

2.5.1 Nanopartículas magnéticas de óxidos de ferro

Os óxidos de ferro têm sido utilizados na composição de nanopartículas magnéticas por apresentarem menor toxicidade, maior estabilidade oxidativa e maior estabilidade em sistemas não aquosos, quando comparados com metais puros como ferro (Fe) e cobalto (Co) (CHOMOUCKA et al., 2010).

Estes compostos magnéticos têm sido muito aplicados em tecnologia e são considerados óxidos metais de transição substanciais, caracterizados pelo seu estado trivalente, baixa solubilidade e colorações variadas. Dentre os óxidos de ferro, os de estrutura core/shell tem sido as fontes de materiais magnéticos mais amplamente utilizadas (DRBOHLAVOVA et al., 2009; ISLAM et al., 2012; CORNELL; SCHWERTMANN, 1996). Até agora são conhecidas dezesseis fases puras de óxido de ferro, entre elas estão os óxidos hematita, maghemita, magnetita; os hidróxidos como hidróxido de ferro (III) e hidróxido de ferro (II) e os oxihidróxidos como geotita, ferrihidrita e lepidrococita (RAMIMOGHADAM et al., 2014; CORNELL; SCHWERTMANN, 1996).

Estes compostos magnéticos têm vários polimorfos cristalinos conhecidos e entre estes apenas a magnetita ($\epsilon\text{-Fe}_2\text{O}_3$, Fe_3O_4) e maghemita ($\beta\text{-Fe}_2\text{O}_3$, $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) tem sido de grande interesse em aplicações biológicas (ZBORIL et al., 2002; TUCEK et al., 2006). Estes óxidos de ferro, ambos ferrimagnéticos têm características globais semelhantes, porém diferenças em composição e coloração tornam possível a distinção desses materiais. A magnetita (Fe_3O_4), com estrutura cristalina cúbica, possui cor preta e tem a particularidade

de conter tanto os íons Fe^{2+} e Fe^{3+} , enquanto a maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), com estrutura cúbica ou tetragonal, possui cor castanho avermelhada, com íons Fe^{3+} responsáveis pelo seu magnetismo (CORNELL; SCHWERTMANN, 2003; RAMIMOGHADAM et al., 2014).

A magnetita tem se mostrado um dos óxidos de ferro mais importantes. Este material possui uma estrutura cristalina espinélio inversa, com uma célula unitária cúbica de face centrada com comprimento de 0.839 nm e 32 átomos de oxigênio. Nesta estrutura cristalina em particular, os íons Fe^{2+} e metade dos íons Fe^{3+} ocupam os sítios octaédricos, enquanto os sítios tetraédricos são ocupados apenas por Fe^{3+} . Nesta estrutura, os átomos de ferro divalentes ocupam os sítios octaédricos para obter alta estabilização de energia no campo cristalino, enquanto os átomos de ferro trivalentes ocupam ambos os sítios citados anteriormente obtendo estabilização de energia igual a zero (CORNELL; SCHWERTMANN, 2003). Este material tem sido utilizado na síntese de nanopartículas, sendo empregado para a formação do núcleo magnético e devido à sua biocompatibilidade, vem sendo aplicado na área biomédica (HUBER et al., 2005; TUCEK et al., 2006).

2.5.1.1 Síntese de nanopartículas de óxido de ferro por co-precipitação

Vários métodos podem ser utilizados para a síntese de nanopartículas de óxido de ferro, como método sol-gel, técnica de micro-emulsão, técnica de injeção em fluxo, método aerosol/vapor, técnica sonoquímica, método hidrotermal e o método de co-precipitação. Todos estes enfrentam os mesmos desafios: otimização das condições de reação para obtenção de um material em nanoescala; que as nanopartículas produzidas sejam monodispersas e que o processo de síntese utilizado possa ser reproduzível permitindo aplicação em escala industrial (RAMIMOGHADAM et al., 2014).

O método de co-precipitação é o mais indicado e a via química líquida mais eficiente para a síntese de MNPs de óxido de ferro. Este método é descrito na literatura como o mais simples, barato e ecologicamente correto e envolve a precipitação de óxidos de ferro em solução aquosa alcalina de sais contendo íons Fe^{2+} e Fe^{3+} . A reação é principalmente regida pelo ajuste de pH e o processo pode ser dividido em duas fases: a primeira envolve a formação de nucleações pequenas e a segunda envolve o aumento dos núcleos pela difusão de solutos para a superfície do cristal formado (KANG et al., 1996; QU et al., 1999; MORALES et al., 1999). Neste processo, o controle do tamanho das MNPs monodispersas criadas é realizado no primeiro passo e em adição a isto, sabe-se que o tamanho e a forma

das nanopartículas de óxido de ferro pode ser personalizado pelo tipo de sal utilizado (como cloretos, sulfatos, nitratos, percloratos, etc), pH, força iônica, temperatura e pela proporção entre os íons férrico e ferroso utilizados na reação (BABES et al., 1999; TARJAT et al., 2005).

2.5.1.2 Estabilidade e bio-funcionalização de nanopartículas magnéticas

As propriedades das nanopartículas magnéticas são determinadas por vários fatores que incluem a composição química, a forma, tamanho, a interação destas com outras partículas vizinhas ou com os componentes do meio, entre outros (EASO; MOHANAN, 2013). Sabe-se que um dos principais problemas relacionados às MNPs é que devido à ampla área de superfície em relação ao volume, esses materiais tendem a agregação, diminuindo a energia de superfície pela formação de atrações dipolo entre as MNPs, por estas terem superfícies hidrofóbicas (EASO; MOHANAN, 2013; LU et al., 2007). Devido a isso, vários materiais têm sido utilizados como revestimento a fim de melhorar a estabilidade desses sólidos magnéticos possibilitando maior dispersividade no meio (SHUBAYEV et al., 2009).

As nanopartículas podem ser revestidas com silanos, organosilanos, sílica, ácido oleico, proteínas e polímeros, dentre outros compostos, a fim de alcançar melhores propriedades físicas e químicas. Estes revestimentos possibilitam a formação da estrutura core/shell, na qual o núcleo é composto por material magnético e o revestimento por um dos compostos anteriormente citados. Estas MNPs de estrutura core/shell têm vantagens como boa dispersão, alta estabilidade contra oxidação e ainda grande quantidade de drogas podem ser ligadas e carregadas em revestimentos como polímeros (HU et al., 2006; SKAAT e MARGEL, 2009; CHEN et al., 2008; CAI et al., 2007; HUANG et al., 2009).

Particularmente o uso de polímeros como revestimento de MNPs tem atraído bastante atenção devido às suas propriedades únicas, como o melhoramento das forças atrativas das nanopartículas; por dar às MNPs a possibilidade de serem aplicadas em várias áreas, inclusive na liberação de drogas; e por darem a estas características físicas e químicas flexíveis exclusivas (RAMIMOGHADAM et al., 2014; CHOMOUCKA et al., 2010). A camada de proteção ou matriz protetora que pode ser formada por polímeros, não só protege as MNPs de agregação e degradação, mas também pode dar a estas nanopartículas grupos funcionais como $-NH_2$ e $-COOH$, que possibilitam a ligação de proteínas e enzimas,

processo chamado de bio-funcionalização. Proteínas, por exemplo, podem se ligar ou serem adsorvidas à superfície hidrofóbica formada através do polímero que reveste a MNP (LI et al., 2013).

Além disso, MNPs já estabilizadas com algum tipo de revestimento podem ainda ter suas superfícies modificadas pela adição de materiais funcionais que dão hidrofobicidade ou afinidade a estes materiais magnéticos. Por exemplo, a histidina e a biotina são exemplos de ligantes de afinidade incluídos na superfície de esferas magnéticas a fim de atuarem num biorreconhecimento específico. A bio-funcionalização pode ser realizada não só pela adição de grupamentos químicos funcionais, mas pela adição de anticorpos a fim de isolar células que expressam algum antígeno específico; ou adição de oligonucleotídeos a fim de separar e purificar ácidos nucleicos, como pode ser observado na figura 5 (HE et al, 2014; VLČKOVÁ et al., 2014; COLOMBO et al., 2012).

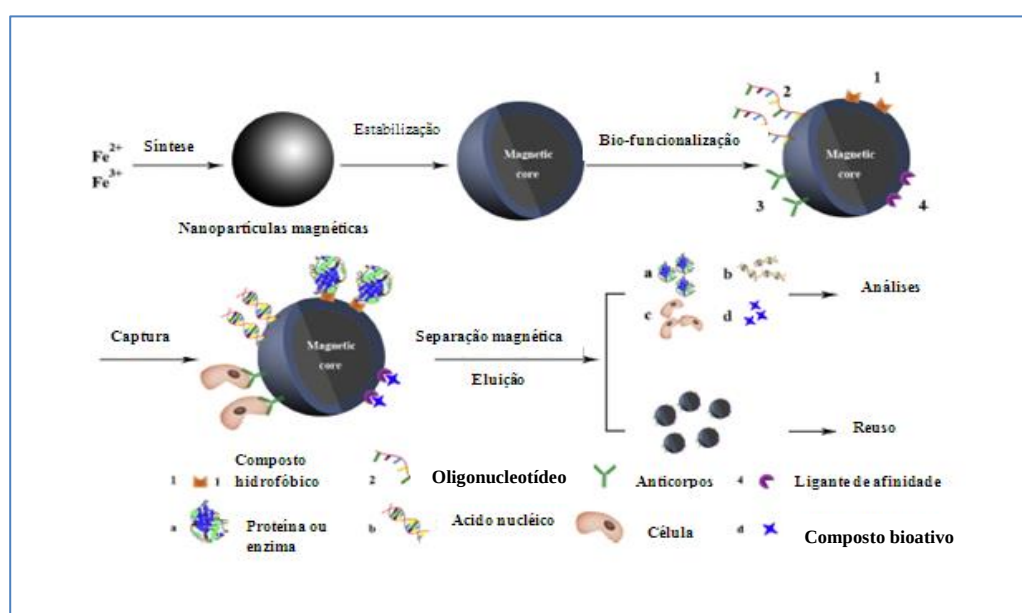


Figura 5. Procedimento geral de separação magnética com partículas magnéticas estabilizadas e bio-funcionalizadas. *Reproduzido e adaptado de He et al., 2014*

2.6 Levana como polímero de revestimento de nanopartículas magnéticas

A levana é um biopolímero formado por resíduos de D-frutose unidos por ligações β -(2 $\rightarrow$ 6), com ramificações ocasionais β -(2 $\rightarrow$ 1) que pode ser encontrado em muitas plantas e produtos microbianos. Elas são levorrotatórias, amorfas ou microcristalinas, de solubilidade

variada em água fria, muito solúvel em água quente e insolúvel em álcool etílico absoluto (HAN, 1990).

A levana é um dos poucos polímeros naturais que existem na forma de furanose, característica esta que dá maior flexibilidade à molécula, influenciando a conformação final destas em solução (MARCHESSAULT et al., 1980).

Particularmente, levanas isoladas de microorganismos tem ganhado grande importância comercial devido às suas aplicações no ramo industrial, tanto na área alimentícia em adoçantes; na área cosmética; como na área farmacêutica, como agente antitumoral e hipocolesterolêmico (LEIBOVICI; STARK, 1985; YAMAMOTO et al., 2000).

Levanas microbianas são produzidas por reação de transfrutossilação pela ação da enzima levansacarose (β -2,6 frutano: D-glicose-frutossiltransferase, EC 2.4.1.10) em substratos de sacarose, podendo ser produzidas por vários microorganismos, incluindo *Zymomonas mobilis*, *Bacillus subtilis* e *Erwinia herbicola* (CORRIGAN; ROBYT, 1979; DEDONDER, 1966; OLIVEIRA et al., 2007; SHIH et al., 2010; BLAKE et al., 1982).

Na literatura é descrita a utilização destes polímeros isolados a partir de cepas de *Zymomonas mobilis* em revestimento de partículas magnéticas. Em trabalhos prévios, o revestimento dos compósitos magnéticos por levana foi crucial para a imobilização de tripsina e também para a purificação de lectinas como a Cramoll e Con A. Isto sugere a possibilidade de emprego destes polímeros como revestimento de nanopartículas magnéticas, envolvendo a aplicação de levanas em trabalhos de fins biotecnológicos, que dizem respeito tanto à imobilização de enzimas importantes comercialmente, como na purificação de biomoléculas aplicáveis na área da saúde (MACIEL et al, 2012; ANGELI et al., 2009).

3. REFERÊNCIAS

AGUILAR-ARTEAGA, K., RODRIGUEZ, J.A., BARRADO, E. Magnetic solids in analytical chemistry: a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 674, p. 157–165, 2010.

ALENCAR, N. M. N.; ASSREUY, A. M. S.; ALENCAR, V. B. M.; et al. The galactose-binding lectin from Vatairea macrocarpa seeds induces in vivo neutrophil migration by indirect mechanism. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 35, p. 1674–1681, 2003.

ALENCAR, N. M. N., ASSREUY, A. M. S., CRIDDLE, D. N., SOUZA, E. P., SOARES, P. M. G., HAVT, A., et al. Vatairea macrocarpa lectin induces paw edema with leukocyte infiltration. **Protein and Peptide Letters**, v. 11(2), p. 195–200, 2004.

ALENCAR NMN, CAVALCANTE CF, VASCONCELOS MP, LEITE KB, ARAGÃO KS, ASSREUY AMS, NOGUEIRA NAP, CAVADA BS, VALE MR. Antiinflammatory and antimicrobial effect of lectin from Lonchocarpus sericeus seeds in an experimental model of infectious peritonitis. **J Pharm Pharmacol**, v. 57, p. 912–922, 2005a.

ALENCAR, V. B. M.; ALENCAR, N. M. N.; ASSREUY, A. M. S.; et al. Pro-inflammatory effect of Arum maculatum lectin and role of resident cells. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 37, p. 1805–1814, 2005b.

ALENCAR, N. M. N.; ASSREUY, A. M. S.; HAVT, A.; et al. Vatairea macrocarpa (Leguminosae) lectin activates cultured macrophages to release chemotactic mediators. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 374, p. 275–282, 2007.

ALVES, A.; FERREIRA, T.; SILVEIRA, C.; et al. Lectin from Crataeva tapia Bark Improves Tissue Damages and Plasma Hyperglycemia in Alloxan-Induced Diabetic Mice. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 12–14, 2013.

ANDRADE, C. A. S.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B.; NASCIMENTO, S. C.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. Antitumor activity of Cratylia mollis lectin encapsulated into liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 278, p. 435–445, 2004.

ANDRADE, C. A. S.; OLIVEIRA, M. D. L.; MELO, C. P. DE; et al. Diagnosis of dengue infection using a modified gold electrode with hybrid organic-inorganic nanocomposite and

Bauhinia monandra lectin. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 362, n. 2, p. 517–523, 2011a.

ANDRADE, C. A. S.; OLIVEIRA, H. P. DE; OLIVEIRA, M. D. L.; et al. Protein unfolding studied by fluorescence methods and electrical impedance spectroscopy: The cases of *Cratylia mollis* and Concanavalin A. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 88, n. 1, p. 100–107, 2011b.

ANGELI, R.; PAZ, N. V. N. DA; MACIEL, J. C.; et al. Ferromagnetic levan composite: An affinity matrix to purify lectin. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2009, 2009.

AGRAWAL B.B.L., GOLDSTEIN I.J. Specific binding of concanavalin A to cross-linked dextran gels. **Biochem. J.** v.96 p. 23–25, 1965.

ARANDA-SOUSA M.A., ROSSATO, F.A, COSTA A.P., FIGUEIRA T.R., et al. A lectin from *Bothrops leucurus* snake venom raises cytosolic calcium levels and promotes B16-F10 melanoma necrotic cell death via mitochondrial permeability transition. **Toxicon**, v. 82, p. 97-103, 2014.

ARAÚJO, R. M. S. DE; FERREIRA, R. D. S.; NAPOLEÃO, T. H.; et al. Crataeva tapia bark lectin is an affinity adsorbent and insecticidal agent. **Plant Science**, v. 183, p. 20–26, 2012

ARFAOUI-TOUMI A, KRIA-BEN MAHMOUD L, BEN HMIDA M, KHALFALLAH MT, REGAYA-MZABI S, BOURAOUI S: Implication of the Galectin-3 in colorectal cancer development (about 325 Tunisian patients). **Bull Cancer**, v. 97, p.1-8, 2010.

ANSARI S.A.; HUSAIN Q. Lactose hydrolysis from milk/whey in batch and continuous processes by concanavalin A-Celite 545 immobilized *Aspergillus oryzae* β -galactosidase. **Food and bioproducts processing**, v. 90, p. 351–359, 2012.

ASSREUY, A. M., MARTINS, G. J., MOREIRA, M. E. F., BRITO, G. A.C, CAVADA, B. S., RIBEIRO, R. A., et al. Prevention of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis by glucosemannose binding plant lectins. **The Journal of Urology**, v. 161, p.1988–1993, 1999.

ASSREUY, A. M. S., SHIBUYA, M. D., MARTINS, G. J., SOUZA, M. L. P., CAVADA, B. S., MOREIRA, R. A., et al. (1997). Antiinflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from brazilian beans. **Mediators of Inflammation**, v.6, p. 201–210, 1997.

AVELINO K.Y.P.S., ANDRADE C.A.S., DE MELO C.P., NOGUEIRA M.L., CORREIA M.T.S., COELHO L.C.B.B., OLIVEIRA M.D.L. Biosensor based on hybrid nanocomposite and CramoLL lectin for detection of dengue glycoproteins in real samples. **Synthetic Metals**, v. 194, p. 102–108, 2014.

BABES L. DENIZOT B., TANGUY G., JEUNE J.J.L, JALLET P. Synthesis of iron oxide nanoparticles used as MRI contrast agents: a parametric study. **J. Colloid Interface Sci**, v. 212, p. 474–482, 1999.

BAHARA T; TUNCEL A. Concanavalin A carrying reactive beads for yeast invertase purification. **Reactive & Functional Polymers**, v. 61, p.203–210, 2004.

BHAT GG, SHETTY KN, NAGRE NN, NEEKHRA VV, LINGARAJU S, BHAT RS, INAMDAR SR, SUGUNA K, SWAMY BM. Purification, characterization and molecular cloning of a monocot mannose binding lectin from *Remusatia vivipara* with nematocidal activity. **Glycoconj J**, v. 27, p.309–320, 2010.

BLAKE JD, CLARK ML, JANSSON PE, MCNEIL KE, “Fructan from *Erwinia herbicola*,” **J. Bacteriol**, v. 151, p.1595–1597, 1982.

CAI J., GUO J., JI M.L., YANG W.L., WANG C.C., FU S.K. Preparation and characterization of multiresponsive polymer composite microspheres with core–shell structure. **Colloid Polym Sci**, v. 285, p. 1607–15, 2007.

CAMMARATA M., PARISIA M.G., BENENATIA G., VASTA G.R., PARRINELLO N.A. Rhamnose-binding lectin from sea bass (*Dicentrarchus labrax*) plasma agglutinates and opsonizes pathogenic bacteria. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 44, p. 332–340, 2014.

CASTANHEIRA LE, NUNES D.C.A, CARDOSO T.M., SANTOS P.S, GOULART L.R., RODRIGUES R.S., RICHARDSON M., BORGES M.H., YONEYAMA K.A.G, RODRIGUES V.M. Biochemical and functional characterization of a C-type lectin (BpLec) from *Bothrops pauloensis* snake venom. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 54, p. 57–64, 2013.

CAY, T. Immunohistochemical expression of galectin-3 in cancer: a review of the literature. **Turkish Journal of Pathology**, v. 28, n. 1, p. 1, 2012.

CHARUNGCHITRAKA S, PETSOMA A, SANGVANICHA P, KARNCHANATAT A. Antifungal and antibacterial activities of lectin from the seeds of *Archidendron jiringa* Nielsen. **Food Chemistry**, v.126, p. 1025–1032 2011.

CHANG, C. P.; YANG, M. C.; LIU, H. S.; LIN, Y. S.; LEI, H. Y. Concanavalin A induces autophagy in hepatoma cells and has a therapeutic effect in a murine in situ hepatoma model. **Hepatology**, v. 45, n. Atg 5, p. 286–296, 2007.

CHEN Y.H., LIU Y.Y., LIN R.H., YEN F.S. Characterization of magnetic poly (methyl methacrylate) microspheres prepared by the modified suspension polymerization. **J Appl Polym Sci**, v108, p.583–90, 2008.

CHEN H.M., LIU S.S., YANG H.L., MAO Y., DENG C.H., ZHANG X.M., YANG P.Y. Selective separation and enrichment of peptides for MS analysis using the microspheres composed of Fe₃O₄@nSiO₂ core and perpendicularly aligned mesoporous SiO₂ shell. **Proteomics** v.10, p. 930–939, 2010.

CHEN, L., WANG, T., TONG, J. Application of derivatized magnetic materials to the separation and the preconcentration of pollutants in water samples. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, p. 1095–1108, 2011.

CHIU CG, STRUGNELL SS, GRIFFITH OL, JONES SJ, GOWN AM, WALKER B, NABI IR, WISEMAN SM. Diagnostic utility of galectin-3 in thyroid cancer. **Am J Pathol**, v. 176, p. 2067-2081, 2010.

CHOMOUCKA, J.; DRBOHLAVOVA, J.; HUSKA, D.; et al. Magnetic nanoparticles and targeted drug delivering. **Pharmacological Research**, v. 62, n. 2, p. 144–149, 2010.

COLOMBO M., CARREGAL-ROMERO S., CASULA M.F., GUTIÉRREZ L., M.P. MORALES M.P., BÖHM I.B., HEVERHAGEN J.T., PROSPERI D., PARAK W.J. Biological applications of magnetic nanoparticle. **Chem. Soc. Rev.** 41 (2012) 4306–4334

CORCHERO J, VILLAVERDE A. Biomedical applications of distally controlled magnetic nanoparticles. **Trends Biotechnol** 2009;27:468–76

CORNELL R.M., SCHWERTMANN U. **The Iron Oxides. Structure, Properties, Reaction, Occurrence and Uses**, VCH, Germany and USA, 1996.

CORNELL, R.M., SCHWERTMANN, U. **The iron oxides: structure, properties, reactions, occurrences and uses**. Weinheim: Wiley-VCH, 2003.

CORREIA, M. T. S.; 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**, v. 55, p. 261–273, 1995.

CORRIGAN, A.; ROBYT, J. F. Nature of the fructan of *Streptomyces* mutant OMZ176. **Infection and Immunity**, v. 26, p. 386–389, 1979.

DE MEJÍA E.G., PRISECARU V.I.. Lectins as bioactive plant proteins: a potential in cancer treatment. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v.45, p. 425–45, 2005.

DEDONDER, R. Levansucrase from *Bacillus subtilis*. **Methods in Enzymology**, v. 8, p. 500–505, 1966.

DRBOHLAVOVA J, HRDY R, ADAM V, KIZEK R, SCHNEEWEISS O, HUBALEK J. Preparation and properties of various magnetic nanoparticles. **Sensors**;v. 9, p.2352–62, 2009.

DYAL A., LOOS K., NOTO M., CHANG S.W, SPAGNOLI C., SHAFI K., ULMAN A., COWMAN M.,GROSS R.A. Activity of *Candida rugosa* lipase immobilized on gamma-Fe₂O₃ magnetic nanoparticles. **J. Am. Chem. Soc**, v.125, p. 1684–1685, 2003.

EASO, S. L.; MOHANAN, P. V. Dextran stabilized iron oxide nanoparticles: Synthesis, characterization and in vitro studies. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 1, p. 726–732, 2013.

EDELMAN, G. M.; CUNNINGHAM, B. A; REEKE, G. N.; et al. The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 69, n. 9, p. 2580–2584, 1972.

FARAMARZI M.A; SADIGHI A. Insights into biogenic and chemical production of inorganic nanomaterials and nanostructures. **Adv. Colloid Interface Science**, v. 189–190, p. 1–20, 2013.

FITCHES E., WOODHOUSE S.D., EDWARDS J.P, GATEHOUSE J.A. In vitro and in vivo binding of snowdrop (*Galanthus nivalis* agglutinin; GNA) and jackbean (*Canavalia ensiformis*; Con A) lectins within tomato moth (*Lacanobia oleracea*) larvae; mechanisms of insecticidal action. **Journal of Insect Physiology**, v.47, p. 777-787, 2001.

FU, L.-L.; ZHOU, C.-C.; YAO, S.; et al. Plant lectins: Targeting programmed cell death pathways as antitumor agents. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 43, n. 10, p. 1442–1449, 2011.

GAGNON P., TOH P., LEE J. High productivity purification of immunoglobulin G monoclonal antibodies on starch-coated magnetic nanoparticles by steric exclusion of polyethylene glycol. **Journal of Chromatography A**, v. 1324, p.171–180, 2014.

GAO W., SUN Y., CHEN S., ZHANG J., KANG J., WANG, Y.,WANG H., XIA G., LIU Q., KANG Y. Mushroom lectin enhanced immunogenicity of HBV DNA vaccine in C57BL/6 and HBsAg-transgenic mice. **Vaccine**, v. 31, p. 2273–2280, 2013.

GAÑÁN J., PÉREZ-QUINTANILLA D., MORANTE-ZARCERO S., SIERRA I., Comparison of different mesoporous silicas for off-line solid phase extraction of 17-estradiol from waters and its determination by HPLC–DAD. **J. Hazard. Mater**, v 260, p.609–617, 2013

GARRISON AR, Giomarelli B.G., Lear-Rooney C.M, Carrie J. Saucedo C.J., et al. The cyanobacterial lectin scytovirin displays potent in vitro and in vivo activity against Zaire Ebola virus. **Antiviral Res**, v. 112, p. 1-7, 2014.

GHASEMI, S.; HEIDARY, M.; FARAMARZI, M. A.; HABIBI, Z. Immobilization of lipase on Fe₃O₄/ZnO core/shell magnetic nanoparticles and catalysis of Michael-type addition to chalcone derivatives. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 100, p. 121–128, 2014.

GOMES B.S. SIQUEIRA A.B, MAIA R.C, GIAMPAOLI V., TEIXEIRA, H.; VASSILIEPE, F.; ARRUDA, S.; SANTIAGO, K.; LIMA, A. N., SOUZA-MOTTA C.M, CAVADA B.S., PORTO A.L. Antifungal activity of lectins against yeast of vaginal secretion. **Brazilian Journal of Microbiology**. p.770-778, 2012

GOLDSTEIN I.J, HOLLERMAN C.E., MERRICK J.M. Protein-carbohydrate interaction I. The interaction of polysaccharides with Concanavalin A. **Biochimica et Biophysica. acta**,v. 97, p.68-76, 1965.

GORDIJO, C. R., SHUHENDLER, A. J., & WU, X. Y. (2010).Glucose-responsive bioinorganicnanohybrid membrane for self-regulated insulin release.**Advanced Functional Materials**,v. 20, p.1404–1412, 2010.

GUO W; RUCKENSTEIN E. A new matrix for membrane affinity chromatography and its application to the purification of concanavalin A. **Journal of Membrane Science**, v. 182, p. 227–234, 2001.

GUPTA A.K., GUPTA M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. **Biomaterials**, v. 26, p. 3995–4021, 2005.

HAN, Y. W. Microbial levan. **Advances in Applied Microbiology**, v. 35, p. 171–194, 1990

HE J.C., ZHOU F.Q., MAO Y.F., TANG Z.N., LI C.Y. Pre concentration of trace cad-mium (II) and copper (II) in environmental water using a column packed with modified silica gel–chitosan prior to flame atomic absorption spectrometry determination, **Anal. Lett**, v.46, p.1430–1441, 2013.

HE, J.; HUANG, M.; WANG, D.; ZHANG, Z.; LI, G. Magnetic separation techniques in sample preparation for biological analysis: A review. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 101, p. 84–101, 2014.

HE S., SHI J., WALID E., ZHANG H, MA Y, XUE S.J. Reverse micellar extraction of lectin from black turtle bean (*Phaseolus vulgaris*): Optimisation of extraction conditions by response surface methodology. **Food Chemistry**, v.166, p. 93–100, 2015.

HONG, S. A.; KWON, J.; KIM, D.; YANG, S. Biosensors and Bioelectronics A rapid , sensitive and selective electrochemical biosensor with concanavalin A for the preemptive detection of norovirus. **Biosensors and Bioelectronic**, v. 64, p. 338–344, 2015.

HOU X.L, WU Y.L., YANG T., DU X.D. Multi-walled carbon nanotubes-dispersivesolid-phase extraction combined with liquid chromatography–tandem massspectrometry for the analysis of 18 sulfonamides in pork. **J. Chromatogr**, v. B929, p.107–115, 2013.

HU FX, NEOH KG, KANG ET. Synthesis and in vitro anti-cancer evaluation of tamoxifen-loaded magnetite/PLLA composite nanoparticles. **Biomaterials**, v. 27, p. 5725–33, 2006.

HUANG CX, HOU YH, LIU YS. Expression of galectin-3 correlates with apoptosis in pituitary adenoma cells. **Neurosci Bull**, v. 24, p.34-38, 2008.

HUANG W-C, HU S-H, LIU K-H, CHEN S-Y, LIU D-M. A flexible drug delivery chip for the magnetically-controlled release of anti-epileptic drugs. **J Controlled Release** v.139, p. 221–228, 2009.

HUBER, D.L. Synthesis, properties, and applications of iron nanoparticles. **Small**, v. 1, p. 482–501, 2005.

IMAMICHI Y, YOKOYAMA Y. Purification, characterization and cDNA cloning of a novel lectin from the jellyfish *Nemopilemanomurai*. **Comp BiochemPhysiol B BiochemMolBiol**, v. 156, p. 12– 18, 2010.

ISLAM M.S., KUSUMOTO, YOSHIHUMI; KURAWAKI, JUNICHI; ABDULLA-AL-MAMUN, MD; MANAKA, HIROTAKA. A comparative study on heat dissipation, morphological and magnetic properties of hyperthermia suitable nanoparticles prepared by co-precipitation and hydrothermal methods, **Bull.Mater.Sci.**, v. 35(7), p. 1047–1053, 2012.

JIANG Y., GUO C., XIA H., MAHMOOD I., LIU C., LIU H. MOL J. Magnetic nanoparticles supported ionic liquids for lipase immobilization: Enzyme activity in catalyzing esterification. **Catal. B: Enzym**, v. 58, p. 103–109, 2009.

KANG, Y.S., RISBUD, S., RABOLT, J.F., STROEVE, P. Synthesis and characterization of nanometer-size Fe₃O₄ and gamma-Fe₂O₃ particles. **Chemistry of Materials**, v. 8, p. 2209–2211, 1996

KIM, J. J.; PARK, K. (2001). Modulated insulin delivery from glucose-sensitive hydrogels dosage forms. **Journal of Controlled Release**, v. 77(1–2), p. 39–47, 2001.

KHAN, T. A.; NAEEM, A. An alternate high yielding inexpensive procedure for the purification of concanavalin A. **Biology and Medicine**, v. 3, n. 2, p. 250–259, 2011.

KHOSHNEVISAN, K.; BORDBAR, A. K.; ZARE, D.; et al. Immobilization of cellulase enzyme on superparamagnetic nanoparticles and determination of its activity and stability. **Chemical Engineering Journal**, v. 171, n. 2, p. 669–673, 2011.

KUBOI S., ISHIMARU T., TAMADA S, BERNARD E.M.; KUBOI S.; PERLIN D.S.; ARMSTRONG D. Molecular characterization of AfuFleA, an l-fucose-specific lectin from *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 19, p. 1021–1028, 2013.

KUMAR, K. K., CHANDRA, K. L. P., SUMANTHI, J., REDDY, G. S., SHEKAR, P. C., & REDDY, B. V. R. **Journal of Orofacial Sciences**, v. 4, p.20–25, 2012.

LAM, S. K.; NG, T. B. First report of a haemagglutinin-induced apoptotic pathway in breast cancer cells. **Bioscience reports**, v. 30, p. 307–317, 2010.

LAM, S. K.; NG, T. B. Lectins: Production and practical applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, p. 45–55, 2011.

LEE, Y.-C.; BLOCK, G.; CHEN, H.; et al. One-step isolation of plasma membrane proteins using magnetic beads with immobilized concanavalin A. **Protein expression and purification**, v. 62, n. 2, p. 223–229, 2008.

LEE JH, ZHANG X, SHIN BK, LEE ES, KIM I: Mac-2 binding protein and galectin-3 expression in mucinous tumours of the ovary: an annealing control primer system and immunohistochemical study. **Pathology**, v. 41, p. 229-233, 2009.

LEI H.Y., CHANG C.P., Induction of autophagy by concanavalin A and its application in anti-tumor therapy, **Autophagy**, v. 3, p. 402–404, 2007.

LEI, H.-Y.; CHANG, C.-P. Lectin of Concanavalin A as an anti-hepatoma therapeutic agent. **Journal of biomedical science**, v. 16, p. 10, 2009.

LEIBOVICI, J.; STARK, Y.. Increase in cell permeability to a cytotoxic agent by the polysaccharide levan. **Cellular and Molecular Biology**, v. 31, p. 337–341, 1985.

LI C.Y., XU H.L., LIU B., BAO J.K., Concanavalin A, from an old protein to novel candidate anti-neoplastic drug, **Curr. Mol. Pharmacol**, v. 5, p. 123–128, 2010.

LI W-W, YU J-Y, XU H-L, BAO J-K. Concanavalin A: A potential anti-neoplastic agent targeting apoptosis, autophagy and anti-angiogenesis for cancer therapeutics. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 414, p.282–286, 2011.

LI Y., ZHANG X.M., DENG C.H. Functionalized magnetic nanoparticles for sample preparation in proteomics and peptidomics analysis, **Chem. Soc. Rev.**, v. 42, p. 8517–8539, 2013.

LIMA, V. L. M.; CORREIA, M. T. S.; CECHINEL, Y. M. N.; et al. Immobilized Cratylia mollis lectin as a potential matrix to isolate plasma glycoproteins, including lecithin-cholesterol acyltransferase. **Carbohydrate Polymers**, v. 33, p. 27–32, 1997.

LIMA, A. L. R. DE; CAVALCANTI, C. C. B. CORREIA, M. T. D. S.; et al. Histochemical evaluation of human prostatic tissues with cratylia mollis seed lectin. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, 2010.

LIMA, LR.; LIMA, A.; BEZERRA, M. F.; et al. Glycophenotype Evaluation in Cutaneous Tumors Using Lectins Labeled with Acridinium Ester. **Disease Markers**, v. 35, n. 3, p. 149–154, 2013.

LIU J.B., LI C.Y., BIAN H.J, MIN M.W., CHEN L.F., BAO J.K., Antiproliferative activity and apoptosis-inducing mechanism of Concanavalin A on human melanoma A375 cells, *Arch. Biochem. Biophys.* 482 (2009) 1–6.

LIU B, BIAN HJ, BAO JK. Plant lectins: potential antineoplastic drugs from bench to clinic. **Cancer Lett**, v.287, p:1–12, 2010a.

LU, A.H., SALABAS, E.L., SCHUTH, F. Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v.46, p. 1222–1244, 2007

LUNA, D. M. N.; OLIVEIRA, M. D. L.; NOGUEIRA, M. L.; ANDRADE, C. A. S. Biosensor based on lectin and lipid membranes for detection of serum glycoproteins in infected patients with dengue. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 180, p. 7–14, 2014.

LUZ, L. D. A.; SILVA, M. C. C.; FERREIRA, R. D. S.; et al. Structural characterization of coagulant Moringa oleifera Lectin and its effect on hemostatic parameters. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 58, p. 31–38, 2013.

MACIEL, E. V. M.; ARAÚJO-FILHO, V. S.; NAKAZAWA, M.; et al. Mitogenic activity of Cratylia mollis lectin on human lymphocytes. **Biologicals**, v. 32, p. 57–60, 2004.

MACIEL, J. C.; ANDRAD, P. L.; NERI, D. F. M.; et al. Preparation and characterization of magnetic levan particles as matrix for trypsin immobilization. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 324, p. 1312–1316, 2012.

MALTAS, E.; OZMEN, M.; VURAL, H. C.; YILDIZ, S.; ERSOZ, M. Immobilization of albumin on magnetite nanoparticles. **Materials Letters**, v. 65, n. 23-24, p. 3499–3501, 2011.

MARCHESSAULT, R.H., BLEHA, T., DESLENDES, Y., REVOL, J.T. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 58, p. 2415–2417, 1980.

MATEO C., PALOMO J.M., FERNANDEZ-LORENTE G., GUIBAN J.M., FERNANDEZ-LAFUENTE R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme Microb. Technol**, v. 40, p. 1451–1463, 2007.

MATTIASSEN B.; RAMSTORP M. Ultrafiltration affinity purification isolation of Concanavalin A from seeds of Canavalia ensiformis. **Journal of Chromatography**, v. 283 p. 323-330, 1984.

MELO, C. M. L. DE; CASTRO, M. C. A. B. DE; OLIVEIRA, A. P. DE; et al. Immunomodulatory response of Cramoll 1,4 lectin on experimental lymphocytes. **Phytotherapy Research**, v. 24, n. June, p. 1631–1636, 2010.

MELO, C. M. L. DE; MELO, H.; CORREIA, M. T. S.; et al. Mitogenic Response and Cytokine Production Induced by Cramoll 1,4 Lectin in Splenocytes of Inoculated Mice. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 73, p. 112–121, 2011a.

MELO, C. M. L. DE; LIMA, A. L. R. DE; BELTRÃO, E. I. C.; et al. Potential effects of Cramoll 1,4 lectin on murine Schistosomiasis mansoni. **Acta Tropica**, v. 118, n. 2, p. 152–158, 2011b.

MELO, C. M. L. DE; PORTO, C. S.; MELO, M. R.; et al. Healing activity induced by Cramoll 1,4 lectin in healthy and immunocompromised mice. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 408, n. 1-2, p. 113–119, 2011c.

MIYOSHI N., KOYAMA Y., KATSUNO Y., HAYAKAWA S., MITA T., OHTA T., et al. Apoptosis induction associated with cell cycle dysregulation by rice bran agglutinin. **J Biochem**, v.130, p.799–805, 2001.

MIKI, K., OGATA, S., MISUMI, Y., IKEHARA, Y., 1986. Carbohydrate structures of the third component of rat complement. Presence of both high-mannose and complex type oligosaccharide chains. **Biochem.J.** v. 240 (3), p. 691–698, 1986.

M. MORALES, et al., Surface and internal spin canting in γ -Fe₂O₃ nanoparticles, **Chem. Mater.**, v. 11(11), p.3058–3064, 1999.

NASCIMENTO, C. O.; SOARES, P. A G.; PORTO, T. S.; et al. Aqueous two-phase systems: New strategies for separation and purification of lectin from crude extract of *Cratylia mollis* seeds. **Separation and Purification Technology**, v. 116, p. 154–161, 2013.

NAPOLÊÃO, T. H. Affinity Matrices of *Cratylia mollis* Seed Lectins for Isolation of Glycoproteins from Complex Protein Mixtures. **Appl Biochem Biotechnol**, p. 744–755, 2013.

OLIVEIRA M.R., SILVA R.S.F, BUZATO J.B., CELLIGOI M.A.P.C. Study of levan production by *Zymomonas mobilis* using regional low-cost carbohydrate sources. **Biochemical Engineering Journal** , v.37, p. 177–183, 2007.

OLIVEIRA, M. D. L.; ANDRADE, C. A S.; CORREIA, M. T. S.; et al. Impedimetric biosensor based on self-assembled hybrid cystein-gold nanoparticles and CramoLL lectin for bacterial lipopolysaccharide recognition. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 362, n. 1, p. 194–201, 2011a.

OLIVEIRA C.F.R., LUZ L.A., PAIVA P.M.G., COELHO L.C.B.B., MARANGONI S., MACEDO M.L.R., Evaluation of seed coagulant *Moringa oleifera* lectin (cMoL) as a bioinsecticidal tool with potential for the control of insects, **Process Biochem.** v. 46, p. 498–504, 2011b.

OLIVEIRA, M. D. L.; ANDRADE, C. A S.; CORREIA, M. T. S.; et al. Impedimetric biosensor based on self-assembled hybrid cystein-gold nanoparticles and CramoLL lectin for bacterial lipopolysaccharide recognition. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 362, n. 1, p. 194–201, 2011c.

OLIVEIRA, M. D. L.; NOGUEIRA, M. L.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B.; ANDRADE, C. A S. Detection of dengue virus serotypes on the surface of gold electrode based on Cratylia mollis lectin affinity. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 155, n. 2, p. 789–795, 2011d.

OLIVEIRA, P. S. S. DE; RÊGO, M. J. B. D. M.; SILVA, R. R. DA; et al. Cratylia mollis 1, 4 lectin: A new biotechnological tool in IL-6, IL-17A, IL-22, and IL-23 induction and generation of immunological memory. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. B. B. Purification and Partial Characterization of Two Lectin Isoforms from Cratylia mollis Mart . (Carnaratu Bean). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 36, n. 1, p. 0–5, 1992.

PAIVA, P. M. G.; SOUZA, A. F.; OLIVA, M. L. V; et al. Isolation of a trypsin inhibitor from Echinodorus paniculatus seeds by affinity chromatography on immobilized Cratylia mollis isolectins. **Bioresource Technology**, v. 88, p. 75–79, 2003.

PANEK, A.; PIETROW, O.; SYNOWIECKI, J.; FILIPKOWSKI, P. Immobilization on magnetic nanoparticles of the recombinant trehalose synthase from Deinococcus geothermalis. **Food and Bioproducts Processing**, v. 91, n. 4, p. 632–637, 2013.

PARASHAR U.K., SAXENA S.P., SRIVASTAVA A. Bio inspired synthesis of silver nanoparticles. **Dig. J. Nanomater Bios**, v.4(1), p.159- 166, 2009.

PEREIRA S.T; LIMA-RIBEIRO M.H.M.; SANTOS-OLIVEIRA R.; et al. Topical application effect of the isolectin hydrogel (Cramoll 1,4) on second-degree burns: Experimental model. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, 2012.

PEUMANS, W. J.; DAMME, E. J. M. VAN. **Plant lectins: Versatile proteins with important perspectives in biotechnology**. 1998.

POLIZZI K.M., BOMMARIUS A.S., BROERING J.M., CHAPARRO-RIGGERS J.F. Stability of Biocatalysts. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 11, p. 220–225, 2007.

QU, S.C., YANG, H.B., REN, D.W., KAN, S.H., ZOU, G.T., LI, D.M. Magnetite nanoparticles prepared by precipitation from partially reduced ferric chloride aqueous solutions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 215, p. 190–192, 1999.

RAMIMOGHADAM, D.; BAGHERI, S.; HAMID, S. B. A. Progress in electrochemical synthesis of magnetic iron oxide nanoparticles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 368, p. 207–229, 2014.

RATANAPO, S.; NGAMJUNYAPORN, W.; CHULAVATNATOL, M. Interaction of a mulberry leaf lectin with a phytopathogenic bacterium, *P. syringae* pv *mori*. **Plant Science**, v. 160, p. 739–744, 2001.

RICHARDS, A.B., KRAKOWSKA, S., DEXTER, L.B., SCHMID, H., WOLTERBEEK, A.P.M., WAALKENS-BERENDSEN, D.H. Trehalose: a review of properties, history of use and human tolerance and results of multiple safety studies. **Food Chem. Toxicol.**, v. 40, p. 871–898, 2002.

ROTHBART S, EMBER E.E., ELDIK R.V. Mechanistic studies on the oxidative degradation of Orange II by peracetic acid catalyzed by simple manganese (II) salts. Tuning the lifetime of the catalyst. **New J Chem**, v. 36, p. 732–48, 2012.

SÁ RA, SANTOS ND, DA SILVA CS, NAPOLEÃO TH, GOMES FS, CAVADA BS, COELHO LC, NAVARRO DM, BIEBER LW, PAIVA PM. Larvicidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* on *Aedes aegypti*. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, v. 149, p. 300–306, 2009.

SAUVION N., NARDON C., FEBVAY G., ANGHARAD M.R., GATEHOUSE A.M.R., RAHBÉ Y. Binding of the insecticidal lectin Concanavalin A in pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Harris) and induced effects on the structure of midgut epithelial cells. **Journal of Insect Physiology**, v. 50, p. 1137–1150, 2004.

SANTOS, A. C. O.; PEIXOTO, C. A.; COELHO, L. C. B. B. Ultrastructural analysis and immunocytochemical localization of isolectins in *Cratylia mollis* seeds. **Micron**, v. 35, p. 613–618, 2004.

SARAVANAKUMAR, T.; PALVANNAN, T.; KIM, D.; PARK, S. Optimized immobilization of peracetic acid producing recombinant acetyl xylan esterase on chitosan coated-Fe₃O₄ magnetic nanoparticles. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 11, p. 1920–1928, 2014.

SILVA, M. C. C.; SANTANA, L. A.; SILVA-LUCCA, R. A.; et al. Immobilized *Cratylia mollis* lectin: An affinity matrix to purify a soybean (*Glycine max*) seed protein with in vitro platelet antiaggregation and anticoagulant activities. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 1, p. 74–80, 2011.

SILVA, M. C. C.; SANTANA, L. A.; MENTELE, R.; et al. Purification, primary structure and potential functions of a novel lectin from *Bauhinia forficata* seeds. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 7, p. 1049–1059, 2012.

SILVA, J. S. L. DA; OLIVEIRA, M. D. L.; MELO, C. P. DE; ANDRADE, C. A. S. Impedimetric sensor of bacterial toxins based on mixed (Concanavalin A)/polyaniline films. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 117, p. 549–554, 2014.

SKAAT H.; MARGEL S. Synthesis of fluorescent-maghemite nanoparticles as multimodal imaging agents for amyloid-beta fibrils detection and removal by a magnetic field. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 386, p.645–9, 2009.

SHAO M.F., NING F.Y., ZHAO J.W., WEI M., EVANS D.G., DUAN X. Preparation of Fe₃O₄@SiO₂@layered double hydroxide core-shell microspheres for magnetic separation of proteins. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 134, p. 1071–1077, 2011.

SHARON N. Lectins: carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules. **J BiolChem**, v. 282, p. 2753–64, 2007.

SHARON N, LIS H. How proteins bind carbohydrates: lessons from legume lectins. **J Agric Food Chem**, v. 50, p. 6586–91, 2002.

SHIHA I-L, CHENA L-D, WUB J.Y. Levan production using *Bacillus subtilis* natto cells immobilized on alginate. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, p. 111–117, 2010.

SHINKAI M. Functional magnetic particles for medical application. **J Biosci Bioeng** v.94, p.606–13, 2002.

SHUBAYEV, V.I., PISANIC II, T.R., JIN, S. Magnetic nanoparticles for theragnostics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, p. 467–477, 2009

SOARES, P. A G.; NASCIMENTO, C. O.; PORTO, T. S.; et al. Purification of a lectin from *Canavalia ensiformis* using PEG-citrate aqueous two-phase system. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 879, n. 5-6, p. 457–460, 2011..

SOUZA, G. A. DE; OLIVEIRA, P. S. L.; ANA, C.; et al. Amino acid sequence and tertiary structure of *Cratylia mollis* seed lectin. **Glycobiology**, v. 13, n. 12, 2003.

SUMMER J.B, HOWELL S.F. Identification of Hemagglutinin of Jack Bean with Concanavalin A. **J. Bacteriol.** v. 32 ,p. 227–237, 1936..

TARTAJ P., MORALES M.P., GONZÁLEZ-CARREÑO T., VEINTEMILLAS-VERDAGUER S., SERNA C.J. Advances in magnetic nanoparticles for biotechnology applications, **J.Magn.Magn.Mater.**, v. 290, p.28–34, 2005.

TOH P.Y., YEAP S.P., KONG L.P., NG B.W., CHAN D.J.C., AHMAD A.L., LIM J.K. Magnetophoretic removal of microalgae from fishpond water: feasibility of high gradient and low gradient magnetic separation, **Chem. Eng. J**, v. 211–212 (211),p. 22–30, 2012.

TUCEK J., ZBORIL R., PETRIDIS D. Maghemite nanoparticles by view of Mossbauer spectroscopy. **J Nanosci Nanotechnol**, v. 6, p. 926–47, 2006.

Uyttendaele M., I. Hoorde I., Debevere J. The use of immuno-magnetic separation (IMS) as a tool in a sample preparation method for direct detection of *L. Monocytogenes* in cheese. **Int. J. Food Microbiol**, v. 54, p. 205–212, 2000.

UPADHYAY SK, SAURABH S, RAI P, SINGH R, CHANDRASHEKAR K, VERMAPC, SINGH PK, TULI R. SUMO fusion facilitates expression and purification of garlic leaf lectin but modifies some of its properties. **J Biotechnol**, v. 146, p. 1–8, 2010.

VAN DAMME EJM, LANNOO N, PEUMANS WJ. Plant lectins. **Adv Bot Res**, v.48, p.107–209, 2008.

VANDERLEI ES, PATOILLO K.K., LIMA N.A., LIMA A.P., RODRIGUES J.A, SILVA L.M., LIMA M.E., LIMA V., BENEVIDES N.M. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of lectin from the marine green alga *Caulerpa cupressoides*. **International Immunopharmacology**, v. 10, p. 1113-1118, 2010.

VEGA, N.; PÉREZ, G. Isolation and characterization of a *Salvia bogotensis* seed lectin specific for the Tn antigen. **Phytochemistry**, v. 67, p. 347-355, 2006.

VLČKOVÁ H., JANÁK J., GOTTVALD T., TREJTAR F., SOLICH P., NOVÁKOVÁ L., How to address the sample preparation of hydrophilic compounds: determination of entecavir in plasma and plasma ultrafiltrate with novel extraction sorbents, **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 88 337–344, 2014.

WEN, Z.; NIEMEYER, B. Preparation and characterization of PEGylated Concanavalin A for affinity chromatography with improved stability. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 879, n. 20, p. 1732–1740, 2011.

WILHEIM C., GAZEAU F., ROGER J., PONS N., SALIS M.L., PERZYNSKI R. Binding of biological effectors on magnetic nanoparticles measured by a magnetically induced transient birefringence experiment. **Phys. Rev.** v. 65 p. 31404–31409, 2002.

YAMAMOTO, Y., TAKAHASHI, Y., KAWANO, M., IIZUKA, M., MATSUMOTO, T., SAEKI, S., et al. (2000). Hypercholesterolemic effects of levan in rats. In K. Nishinari (Ed.), **Hydrocolloids Part II**, p. 399–400, 2000.

YANG L., NYALWIDHE L. J.O., GUO S., DRAKE R.R., SEMMES O.J. Targeted identification of metastasis-associated cell-surface sialoglycoproteins in prostate cancer, **Mol. Cell. Proteomics** 10 (2011) 1–16.

YANG, G.; CUI, T.; CHEN, Q.; MA, T.; LI, Z. Isolation and identification of native membrane glycoproteins from living cell by concanavalin A-magnetic particle conjugates. **Analytical Biochemistry**, v. 421, n. 1, p. 339–341, 2012.

YANG, P.; LI, X.; WANG, L. QI WU Q., CHEN Z., LIN X. Sandwich-type amperometric immunosensor for cancer biomarker based on signal amplification strategy of multiple enzyme-linked antibodies as probes modified with carbon nanotubes and concanavalin A. **Journal of Electroanalytical Chemistry** , v. 732, p. 38–45, 2014.

YAO Q, WU1 C-F, LUO P., XIANG X-C, LIU J-J, MOU L, BAO J-K. A new chitin-binding lectin from rhizome of *Setcreasea purpurea* with antifungal, antiviral and apoptosis-inducing activities. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1477–1485, 2010.

YIN, R.; TONG, Z.; YANG, D.; NIE, J. Glucose-responsive insulin delivery microhydrogels from methacrylated dextran/concanavalin A: Preparation and in vitro release study. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 1, p. 117–123, 2012.

YIN, R.; WANG, K.; DU, S.; et al. Design of genipin-crosslinked microgels from concanavalin A and glucosyloxyethyl acrylated chitosan for glucose-responsive insulin delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 103, p. 369–376, 2014.

ZBORIL R., MASHLAN M., PETRIDIS D. Iron(iii) oxides from thermal processesynthesis, structural and magnetic properties, Mossbauer spectroscopy characterization, and applications. **Chem Mater**, v.14, p. 969–82, 2002.

ZHANG X.F., WANG J., LI R.M., DAI Q.H., GAO R., LIU Q, ZHANG M.L., Preparation of Fe₃O₄@C@layered double hydroxide composite for magnetic separation of uranium. **Ind. Eng. Chem. Res**, v. 52, p.10152–10159, 2013a.

ZHANG L., ZHU X., JIAO D., SUN Y., SUN H. Efficient purification of His-tagged protein by superparamagnetic Fe₃O₄/Au-ANTA-Co₂ + nanoparticles. **Materials Science and Engineering: C**, v. 33, Issue 4, p. 1989–1992, 2013b.

ZHAO, J. K.; WANG, H. X.; NG, T. B. Purification and characterization of a novel lectin from the toxic wild mushroom *Inocybe umbrinella*. **Toxicon**, v. 53, n. 3, p. 360–366, 2009.

ZIEGLER-BOROWSKA, M.; CHEŁMINIAK, D.; SIÓDMIĄK, T.; et al. Synthesis of new chitosan coated magnetic nanoparticles with surface modified with long-distanced amino groups as a support for bioligands binding. **Materials Letters**, v. 132, p. 63–65, 2014.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Purificar lectinas a partir dos extratos brutos de sementes *Cratylia mollis* e *Canavalia ensiformis* através do emprego de nanopartículas magnéticas revestidas com levana como matriz de ligação.

4.2 Objetivos específicos

- a) Sintetizar nanopartículas magnéticas (MNPs) e MNPs em presença do polímero levana de *Erwinia herbicola*;
- b) Caracterizar as nanopartículas obtidas através das técnicas: Microscopia eletrônica de varredura, Microscopia eletrônica de transmissão e Análise de energia dispersiva de raios-X;
- c) Comparar as diferenças de superfície, tamanho e composição elementar obtidos entre nanopartículas magnéticas (MNPs), nanopartículas magnéticas revestidas por levana (MNPs-levana), e MNPs-levana após a incubação com extratos brutos;
- d) Utilizar MNPs-levana como suporte para ligação de lectinas a partir do extrato bruto de sementes de *C. mollis* e *C. ensiformis*;
- e) Comparar as lectinas isoladas através do emprego de MNPs-levana com lectinas convencionalmente purificadas a partir desses extratos, através das técnicas: atividade hemaglutinante, inibição da atividade hemaglutinante, dosagem de proteínas e SDS-PAGE;
- f) Avaliar a capacidade de reutilização das MNPs-levana através da observação do padrão de eluição de lectinas a partir desses suportes.

5. ARTIGO

THE USE OF NANOPARTICLES OF MAGNETITE/LEVAN COMPOSITE TO PURIFY LECTINS FROM SEED CRUDE EXTRACTS.

Manuscrito a ser submetido para publicação no periódico Acta Biomaterialia. Fator de impacto: 5.684

Daiane Laise da Silva¹, Mariana Paola Cabrera¹, Igor Teixeira Cavalcanti¹, Rafael José Ribeiro Padilha¹, Carlos Eduardo Sales da Silva², Maria Tereza dos Santos Correia², Luiz Bezerra de Carvalho Junior¹²

¹Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brasil

²Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brasil

*Corresponding author:

Luiz Bezerra de Carvalho Júnior

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA)

Universidade Federal de Pernambuco

Cidade Universitária, Recife – PE CEP 50670–901, Brazil

Telephone number: + 55-81-21268485/ Fax: +55-81-21268485

E-mail address: lbcj@hotmail.com.br

Abstract

This work describes the use of magnetic nanoparticles (MNPs) coated by levan (MNPs-levan) synthesized as purification matrix of lectins from *Cratylia mollis* (Cramoll) and *Canavalia ensiformis* (Con A) seeds crude extracts (CE). Both magnetic nanoparticles were synthesized by the co-precipitation method and were analyzed by SEM/EDX and TEM analyses. The MNPs showed smooth surfaces whereas MNPs-levan presented rough surfaces and MNPs-levan after incubation with the CE showed some spots on the surface suggesting the presence of anchored lectins. TEM analysis showed differences between the MNPs ($15\text{ nm} \pm 3\text{ nm} \times 12\text{ nm} \pm 3\text{ nm}$) and MNPs-levan ($23\text{ nm} \pm 5\text{ nm} \times 18\text{ nm} \pm 4\text{ nm}$) and homogeneous profile of aggregation and spherical shape. MNPs-levan also presented a core-shell structure due to the levan presence. EDX analysis performed showed higher peaks of C and O as follows: MNPs-levan-lectins > MNPs-levan > MNPs. The MNPs-levan after incubation with the crude extracts followed by washings with 0.15 M NaCl and 0.3M glucose yielded fractions containing lectins according to hemagglutinating activity and lectin hemagglutinating inhibition. The results of the fractions analyzed by SDS-PAGE suggest that monomers and dimers of Cramoll 1,4 and monomers, dimers and tetramers of Con A were purified. The same MNPs-levan preparation fourfold reused provides the same purification profiles. These magnetic nanoparticles for lectin purification presented the following advantages: simple and inexpensive synthesis, an efficient purification procedure based on magnetic field application in one only step, reuse and using seeds crude extracts.

Key words: magnetic nanoparticles; levan; purification matrix; lectins.

1. Introduction

The magnetic separation as solid phase extraction technique has been widely studied over the years and has advantages over other methods of biomolecules separation by engaging a gentle and non-destructive separation. The magnetic material used in those techniques has good compatibility, a large surface area for binding and is easily manipulated for their functionalization and may also be used in large scale and require less time for biomolecules purification/isolation [1,2,3,4]. The dimensions of magnetic nanoparticles (MNPs) give to these solids a larger surface area to be applied as a support for biomolecules binding such as peptides, enzymes, nucleic acids and antibodies. Moreover, these supports exhibit low toxicity and can be easily separated from a complex mixture due to its magnetic properties, and then reused [5,6,7].

The surface area of MNPs allowing greater loading molecules per particle have been involved in biomolecules binding studies as far as immobilization is concerned. This process leads improving stability, modulation of catalytic properties, increased activity, selectivity and reuse of enzymes and proteins [8,9,10]. They also can be used in bio-separation process in order to purify molecules as is already described by studies involving MNPs used for the purification of the His-tag protein (poly-histidine tag) and immunoglobulin G, with binding capacity of 74 mg/mg nanoparticles and average recovery of 98% /mg of MNPs, respectively [11, 12].

Lectins have been proposed in many applications: anti-proliferative activity of cancer cells; as histological tool for diagnosis; biosensors; controlled release of drugs etc. Their purification usually involves several procedures such as ammonium sulfate fractionation, affinity chromatography, ion exchange chromatography, size exclusion chromatography/gel filtration, reverse micellar extraction and aqueous two-phase system [13,14,15,16].

Seeds of species *Cratylia mollis* and *Canavalia ensiformis* are known to produce the lectins abbreviated as Cramoll and Con A, respectively. They are lectins binding glucose/mannose specifically and have been of great importance in biomedical and biotechnological areas [17,18,19].

Here it was investigated magnetic nanoparticles coated by levan (MNPs-levan) as lectin purification matrix. Crude extracts of *Canavalia ensiformis* and *Cratylia*

mollis were used for extraction of lectins (Cramoll and Con A, respectively) using only one step for purification. The MNPs-levan were analyzed by SEM/EDX and TEM in order to show differences in structure in comparison to MNPs (without levan) as well as their reuses.

2. Experimental

2.1 Materials

Cratylia mollis and *Canavalia ensiformis* mature seeds were kindly provided by Laboratório de Glicoproteínas (Departamento de Bioquímica-UFPE) and Instituto Agrônômico de Pernambuco, respectively. Levan purified from *Erwinia herbicola*, ferric chloride hexahydrate and ferrous chloride tetrahydrate were purchased from Sigma-Aldrich (USA). Ammonium hydroxide was supplied from Fmaia (Brazil) whereas BCA protein assay kit was from Thermo Scientific (USA). The full range rainbow recombinant protein molecular weight marker was purchased from GE Healthcare (UK). All other reagents were of analytical grade.

2.2 Synthesis of magnetic nanoparticles(MNPs)and magnetic nanoparticles coated with levan (MNPs-levan)

The synthesis of MNPs with or without the presence of levan was performed according to method of co-precipitation presented by Maciel et al. [20], with the following modifications: ions Fe^{3+} and Fe^{2+} that were present in solutions of $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.1M (5 ml) e $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.6 M (5 ml) were co-precipitated in 50 ml of 0.2% w/v levan(MNPs-levan) or in 50 ml of distilled water (MNPs). The mixture was maintained in constant magnetic stirring for 10 min, then ammonium hydroxide was added to achieve a pH of 10 and this new mixture was heated in ultrasonic bath at 50°C/30 min. The magnetic materials obtained were washed fifteen times with distilled water and recovered applying a magnetic field, then MNPs and MNPs-levan were dried at 50°C/12 hours and kept at 25 °C.

2.3 Matrix characterization

2.3.1 Electron microscopy

Scanning electron microscopy (SEM, EVO SL15-ZEISS) and transmission electron microscopy (TEM, TECHNAI G2 SPIRIT- 80 kV, USA), were used to examine the

morphology and size of magnetic materials. For image analysis by SEM, MNPs, MNPs-levan and MNPs-levan incubated with crude extracts were previously metalized with Au in a sputter coater (Q150T ES). TEM samples were prepared by dispersion in sodium acetate 0,1M, heating in a water bath at 50 °C/5 hours and ultrasonic bath at 50°C/15 min. The samples were placed in grids and dried at 25 °C.

2.3.2 Energy Dispersive X-Ray Analysis

EDX analysis was used to identify the elemental composition of MNPs, MNPs-levan, MNPs-levan after incubation with crude extracts, and levan from *Erwinia herbicola*. The EDX was performed by system INCA (Oxford Instruments) attached to SEM.

2.4 Lectin binding from crude extract of *C. mollis* and *C. ensiformis* seeds by MNPs-levan's utilization

2.4.1 Crude extract obtention

The crude extract (CE) of *C. mollis* or *C. ensiformis* mature seeds was obtained as follows: the seeds were crushed in presence of 0.15 M NaCl (10%w/v) and this mixture was kept under agitation for 16 h at 4 °C and then the mixture was filtered at 25 °C. The filtrate was subjected to centrifugation at 12.000-x g for 15 min at 4 °C and the supernatant (crude extract) used throughout this work [21].

2.4.2 Incubation of MNPs-levan with crude extract

The crude extracts at 10% of seeds of *C. mollis* and *C. ensiformis* were twofold diluted and 4 ml of this was incubated with MNPs-levan (100 mg) for 2 h at 5°C, under constant agitation. After incubation, the MNPs-levan were attracted during 1 min by a magnetic field (0.8 T) and the supernatant was recovered. Around 10 washes of MNPs-levan were performed (1 ml each) with 0.15 M NaCl to elute unspecific proteins, 15 washes with 1 ml of 0.3M glucose in order to elute the lectins attached to the MNPs-levan, and 5 washes with 1 ml of 1 M NaCl to detach any glycoprotein that has been trapped on nanocomposite. After each wash, the MNPs-levan were attracted by magnetic field, and the supernatant was collected, submitted to centrifugation (12.000 x g for 15 min at 4 °C) to subsequent analysis, including their absorbance at 280 nm. The MNPs recovered were reused three

times more with the same conditions described above. This procedure was performed according to Angeli et al. [22], except by MNPs-levan amount, number of washes, incubation temperature (5°C), and use of 1 M NaCl. The fractions 10-24 were pooled and subjected to dialysis in cut-off 3 kD membrane, after the pool was lyophilized for further analysis of Hemagglutinating activity (HA), hemagglutinating activity inhibition (HAI), SDS-PAGE and protein determination.

2.5 *Hemagglutinating Activity and Lectin Hemagglutinating Inhibition*

The determination of HA was performed in microtiter plates as follows: The lectin sample solutions (50 µl) were serially 2-fold diluted in 0.15 M NaCl, followed by the addition of a 50 µl suspension of New Zealand white rabbit erythrocytes treated with 2.5% (v/v) glutaraldehyde. After resting for 45 min, HA was expressed as inverse of the last dilution exhibiting hemagglutination [21]. HA inhibition was determined by twofold serial dilution of lectin preparations (50 µl) in 50 µl of 200 mM fructose or glucose solutions, followed by 15 minutes incubation and addition of erythrocyte suspension. The HAI titer was obtained by the HA establishment after 45 minutes [22].

2.6 *Protein Determination*

The protein content of crude extracts was carried out by Lowry et al. [23] using bovine serum albumin (BSA) as standard, at a range of 100–600 µg/ml and absorbance reading at 720 nm. Recovered protein content of washes 10-24 from MNPs-levan was performed as determined by the BCA (bicinchoninic acid) method of Smith et al. [24], using absorbance reading at 570 nm and BSA as standard, at a range of 5–200 µg/ml, according to the protocol established in the BCA Protein Assay KIT (Thermo Scientific). Absorbance at 280 nm was used to determine the relative concentration of eluted fractions.

2.7 *SDS-PAGE*

Polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulphate (SDS-PAGE) was performed in β-mercaptoethanol presence, on 4% (w/v) stacking gel and 12.5% (w/v) separating gel. This method was done according to Laemmli [25]. Polypeptide bands of lectin and standards formed by mixture of individually colored proteins of defined size from GE Healthcare (UK) (ranging 12 kDa - 225 kDa) were stained with Coomassie

Brilliant Blue and when necessary silver staining was used according to Shevchenko et al.[26].

2.8 Statistical analysis

Software Microsoft Office Excel (Microsoft Corporation, USA) was used for the statistical analysis and data were expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD).

3. Results

3.1 Preparation, size, morphology and composition of the magnetic nanoparticles

The MNPs and MNPs-levan obtained by the co-precipitation process in alkaline aqueous medium showed dense aspect, black color and magnetic power regardless of the variation in composition. SEM images (Fig 1) reveal that there are differences between nanoparticles surfaces. MNPs formed only by magnetite presented themselves in form of large conglomerates with smooth surface and some small aggregates in their surfaces with aspects of irregular spheres as shown in Fig 1 (A, B). Conglomerates of MNPs-levan however, presented in your major part wide distribution of irregular spheres, with aspect of rough surface, what can be observed in Fig 1(C, D). The MNPs-levan after incubation with crude extracts show rough surfaces too, but some spots with flat aspects are present (Fig 1 (E, F). All nanoparticles showed no porosity by SEM analysis.

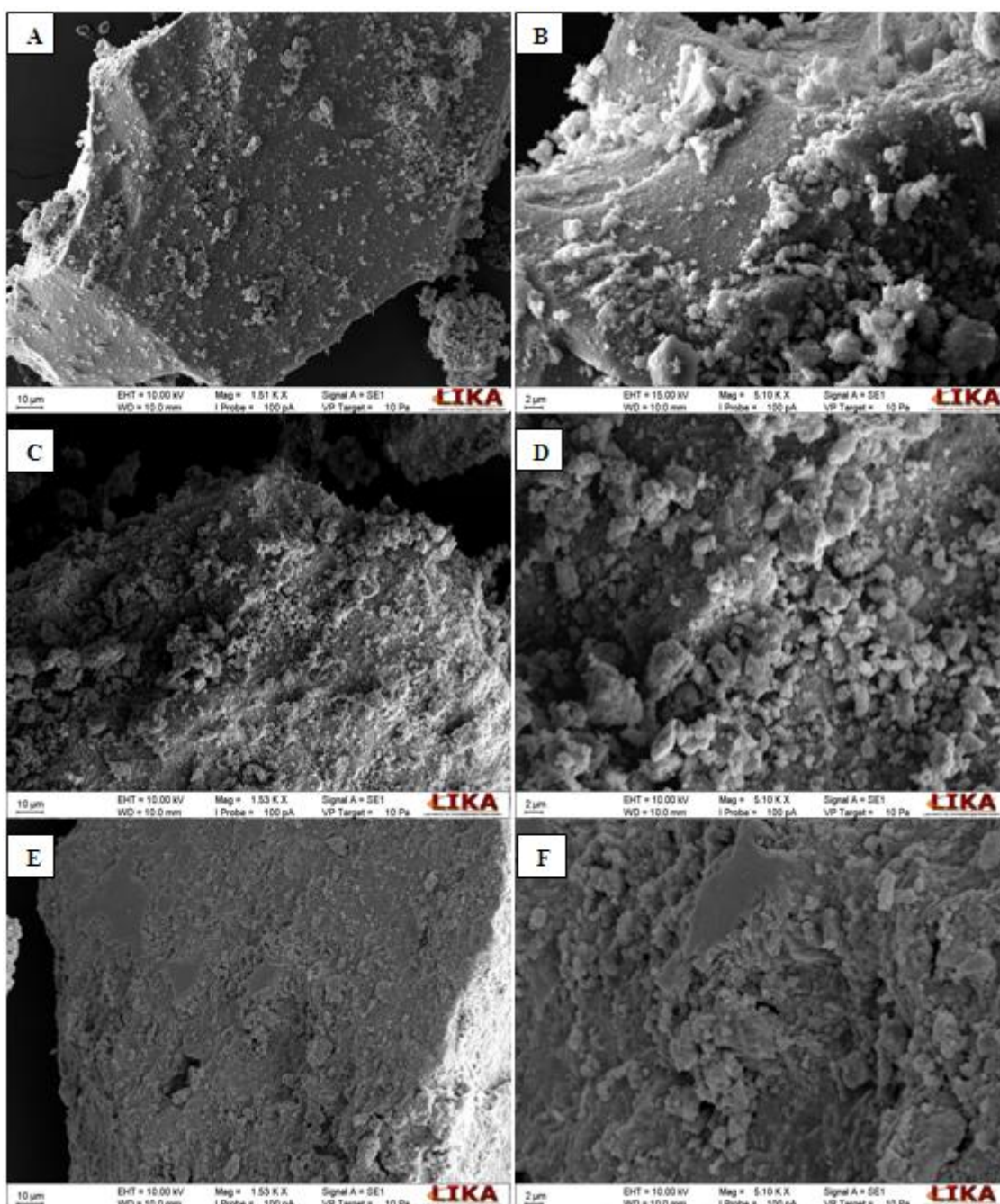


Fig 1. Scanning electron microscopy images of MNPs (A,B), MNPs-levan (B,C) and MNPs-levan incubated with crude extracts (E,F).

The images obtained by TEM showed that the MNPs composed only by magnetite exhibited similar characteristics to MNPs-levan with homogeneous spherical morphology and heterogeneous size distribution of each sample (Fig 2). The size of MNPs were $15 \text{ nm} \pm 3 \text{ nm} \times 12 \text{ nm} \pm 3 \text{ nm}$, whereas MNPs-levan were $23 \text{ nm} \pm 5 \text{ nm} \times 18 \text{ nm} \pm 4 \text{ nm}$. MNPs showed only the core, while the MNPs-levan presented a core surrounded by a shell (Fig 2B

and 2D, respectively). The aggregation patterns of all nanoparticles were presented in TEM images as well as in SEM images.

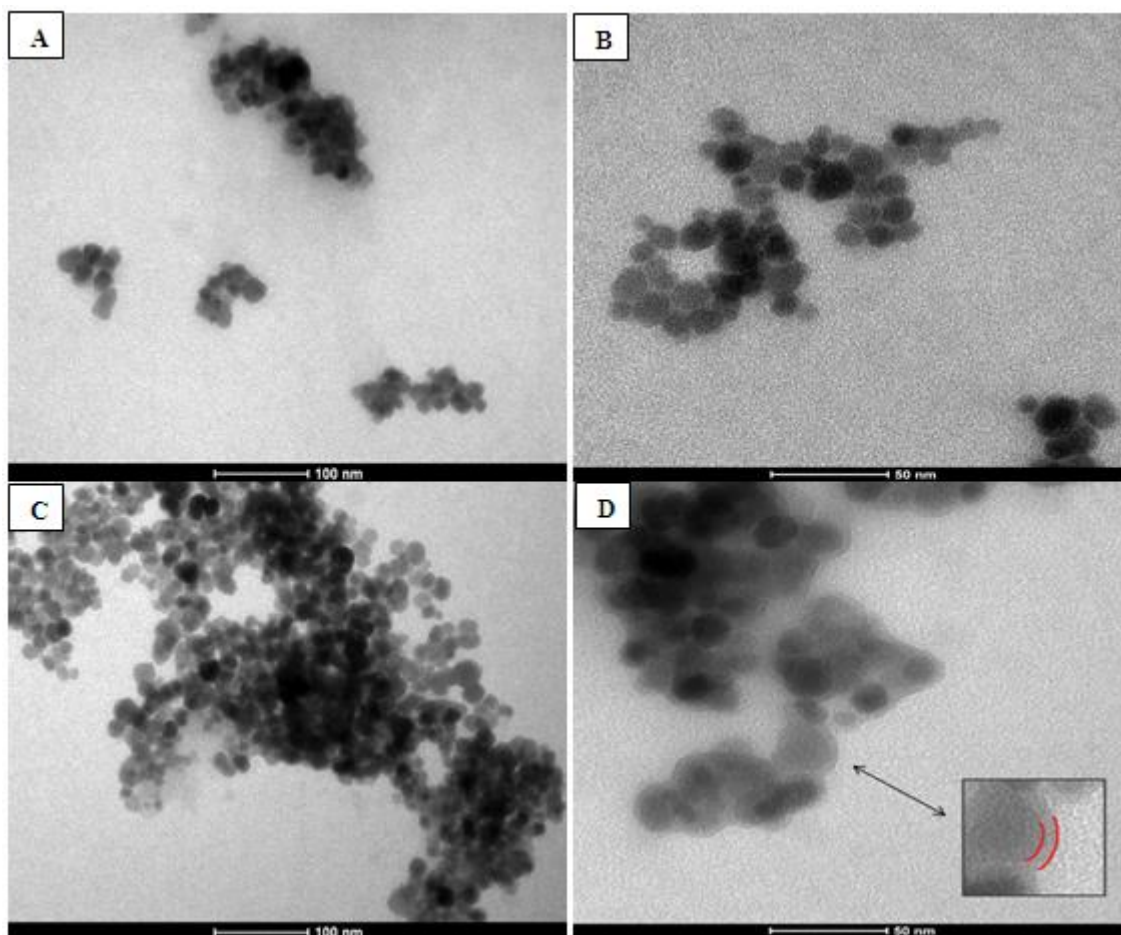


Fig 2.Transmission electron microscopy images of MNPs (A, B) and MNPs-levan (C,D) regarding to homogeneous morphology and size distribution. MNPs-levan show core-shell structure (D)

EDX analysis of levan and MNPs in their varying compositions showed differences in intensity of certain chemical elements. Spectrum profile of MNPs (Fig 3A) showed the presence of C, Au, Fe and O elements, and quantitative (% of weight; Fig 3B): C = $13,61 \pm 1,03$; O = $56,11 \pm 0,89$; Fe = $149,16 \pm 0,99$ and Au = $30,48 \pm 0,97$. Spectrum of MNPs-levan (Fig 3C) presented the same composition of elements but higher peaks of C, Fe, O (Fig 3D), namely, C = $98,14 \pm 2,33$; O = $305,47 \pm 2,03$; Fe = $506,95 \pm 1,86$ and Au = $47,77 \pm 1,44$ (% weight). MNPs-levan after incubation with CE showed a spectrum very similar (Fig 3E) to that for MNPs-levan, except for the presence of Na and Cl elements, and carbon higher

peaks. The quantitative (% weight) depicted in Fig 3F) were C= 111.15 ± 2.59 ; O = 348.42 ± 2.13 ; Fe = 445.05 ± 76.0 Na= 6.95 ± 0.57 , Cl= 5.40 ± 0.27 and Au= 31.97 ± 1.37 . The spectrum of levan (Fig 3G) showed C, O high peaks and small Au peaks. The weight% of elements (Fig 3H) were C= 144.33 ± 1.51 ; O = 143.92 ± 1.58 ; Au = 89.42 ± 3.11 .

3.2 Affinity binding of lectins from crude extracts on MNPs-levan and reutilization profile

It is possible to observe that after incubation of magnetite-levan nanocomposite (MNPs-levan) with the crude extract from *C. mollis* (Fig 4A) and *C. ensiformis* seeds (Fig 4B), the reading of the nanocomposite washes with 0.15 M NaCl tend to decrease next to zero and that right after the exposure of nanocomposite to solutions of 0,3 M D-glucose, the absorbance profile changes dramatically with a gradual increase of values during the washes and a release peak probably of lectins eluted from MNPs-levan is evident. After these washes there was also a gradual decrease of absorbance. The release peaks of lectins from *C. mollis* seeds crude extract in first utilization of MNPs-levan, show a high release peak of mean= $0,487 \pm 0,17$, while the higher peak mean of *C. ensiformis* seeds crude extract was $0,214 \pm 0,08$. Concerning the reutilizations of MNPs-levan, these nanoparticles were reused other three times presenting a similar profile of protein elution in washes (Fig 5).

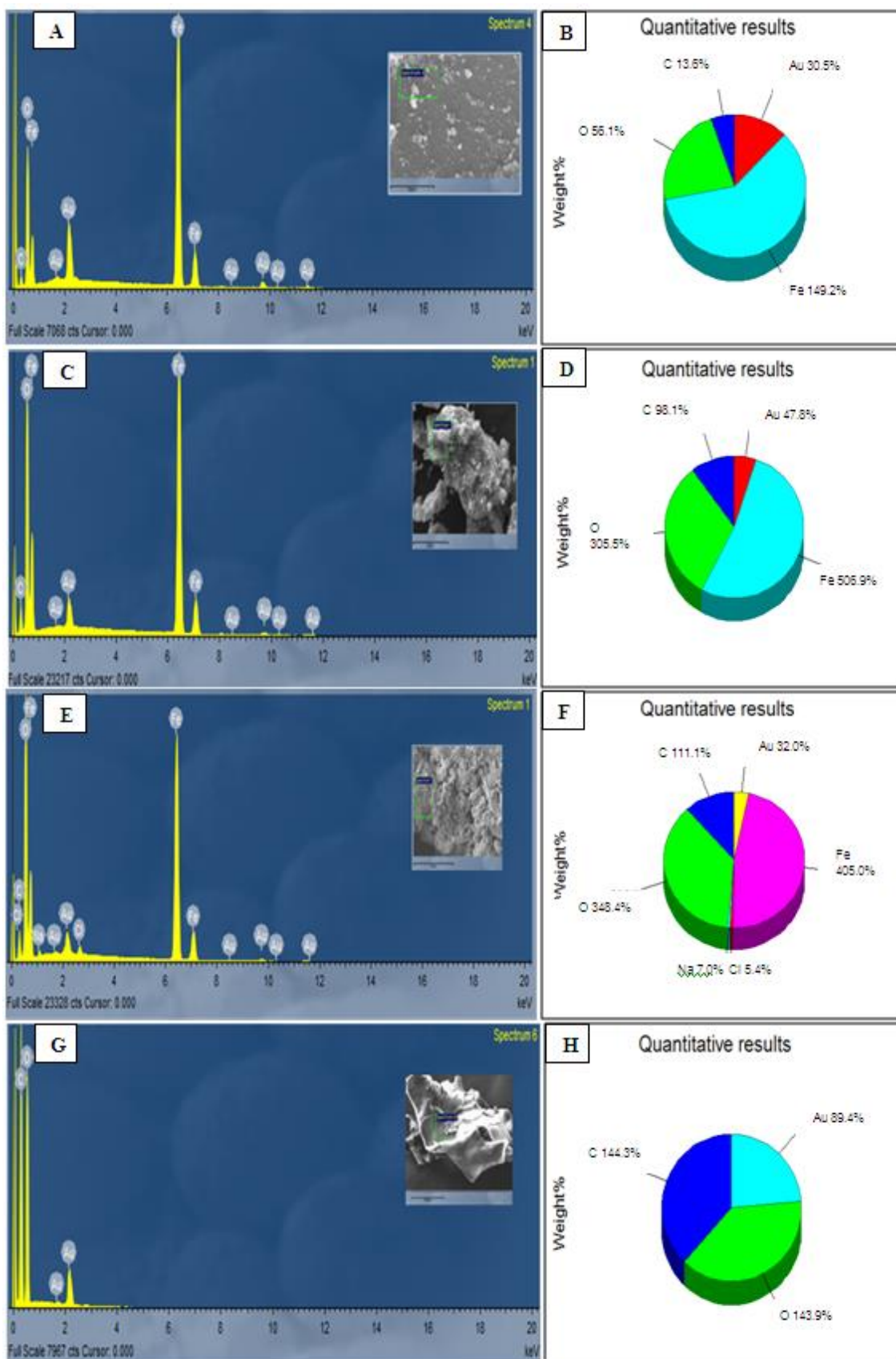


Fig 3. EDX analysis. Spectrum and quantitative weight estimation of chemical elements (%) in MNPs (A, B), MNPs-levan (C,D), MNPs-levan with bonded lectin (E,F), Levan (G,H).

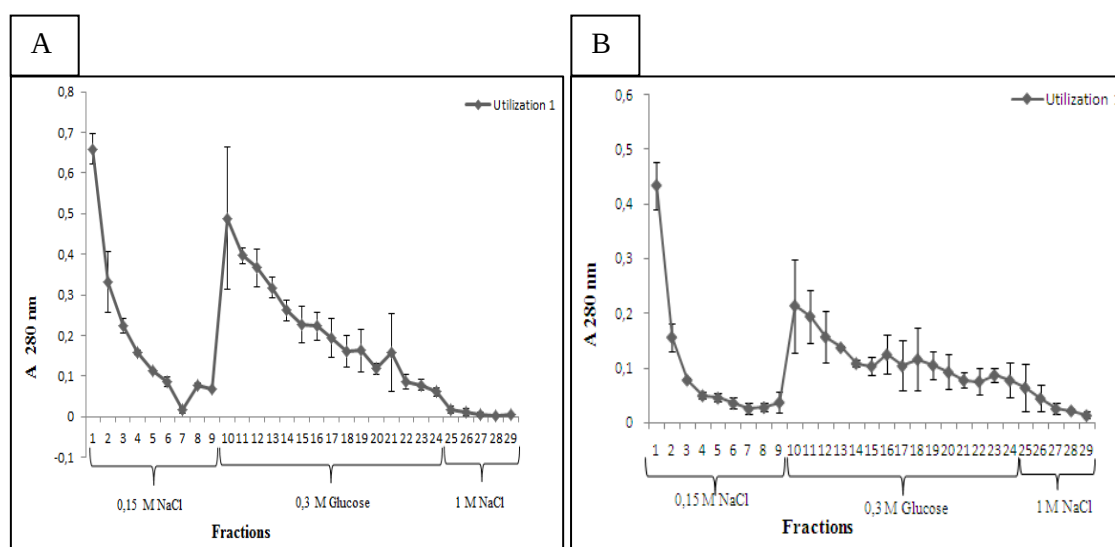


Fig 4. Affinity binding of lectins from crude extracts on MNPs-levan. Fractions (1 ml) were collected and their absorbance at 280nm measured. Each bar represents the mean $\pm$ SD of MNPs-levan washes (first utilization). Each experiment was performed in triplicates incubating 100mg of MNPs-levan with crude extract of *Cratylia mollis* seeds (A) and *Canavalia ensiformis* seeds (B).

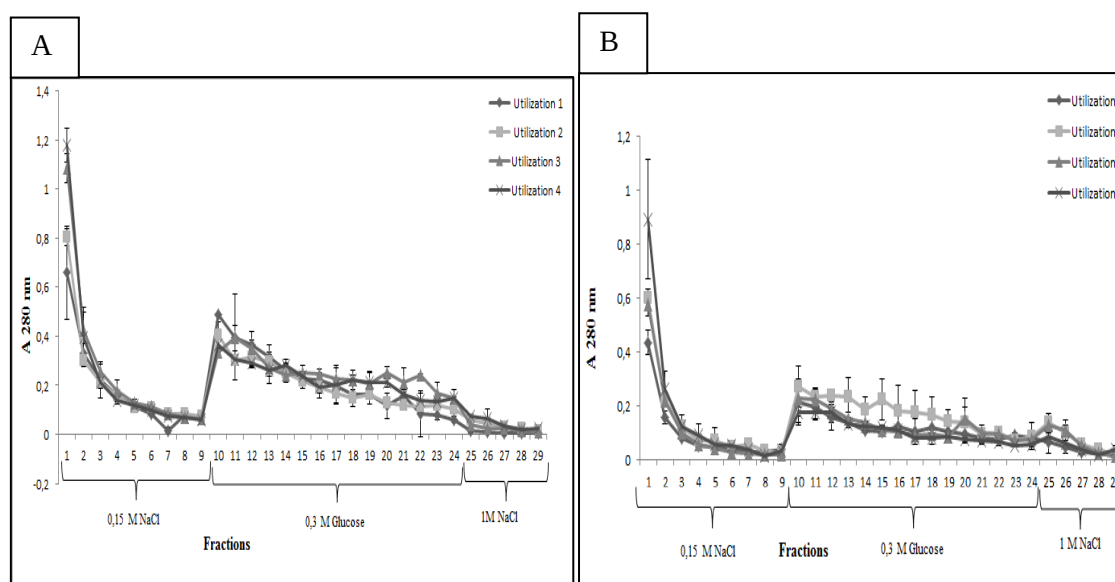


Fig 5. Reutilization profile of MNPs-levan. MNPs-levan were fourfold used and lectins from crude extracts bonded on MNPs-levan were eluted using 0,3 M glucose. Fractions (1 ml) were collected and their absorbance at 280nm measured. Each bar represents the mean $\pm$ SD of each wash. Four experiments were performed in triplicate using 100 mg of MNPs-levan incubated with crude extract of *Cratylia mollis* seeds (A) and *Canavalia ensiformis* seeds (B).

3.3 HA and HAI, protein determination and SDS-PAGE of lectins eluted from MNPs-levan

HA and HAI of lectins isolated from crude extracts of *C. mollis* and *C. ensiformis* seeds are described in Table 1. Lectins (70 µg) from *C. mollis* presented HA= 4 and correspondent HA inhibition by exposition to fructose and glucose, while lectins from *C. ensiformis* (600 µg) presented HA= 64 and HAI to same carbohydrates. The 100 mg of MNPs-levan utilization to lectins purification resulted in isolation of 1,24 mg of lectins from *C. mollis* seeds crude extract containing 23, 71 mg of proteins/ml and from *C. ensiformis* seeds crude extract containing 24,17 mg of proteins/ml, were isolated 4,94 mg of lectins.

Table 1. Hemagglutinating activity inhibition of lectins isolated from crude extracts of *C. mollis* and *C. ensiformis* seeds

Carbohydrate (200 mM)	Reciprocal titers (HA)	
	<i>C. mollis</i> seeds (Cramoll)	<i>C. ensiformis</i> seeds (Con A)
Absence	4	64
Fructose	0	4
Glucose	0	4

SDS-PAGE in Fig 6A show the pattern of bands (52 kDa, 28kDa, 26 kDa and 14 kDa) found of lectins isolated from CE of *C. mollis* using the system of bond with MNPs-levan (1, 2) compared to proteins from CE of *C. mollis* (3). Fig 6B show bands (range 199-13 kDa) found of lectins isolated from *C. ensiformis* CE using the system of bond with MNPs-levan (3, 4) compared to bands of their CE.

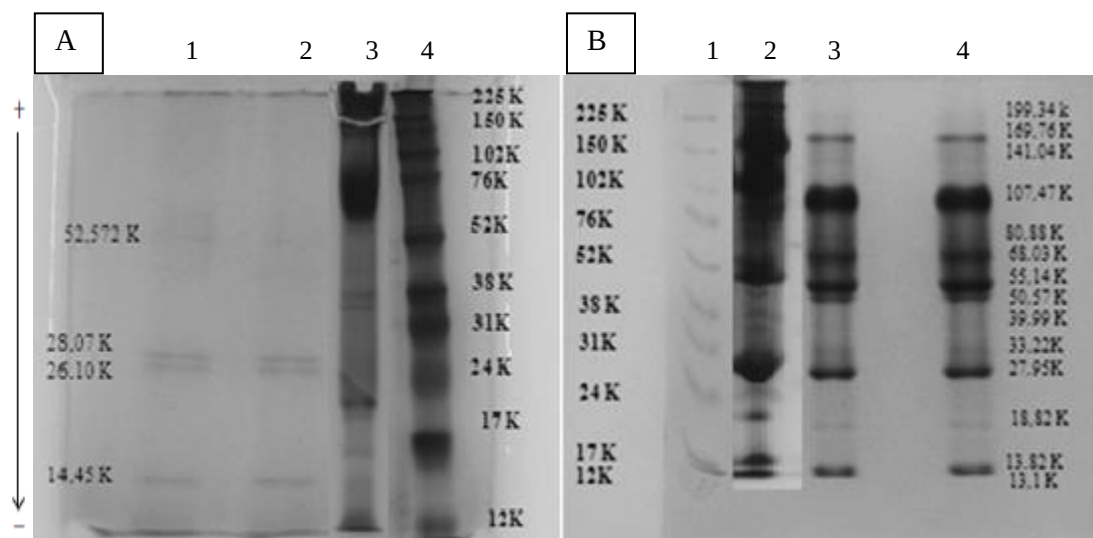


Fig 6. SDS–PAGE stained with Silver (A) and Coomassie Brilliant Blue (B). (A) show pattern of bands (70µg) obtained from the 10th to 24th fractions of experiment using MNPs-levan incubated with *C. mollis* seeds CE (1, 2), bands of *C. mollis* seeds CE proteins (3) and standard (4). (B) show bands of standard proteins (1), *C. ensiformis* seeds CE proteins (2), and bands of lectins (600µg from 10th to 24th fractions) isolated from *C. ensiformis* CE using the system of bond with MNPs-levan (3, 4).

4. Discussion

The co-precipitation process to MNPs synthesis is a simple and economic method and involves a short burst of nucleation followed by slow growth of the nuclei by diffusion of the solutes to the surface of the crystal [27,28]. The characteristics obtained from preparations of MNPs and MNPs-levan of this work come to indicate the composition of magnetic core composed probably by magnetite, an iron oxide of black color composed by both Fe^{2+} and Fe^{3+} [29].

Furthermore, the pattern of aggregation nanoparticles visualized by SEM and TEM images in all samples allow to characterize them as nanomaterials, which naturally exhibit agglomerates form due to inter-particle interaction of hydrophobic surfaces and mainly due to the large surface area relative to volume that lead to decreasing the surface energy for the formation of dipole attractions between the MNPs [6,30]. The structure of MNPs-levan clearly demonstrates the formation of levan coating giving to nanoparticles a core/shell

structure. These types of structure in nanoparticles have been well described in previous studies including dextran, chitosan and polyethyleneimine [31,32,33]. The higher size obtained in MNPs-levan compared to MNPs by TEM images was clearly due to additional coating in its structure, the same increase can be seen in Fe_3O_4 nanoparticles after polymerization in situ of heme proteins leading NPs diameter of 140-170 nm to 175-210 nm[34]. The sphere shape of MNPs and MNPs-levan here synthesized were also found in another studies of NPs [33, 35].

Studies show that is possible the modification of NPs surface morphology by addition of proteins leading to a smooth aspect, for example Fe_3O_4 NPs with rough morphology, after addition of heme proteins showed smooth surfaces, and ATPES coated NPs clearly demonstrated albumin adsorbed to their surfaces, both observed by SEM analysis [34, 36], thereby the smooth/flat morphology presented in some surface of MNPs-levan after incubation with CE can be due to bonded lectins.

The differences found in intensity of chemical elements between MNPs, MNPs-levan and MNPs with bonded lectins in this study, is also demonstrated in another EDX, and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) analysis of MNPs. For example, XPS analysis of MNPs with immobilized lipase shows higher intensity of C, O and N elements upon enzyme immobilization, a phenomenon caused by presence of amino acid functional groups, what in the same way can be the cause of higher intensity of C and O in MNPs-levan with bonded lectins when these are compared with MNPs-levan [35,37]. EDX analysis performed for characterization of the surface elemental composition of chitosan-coated particles revealed that the composition of carbon and oxygen is much higher on the surface composed by chitosan than in the interior with iron oxide, results also obtained for MNPs-levan compared to MNPs only formed by magnetite [38]. The EDX analysis of only levan confirms this increase of C and O elements caused in MNP-levan, due to the composition of this polymer [39]. The Na and Cl peaks obtained in MNP-levan after incubation with crude extracts was due to presence of 0,15M NaCl in CE preparation, and Au peaks in all samples due to the process of metallization.

The profile of protein elution obtained from MNPs-levan in this study was similar to that described by Angeli et al.[22] purifying Con A and using microparticles of magnetic composite of magnetite-Levan (produced by *Zimomonas mobilis* strain ZAG-12). Here crude extracts were used whereas Angeli et al. [22], employed preparation partial purified by

ammonium sulfate preparation. The nanoparticles or particles with levan have been also reported in studies involving trypsin immobilization [20], targeted breast cancer imaging [40], and improvement of thermal and mechanical properties that can lead levan to range of applications including edible packaging or accelerated biodegradability[41].

The presence of hemagglutinating activity and the inhibition activity demonstrated for the proteins eluted from the MNPs-Levan-lectins complex with glucose confirm the lectin property preservation of these molecules as showed in other studies [42,20]. Particularly the inhibition presented when the lectins were exposed to fructose was important to confirm the capacity of binding from MNPs-levan, because levan is by definition a biopolymer composed of residues of D-fructose joined by linkages β - (2 $\rightarrow$ 6) with occasional branches β - (2 $\rightarrow$ 1) which can be found in many plants and microbial products [43]. The commercial *E. herbicola* levan used in this study as coating can be indicated as the responsible by the established binding between lectin and MNPs, because the fructan isolated from *E. herbicola* is described having the expected β - (2 $\rightarrow$ 6) structure and NMR analysis shows consistent signals with fructofuranosyl residues [39].

Correia and Coelho [21] have demonstrated purification of isoform 1 of Cramoll using affinity chromatography on Sephadex G-75 followed by ion-exchange chromatography on CM-cellulose. They identified the isoform 4 with the addition of a further step in the purification. F3 fractions (containing the isoforms 1 and 4); F4 (isoform 1) and F5 resulted from this purification showed a similar pattern in the electrophoresis in the absence or presence of β -mercaptoethanol with a major band of 31 kDa, and two weak bands of 28 and 16 kDa. In our study, the MNPs-levan show purification of lectins (molecular weight of 28.07 kDa, 26.10 kDa and a 14.45 kDa lower band) from *C. mollis* CE, suggesting the presence of isoform 1 of Cramoll (26 and 14 kDa), which despite being presented with a molecular weight of 31 kDa in the studies cited above, it was defined in 2010 by Varejão et al.[53], by mass spectrometry, having a molecular mass of 25.37 kDa, and moreover, by this method and SDS-PAGE, the isoform 1 have shown two additional fragments of 12.61 kDa and 12.76 kDa which are associated with the post-translational processing of lectins and correspond to the N- and C-terminal halves of protein [44,45]. The isoform 4 (28 kDa) seems to be present also in the purification fraction as a band immediately above isoform 1, that is presented in previous studies having a 31 kDa molecular weight [21,22].

In our study using the nanocomposite consisting of levan and magnetite, is shown in Fig 6A that all purifications (1,2)present 52 kDa bands what is probably due to dimer formation, because studies reveal that Cramoll 1 extracted from plants forms dimers or tetramers composed of both intact and cleaved monomers containing tertiary structure, a process that happens during the post-translational processing of the molecule in the plant cell. Cramoll 1 dimer can be formed around pH 5.0 and tetramers at pH 7.0[46].

Regarding the purification of lectins from *Canavalia ensiformis* seeds and the wide variety of protein bands obtained from purification using MNPs-levan matrix, previous studies reveal the possibility of purification of ConA (ConA) from the crude extract of this seeds [47]. In the work carried out by McKenzie et al. [48], a study was conducted about stability and molecular weights of ConA and changes in the environment such as sedimentation conditions, turbidity and optical rotation were evaluated to determine their influence on the molecular weight of this lectin, and was related that at pH ranges of 4.5 to 5.6, species of $53\text{kDa} \pm 3\text{kDa}$ existed in solution, cooperating with the results obtained by Kalb and Lustig [49] which had a Con A molecular weight of 55 kDa. Above pH 5.6, Con A is dimerized and this reaction gets bigger with increasing pH. These results suggest a sequential mechanism of association of monomers to dimers (100 kDa) and from that to formation of large aggregates. However, it is also possible to find Con A subunits of 27, 13 and 10 kDa considered monomers, which may present themselves with different relative proportions of the types of monomers present in a given ConA, and may occur at least in part due to incomplete dimerisations [50]. These monomers, for example, were found in SDS-PAGE performed of purified Con A by ATPS system using PEG–citrate having similar molecular weights to Con A commercially obtained [51]. Thus, the bands obtained of 27.95; 13.92 and 13.1 kDa by incubating MNPS-levan with the crude extract of *C. ensiformis* in our study, are probably monomers of ConA and the higher molecular weight bands in the gel are dimers and tetramers of this lectin that were capable of bound in the matrix.

The lectins purified here by MNPs-levan have been already described on literature due to various biotechnological applications, for example the Cramoll 1,4is already described in: induce the production of cytokines IL-6, IL-17A and IL-22, including IL-23 in mononuclear cells cultures; showing to have an important biotechnological applicability to the way Th17cytokine production [52]; a potential biomarker and an anthelmintic against *Schistosomiasis mansoni* [53].The application of this isoforms in treatment of wounds and

burns, also shows these lectins as potential compound healing and suggest an association with bioproducts as hydrogel to treatments of thermal burns, respectively[54,55]; the Cramoll 1,4 conjugated to horseradish peroxidase also showed bind differently normal and tumor cells, detecting neoplastic subtle histological changes related to pathologies due to the variation of expressed glycode on cells [56]. While ConA is described in application including: anti-tumor and anti-proliferative activity of cancer cells, and may be also employed as histological tool for prostate cancer [57, 58];associated in selective biosensors for detection of norovirus, bacterial toxins, carcinoembryonic antigen, dengue virus [59,60,61,62]. ConA is also applied to microhydrogels and hydrogels aimed for controlled release of insulin [63,64];and has been employed in purification/isolation systems like magnetic beads-Con Afor isolation of plasma membrane proteins; and magnetic particles-ConA to identify and isolate membrane glycoproteins of living cells [65,66].

The results obtained in this study revealed that the preparation of Cramoll1,4 and Con A can be efficiently separated from other proteins presents in crude extract of seeds from *C. mollis* and *C. ensiformis* by employing MNPS-levan as purification matrix. The profile of reutilization of this MNPs-levan demonstrated an advantages of this method of lectin purification to higher scale not only by the possibility of reuse, but also by low cost of matrix synthesis and method simplicity of purification in only one step instead of three-step protocol previously established[21]. However, also in our study there was a necessity of centrifugation of washes obtained, even after the exposition of matrix to magnetic field (0.8 T) due to nanoparticles presence. This seems be resulted of agglomerates easily formed due to inter-particle interaction of NPs that may lose/lower the properties associated with their nanostructures, such as lower magnetization values [30]. This observation indicate the necessity of magnetization measurements of these nanoparticles to discover the influence of levan on MNPs magnetism and the exposure test of this MNPs at stronger magnetic fields to improvement of purification facility.

Acknowledgements

The authors acknowledge the financial support from by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). The authors also acknowledge the Technological Development Program in Materials for Health from FIOCRUZ, by the Scanner Electron Microscopy Service from Núcleo de Plataformas Tecnológicas - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (FIOCRUZ-PE).

References

- [1] Chen YH, Liu YY, Lin RH, Yen FS.Characterization of magnetic poly (methyl methacrylate) microspheres prepared by the modified suspension polymerization. *J ApplPolymSci* 2008; 108:583–90.
- [2] Shao MF., Ning FN, Zhao JW., Wei M, Evans D.G, Duan X, Preparation of Fe₃O₄@SiO₂@layered double hydroxide core–shell microspheres for magnetic separation of proteins. *J Am ChemSoc* 2011; 134:1071–1077.
- [3] Zhang XF, Wang J, R, Li RM, Dai QH, Gao R, Liu Q, Zhang ML, Preparation of Fe₃O₄@C@layered double hydroxide composite for magnetic separation of uranium. *IndEngChem Res* 2013; 52:10152–10159.
- [4] He J, Huang M, Wang D, Zhang Z, Li G. Magnetic separation techniques in sample preparation for biological analysis: A review. *J Pharm Biomed Anal* 2014; 101:84–101.
- [5] Khoshnevisan K, Bordbar AK, Zare D, Davoodi D, Noruzi M, Barkhi M, Tabatabaei M. Immobilization of cellulase enzyme on superparamagnetic nanoparticles and determination of its activity and stability. *ChemEng J* 2011; 171: 669– 673.
- [6] Easo SL, Mohanan PV. Dextran stabilized iron oxide nanoparticles: Synthesis, characterization and in vitro studies. *CarbohydrPolym* 2013; 92: 726– 732.
- [7] Ziegler-Borowska M, Siódmiak T, Chełminiak D, Cyganiuk A, MarszaMP.Magnetic nanoparticles with surfaces modified with chitosan–poly [N-benzyl-2-(methacryloxy)-N,N-dimethylethanaminium bromide] for lipase immobilization *Appl Surf Sci* 2014; 288: 641–648
- [8] Faramarzi MA, Sadighi A. Insights into biogenic and chemical production of inorganic nanomaterials and nanostructures. *Adv. Colloid Interface Sci* 2013; 189–190: 1–20.
- [9] Panek A, Pietrow O, Synowiecki J, FilipkowskiP.Immobilization on magnetic nanoparticles of the recombinant trehalose synthase from *Deinococcusgeothermalis*. *Food Bioprod process* 2013; 91: 632–637.
- [10] Mateo C, Palomo JM, Fernandez-Lorente G, Guisan JM, Fernandez-Lafuente R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques, *Enzyme MicrobTechnol* 2007; 40: 1451–1463.
- [11] Zhang L., Zhu X., Jiao D., Sun Y.,Sun H. Efficient purification of His-tagged protein by superparamagnetic Fe₃O₄/Au–ANTA–Co₂ + nanoparticles. *Mat Sci. Eng C* 2013; v. 33, 4:1989–1992.

- [12] Gagnon P, Toh P, Lee J. High productivity purification of immunoglobulin G monoclonal antibodies on starch-coated magnetic nanoparticles by steric exclusion of polyethylene glycol. *J Chromatogr A* 2014; 1324: 171–180.
- [13] Silva MCC, et al. Purification, primary structure and potential functions of a novel lectin from *Bauhinia forficata* seeds. *Process Biochem* 2012; 47:1049–1059
- [14] Nascimento CO, et al. Aqueous two-phase systems: new strategies for separation and purification of lectin from crude extract of *Cratylia mollis* seeds. *Sep Purif Technol* 2013; 116:154–161
- [15] Zhao JK, Wang HX, Ng TB. Purification and characterization of a novel lectin from the toxic wild mushroom *Inocybe umbrinella*. *Toxicon* 2009; 53:360–366.
- [16] Garrison AR, et al. The cyanobacteria l lectin scytovirin displays potent in vitro and in vivo activity against Zaire Ebola virus. *Antiviral Res* 2014. 112:1-7.
- [17] Andrade CAS, Oliveira HP, Oliveira MDL, Correia MTS, Coelho LCBB, Melo CP. Protein unfolding studied by fluorescence methods and electrical impedance spectroscopy: The cases of *Cratylia mollis* and Concanavalin A. *Colloids Surf B*. 2011; 88: 100– 107.
- [18] Pereira DST, et al. Topical Application Effect of the Isolectin Hydrogel (Cramoll 1,4) on Second-Degree Burns: Experimental Model. *J BiomedBiotechnol* 2012; 2012: 1-11.
- [19] Avelino KYPS, AndradeCAS, De Melo CP, Nogueira ML, Correia MTS, Coelho LCBB, Oliveira MDL. Biosensor based on hybrid nanocomposite and CramoLL lectin for detection of dengue glycoproteins in real samples. *SyntMet* 2014; 194: 102–108.
- [20] Maciel JC, Andrade PL, Neri DFM, Carvalho Jr LB, Cardoso CA, Calazans GMT, Aguiar JA, Silva MPC. Preparation and characterization of magnetic levan particles as matrix for trypsin immobilization. *J Magn Mater* 2012; 324: 1312–1316.
- [21] Correia MTS, Coelho LCBB. Purification of a glucose/mannose specific lectin, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* mart (Camaratu Bean). *Appl Biochem Biotech*.1995; 55: 261–273.
- [22] R Angeli et al. Ferromagnetic Levan Composite: An Affinity Matrix to Purify Lectin. *J Biomed Biotechnol*.2009, 2009: 1-6.
- [23] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 1951; 193: 265–275.
- [24] Smith PK et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985; 150 :76-85.

- [25] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680–685.
- [26] Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 1996; 68:850-858.
- [27] Sun Y-K, Ma M, Zhang Y, Gu N. Synthesis of nanometer-size maghemite particles from magnetite. *Colloid Surf. A* 2004; 245:15–19.
- [28] Cornell RM, Schwertmann U. “Iron oxides in the laboratory: Preparation and characterization. Weinheim: Wiley-VCH Publishers. 2000. p 55-56.
- [29] Cornell, R.M., Schwertmann, U. The iron oxides: structure, properties, reactions, occurrences and uses. Weinheim: Wiley-VCH, 2003.
- [30] Yoon T-J, Yu KN, Kim E, Kim JS, Kim BG, Yun S-H, Sohn B-H, Cho M-H, Lee J-K, Park SB. Specific targeting, cell sorting and bioimaging with smart magnetic silica core–shell nanomaterials. *Small* 2006; 2: 209–215
- [31] Saravanakumara T, Palvannan T, Kim D-H, Park S-M. Optimized immobilization of peracetic acid producing recombinant acetyl xylan esterase on chitosan coated-Fe₃O₄ magnetic nanoparticles. *Process Biochem* 2014; 49: 1920–1928
- [32] Monteila C, Bara N, Retoux R, Henry J, Bernayd B, Villemine D. Partially phosphonated polyethylenimine-coated nanoparticles as convenient support for enzyme immobilization in bioprocessing. *Sens Actuators B* 2014; 192:269– 274.
- [33] Nicolas P, Saleta M, Troiani H, Zysler R, Lassalle V, Ferreira ML. Preparation of iron oxide nanoparticles stabilized with biomolecules: Experimental and mechanistic issues. *Acta Biomater* 2013; 9:4754–4762.
- [34] Peng H-P, Liang R-P, Zhang L, Qiu J-D. General preparation of novel core–shell heme protein–Au–polydopamine–Fe₃O₄ magnetic bionanoparticles for direct electrochemistry. *Electroanal Chem* 2013; 700: 70–76.
- [35] Khoobi M, Motevalizadeh SF, Asadgol Z, Forootanfar H, Shafiee A, Faramarzi MA. Polyethyleneimine-modified superparamagnetic Fe₃O₄ nanoparticles for lipase immobilization: Characterization and application. *Mater Chem Phys* 2015; 149-150: 77-86
- [36] Maltas E, Ozmen M, Vural HC, Yildiz S, Ersoz M. Immobilization of albumin on magnetite nanoparticles. *Mater. Lett.* 2011; 65:3499–3501.
- [37] Khoobi M, Motevalizadeh SF, Asadgol Z, Forootanfar H, Shafiee A, Faramarzi MA. Synthesis of functionalized polyethyleneimine-grafted mesoporous silica spheres and the

effect of side arms on lipase immobilization and application. *BiochemEng J* 2014; 88:131-141.

[38] Donadel K, Felisberto MDV, Fávere VT, Rigoni M, Batistela NJ, Laranjeira MCM. Synthesis and characterization of the iron oxide magnetic particles coated with chitosan biopolymer. *Mater. Sci. Eng., C* 2008; 28:509–514.

[39] Blake JD, Clarke ML, Jansson PE, McNeil KE, “Fructan from *Erwinia herbicola*,” *J. Bacteriol.* 1982; 151:1595–1597.

[40] Kim SJ, Bae PK, Chung BH. Self-assembled levan nanoparticles for targeted breast cancer imaging. *Chem Commun (Camb)* 2015 51(1):107-10.

[41] Chen X, Gao H, Ploehn HJ, Montmorillonite–levannanocomposites with improved thermal and mechanical properties. *Carbohydr Polym* 2014; 101: 565– 573

[42] Andrade CAS, Correia MTS, Coelho LCB, Nascimento SC, Santos-Magalhães NS. Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes. *Intern J Pharmacol* 2004; 278: 435–445.

[43] Han YW. Microbial levan. *Adv. Appl. Microbiol.*, 2004; 35:171–194.

[44] Varejão N, Almeida MDS, De Cicco NNT et al. Heterologous expression and purification of a biologically active legume lectin from *Cratylia mollis* seeds (CRAMOLL 1). *Biochim. Biophys. Acta* 2010 ; 1804 : 1917–1924.

[45] De Souza GA et al, Amino acid sequence and tertiary structure of *Cratylia mollis* seed lectin, *Glycobiology*, 2003 ; 13 : 961–972.

[46] Varejão N, Correia MTS, Foguel D. Characterization of the unfolding process of the tetrameric and dimeric forms of *Cratylia mollis* seed lectin (CRAMOLL1): Effects of Natural Fragmentation on Protein Stability. *Biochem* 2011, 50 : 7330–7340.

[47] Summer JB, Howell SF, Identification of Hemagglutinin of Jack Bean with Concanavalin A, *J. Bacteriol.* 1936; 32 : 227–237.

[48] McKenzie GH, Sawyer WH, Nichol LW. The molecular weight and stability of Concanavalin A. *Biochim Biophys Acta* 1972; 263:283-293.

[49] Kalb AJ, Lustig A, (1968). The molecular weight of concanavalin A. *Biochim. Biophys. Acta*, 1968; 168: 366-367.

[50] Wang J L, Cunningham, B A & Edelman, G M "Unusual fragments in the subunit structure of concanavalin A," *Proc Nat Acad Sci USA* 1971; 68: 1130-1134..

- [51] Cynthia O et al, Aqueous two-phase systems: new strategies for separation and purification of lectin from crude extract of *Cratylia mollis* seeds. *Sep Purif Technol* 2013; 116 : 154–161
- [52] De Oliveira PSS et al, *Cratylia mollis* 1,4 lectin: A new biotechnological tool in IL-6, IL-17A, IL-22, and IL-23 induction and generation of immunological. *Biomed Res Int*, 2013; 263968: 1-6.
- [53] De Melo CML et al. Potential effects of Cramoll 1,4 lectin on murine *Schistosomiasis mansoni*. *Acta Tropica* 2011; 118 : 152–158
- [54] De Melo CML et al, Healing activity induced by Cramoll 1,4 lectin in healthy and immunocompromised mice. *Int. J. Pharm.* 2011;408 : 113–119
- [55] Pereira DST et al, Topical application effect of the isolectin hydrogel (Cramoll 1,4) on second-degree burns: experimental model. *J Biomed Biotechnol* 2012; 184538 :1-11.
- [56] Lima ALR, Cavalcanti CCB, Silva MCC, Paiva PMG, Coelho LCBB, Beltrão EIC, Correia MTS. Histochemical evaluation of human prostatic tissues with *Cratylia mollis* seed lectin, *J. Biomed. Biotechnol* 2010; 179817: 1-6.
- [57] Li X, Yu J, Xu H, Bao J, Concanavalin A: A potential anti-neoplastic agent targeting apoptosis, autophagy and anti-angiogenesis for cancer therapeutics *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 414 : 282–286
- [58] Rêgo MJB, Silva LPBG, Medeiros JKG, Figueiredo RCBQ, Alves-Júnior S, Beltrão EIC. Con A conjugated to Europium (III) cryptate as a new histological tool for prostate cancer investigation using confocal microscopy. *Biotech Histochem* 2014; 89: 321-326.
- [59] Hong SA, Kwon J, Kim D, Yang S. A rapid, sensitive and selective electrochemical biosensor with concanavalin A for the preemptive detection of norovirus. *Biosens. Bioelectron* 2015; 64: 338–344.
- [60] Da Silva JSL, Oliveira MDL, De Melo CPM, Andrade CAS. Impedimetric sensor of bacterial toxins based on mixed (Concanavalin A)/polyaniline films. *Colloid Surface B* 2014; 117:549–554.
- [61] Yang P, Li X, Wang L, Wu Q, Chen Z, Lin X Sandwich-type amperometric immunosensor for cancer biomarker based on signal amplification strategy of multiple enzyme-linked antibodies as probes modified with carbon nanotubes and concanavalin A. *J Electroanal Chem* 2014; 732:38–45

- [62] Luna DMN, Oliveira MDL, Nogueira ML, Andrade CAS. Biosensor based on lectin and lipid membranes for detection of serum glycoproteins in infected patients with dengue. *ChemPhys Lipids* 2014; 180:7–14.
- [63] Yin R, Tong Z, Yang D, Nie J. Glucose-responsive insulin delivery microhydrogels from methacrylated dextran/concanavalin A: Preparation and in vitro release study. *CarbohydrPolym* 2012; 89:117– 123.
- [64] Yin R, Wang K, Duc S, Chenc Lu, Niec J , Zhang W. Design of genipin-crosslinkedmicrogels from concanavalin A and glucosyloxyethylacrylated chitosan for glucose-responsive insulin delivery. *CarbohydrPolym* 2014; 103:369– 376.
- [65] Lee Y-C, et al. One-step isolation of plasma membrane proteins using magnetic beads with immobilized concanavalin A. *Protein Express Purif* 2008; 62:223–229.
- [66] Yang G, Cui T, Chen Q, Ma T, Li Z. Isolation and identification of native membrane glycoproteins from living cell by concanavalin A–magnetic particle conjugates. *Anal.Biochem* 2012; 421:339–341.

6. CONCLUSÕES

- a) MNPs foram sintetizadas pelo método de co-precipitação e revestidas com levana proveniente de *Erwinia herbicola* resultando em partículas MNPs-levana com estrutura “core-shell”.
- b) Análises de MET evidenciaram: (1) estruturas esféricas das MNPs obtidas; (2) padrão uniforme de agregação; e (3) MNPs-levana apresentaram dimensões maiores que as MNPs, devido à estrutura core-shell formada.
- c) Análises de MEV demonstraram que as MNPs possuíam superfícies lisas e rugosas, diferentemente, as MNPs-levana apresentaram superfícies totalmente rugosas. Após incubação com extratos brutos, as MNPs-levana apresentaram mudanças do padrão totalmente rugoso para presença de pontos com aspectos planos/lisos. Esta alteração pode ser atribuída à ligação das lectinas à superfície das MNPs-levana.
- d) Análise da composição elementar de MNPs, MNPs-levana e MNPs-levana expostas ao extrato bruto, demonstrou aumento em intensidade dos elementos C e O nas nanopartículas após a adição do polímero levana e após contato com o extrato bruto, evidenciando a ligação das lectinas à matriz.
- e) Os resultados obtidos neste estudo revelaram que lectinas foram eficientemente separadas de outras proteínas dos extratos brutos das sementes de *C. mollis* e *C. ensiformis* por meio do emprego de MNPs-levana.
- f) Ensaio de atividade hemaglutinante e inibição da atividade hemaglutinante das biomoléculas purificadas indicam que estas têm perfil de lectinas. Eletroforese SDS-PAGE confirmou que as proteínas purificadas apresentam pesos moleculares correspondentes aos monômeros, dímeros e tetrâmeros das lectinas Cramoll 1,4 e Con A convencionalmente purificadas.
- g) O perfil de reutilização e o baixo custo da síntese das MNPs-levana, além da simplicidade do método de purificação de lectinas em apenas uma etapa são vantagens para o emprego em larga escala da matriz de purificação produzida.