

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
MESTRADO EM BIOQUÍMICA**

CYNTHIA DE OLIVEIRA NASCIMENTO

**EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DA LECTINA DA ENTRECASCA DE *Crataeva tapia*
L. UTILIZANDO MICELAS INVERTIDAS**

**Orientadora: Profa. Dra. Maria das Graças Carneiro da Cunha
Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia**

RECIFE, 2006



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
MESTRADO EM BIOQUÍMICA

CYNTHIA DE OLIVEIRA NASCIMENTO

EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DA LECTINA DA ENTRECASCA DE *Crataeva*
tapia L. UTILIZANDO MICELAS INVERTIDAS

Orientadora: Profa. Dra. Maria das Graças Carneiro da Cunha
Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia

RECIFE, 2006



CYNTHIA DE OLIVEIRA NASCIMENTO

**EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DA LECTINA DE ENTRECASCA DE *Crataeva*
tapia L. UTILIZANDO MICELAS INVERTIDAS**

Dissertação apresentada ao Mestrado em Bioquímica do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Aprovada por:

Adriana Carla Cavalcante Malta Argôlo

Ana Lúcia Figueiredo Porto

Patrícia Maria Guedes Paiva

Maria das Graças Carneiro da Cunha

Orientadora: Profa. Dra. Maria das Graças Carneiro da Cunha
Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia

RECIFE, 2006

Nascimento, Cynthia de Oliveira

Extração líquido- líquido da lectina da entrecasca de Crataeva tapia L. utilizando micelas invertidas /Cynthia de Oliveira Nascimento. – Recife: O Autor, 2006.

61 folhas : il., fig., tab, gráf.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Ciências Biológicas. Bioquímica, 2006.

Inclui bibliografia e anexo.

1. Proteínas 2. Lectinas – Extração líquido – líquido 3. Crataeva tapia 4. Micelas invertidas I. Título.

**577.112
572.6**

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

**UFPE
CCB – 2006 - 014**

Ata da defesa de dissertação do Mestrando **Cynthia de Oliveira Nascimento**, realizada em 20 de fevereiro de 2006, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Às 9:00 horas, do dia 20 de fevereiro de 2006, foi aberto, no Auditório Prof. Marcionilo Barros Lins, Depto. de Bioquímica/CCB/UFPE, o ato de defesa de dissertação da mestranda Cynthia de Oliveira Nascimento, aluna do Curso de Mestrado em Bioquímica/CCB/UFPE. Iniciando os trabalhos a Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva, Vice-Coordenadora do Curso supra citado, em substituição a Profa. Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima, fez a apresentação da aluna, de sua orientadora Profa. Dra. Maria das Graças Carneiro da Cunha, da co-orientadora Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia, e da Banca Examinadora composta pelos professores doutores: Maria das Graças Carneiro da Cunha, na qualidade de Presidente, Patrícia Maria Guedes Paiva, ambas do Depto. de Bioquímica/CCB/UFPE, Ana Lúcia Figueiredo Porto, do Depto. de Morfologia e Fisiologia Animal/UFRPE e Adriana Carla Cavalcante Malta Argôlo, Pesquisadora do Depto. de Bioquímica/CCB/UFPE. Após as apresentações, A Profa. Patrícia passou a palavra para a Presidente da Banca que convidou a aluna para a apresentação de sua dissertação intitulada: **"Extração Líquido-líquido da Lectina da Entrecasca de *Crataeva tapia* L. Utilizando Micelas Invertidas"**, e informou que de acordo com o Regimento Interno do Curso, o candidato dispõe de até 50 (cinquenta) minutos para apresentação do trabalho e o tempo de arguição para cada examinador, juntamente com o tempo gasto pelo aluno para responder às perguntas será de 30 (trinta) minutos. A aluna procedeu a explanação e comentários acerca do tema em 25 (vinte e cinco) minutos. Após a apresentação do trabalho, foi concedido um intervalo de 15 minutos. Reiniciando, a Sra. Presidente convidou a Banca Examinadora para ocupar seus lugares e passou a palavra ao primeiro examinador, Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto, que agradeceu o convite, fez alguns comentários e deu algumas sugestões e iniciou sua arguição. Ao final, a referida professora deu-se por satisfeita. Em seguida, a Sra. Presidente passou a palavra para a Profa. Dra. Adriana Carla Cavalcante Malta Argolo, que agradeceu o convite, fez alguns comentários e deu algumas sugestões e iniciou sua arguição. Ao final, referida professora deu-se por satisfeita. Em seguida, a palavra foi passada para a Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva, que após agradecer e fazer alguns comentários iniciou sua arguição. Ao final, a referida professora deu-se por satisfeita. A Sra. Presidente passou a palavra para a co-orientadora Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia, que fez alguns comentários sobre a candidata e seus trabalho. Daí, a Sra. Presidente usou da palavra para tecer alguns comentários, agradecer à Banca Examinadora e parabenizar a candidata. Finalmente, a sessão foi suspensa para o julgamento pela Banca Examinadora, que se reuniu na Secretaria do Curso. Após alguns comentários, a Banca decidiu, por unanimidade, conceder a menção **"Aprovada com Distinção"**. Nada mais havendo a tratar, lavrei a presente ata que vai assinada por mim, Secretário, e demais membros da Banca Examinadora. Recife, 20 de fevereiro de 2006.

Adriana Carla C. M. Argôlo
Ana Lúcia Figueiredo Porto

Patrícia Maria Guedes Paiva

A Deus, por me guiar e iluminar no caminho da sabedoria. A minha família por ter me dado o carinho possível e impossível e em especial ao meu noivo Dioclecio Otero pelo amor, companheirismo, carinho e compreensão em todas as horas desta caminhada.

AGRADECIMENTOS

Principalmente a Deus, como ser supremo e iluminado guiando-me com perseverança e fé.

À Profa. Dra. Maria das Graças Carneiro da Cunha, pela confiança, amizade, orientação científica, apoio no desenvolvimento e escrita da dissertação. Enfim, foi a pessoa que há seis anos me acolheu como sua aluna.

À Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia pela co-orientação, carinho e tranquilidade.

À Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto pelo apoio, carinho e amizade.

A todos os professores do Mestrado em Bioquímica e funcionários do Departamento de Bioquímica da UFPE e especialmente ao Miron por toda ajuda e tranquilidade.

À funcionária Maria Barbosa Reis da Silva técnica do laboratório de Glicoproteína, pelos seus conhecimentos passados com toda experiência de vida.

As minhas amigas Mariana, Maria Danielly, Nathalia, Renata, Adriana, Neila, Micheli, Vanessa, Regina, Flavia e a todos que compõe esta grande corrente de união e carinho no Laboratório de Glicoproteínas que foram de grande importância por tornar esse sonho em realidade.

A todos os companheiros da turma de Mestrado e do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) pela palavra amiga e sincera nos momentos difíceis.

A Romero, Fernando e Roberto pela ajuda, apoio, amizade, grande colaboração, tranquilidade e presença de fundamental importância nesta jornada.

A Aline e a Virginia, alunas do mestrado em saúde pública do AGEU Magalhães pelo apoio nas horas em que mais precisei.

A toda minha família pela ajuda e compreensão nos momentos mais difíceis de superar obstáculos.

Ao meu noivo Dioclecio pelo seu amor, carinho e compreensão em todos os momentos, seguindo sempre ao meu lado.

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Alinhamento das moléculas do anfifílico (surfactante) na interface água/óleo. 06
- FIGURA 2.** Diferentes formas de micelas: a) micela invertida (em solução orgânica) e b) micela normal (em solução aquosa). 07
- FIGURA 3.** *Crataeva tapia*: árvore (a), folhas e flores (b), fruto (c), sementes (d) e entrecasca (e). Figuras reproduzidas de Costa e Silva (2002). 18

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1.** Agentes tensioativos de uso comum em química analítica 10

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO	04
1.1.1. Sistemas Micelares	05
1.1.1.1. Efeito do Tipo e Concentração do surfactante	08
1.1.1.2. Efeito do pH da Fase Aquosa	13
1.1.1.3. Efeito da Força Iônica e Tipos de Íons	14
1.2. LECTINAS	14
1.3. <i>Crataeva tapia</i> L.	17
2. JUSTIFICATIVA	19
3. OBJETIVOS	20
3.1. Objetivo Geral	20
3.2. Objetivos Específicos	20
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21
5. ARTIGO “Liquid-liquid extraction of a lectin from <i>Crataeva tapia</i> bark using reversed micelles”	35
6. CONCLUSÕES	60
7. ANEXO	61

RESUMO

As lectinas são proteínas ubíquas na natureza que se ligam reversivelmente a mono, oligo, polissacarídeos e glicoconjugados. Não apresentam atividade catalítica e ao contrário dos anticorpos, não são produtos de uma resposta imunológica. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a extração e a reextração de uma lectina purificada por cromatografia de troca iônica (CrataBL) e do extrato bruto (EB) da entrecasca de *Crataeva tapia* utilizando o sistema de micelas invertidas, constituídas pelo surfactante dioctilsulfosuccinato de sódio (AOT) em isooctano. A entrecasca de *Crataeva tapia* foi coletada na região da cidade do Recife (Pernambuco, Brasil) e o extrato [10 % (p/v) em 150 mM NaCl] foi obtido por trituração e agitação durante 16 h a 4 °C, filtrado em gaze e centrifugado (4.000 x g durante 15 min). O sobrenadante obtido foi denominado de extrato bruto (EB). Os fatores que afetam a extração da proteína tais como: tempo de contato de agitação (5 - 20 min), força iônica, incluindo o tipo de sal (NaCl, KCl e CaCl₂) e concentração (30 – 300 mM), pH da fase aquosa (pH 3,0 – 12,0) e concentração do surfactante (5 - 100 mM AOT), foram investigados. Os parâmetros avaliados para a reextração foram: pH da fase aquosa (pH 5,0 – 7,0) e força iônica (50 - 1000 mM de KCl) tendo sido adicionado ao sistema 5% Butanol. Os parâmetros velocidade de agitação (900 rpm), temperatura (25°C) e concentração de proteína (0,374 mg/ml), foram mantidos constantes em todos os experimentos. Os melhores resultados para extração foram obtidos com 5 min de tempo de contato entre as duas fases, 30 mM de NaCl, tampão citrato/fosfato pH 5,5 e 5 mM de AOT, onde foi possível obter extrações protéicas de 100 % e 70 % para CrataBL e EB, respectivamente. Para a reextração, as melhores condições foram, tampão citrato/fosfato 10 mM, pH 5,5 acrescido de 1000 mM de KCl, onde foi possível obter uma recuperação protéica de 45,25 % (CrataBL) e 80,65 % (EB) com 50 % da atividade hemaglutinante para ambas as amostras. As amostras obtidas com as melhores condições de extração e reextração aplicadas ao EB revelaram apenas uma banda na PAGE para proteínas básicas e duas bandas no SDS-PAGE. A cromatografia de gel filtração (AKTA) indicou dois picos: um de 40 KDa e outro de 29 KDa. A natureza oligomérica da lectina foi detectada por cromatografia de filtração em gel e SDS-PAGE. A comparação dos perfis cromatográficos de filtração em gel do EB com o da lectina purificada, indicaram a eficiência do sistema de micelas invertidas na purificação da lectina.

ABSTRACT

The lectins are ubiquitous protein in the nature that reversibly bind to mono, oligo, polysaccharides and glycoconjugates. They do not present catalytic activity and unlike antibodies, are not products of immune reply. The aim of the present work was to evaluate the extraction and back-extraction of a lectin purified by ionic exchange chromatography (CrataBL) and of crude extract (CE) from *Crataeva tapia* bark using the reversed micelles system of sodium di(2-ethylhexyl)sulfosuccinate (AOT) in isooctane. The *Crataeva tapia* bark was collected in the region of Recife city (Pernambuco, Brazil) and the extract [10 % (w/v) in 150 mM NaCl] was obtained by trituration and agitation for 16 h at 4 °C, filtered on gaze and centrifuged (4.000 x g for 15 min). The supernatant obtained was called crude extract (CE). The factors that affect the protein extraction, such as: agitation contact time (5 - 20 min), ionic strength, salt type (NaCl, KCl e CaCl₂) and concentration (30 – 300 mM) included, pH of aqueous phase (pH 3.0 –12.0) and surfactant concentration (5 - 100 mM AOT), were investigated. For the back-extraction the following parameters were evaluated: pH of aqueous phase (pH 5.0 – 7.0) and ionic strength (50 - 1000 mM of KCl) being added to the system 5 % of Butanol. The parameters, agitation speed (900 rpm), temperature (25°C) and protein concentration (0.374 mg/ml), were maintained constant in all experiments. The best results for the extraction were obtained with 5 min of contact time between the two phases, 30 mM of NaCl, citrate/phosphate buffer, pH 5.5 and 5 mM of AOT, where it was possible to obtain 100% and 70% of protein extraction for CrataBL and CE, respectively. For the back-extraction, the best condintions were; 10 mM citrate/phosphate buffer, pH 5.5 added by 1000 mM of KCl, where it was possible to obtain a protein recovery of 45.25% (CrataBL) and 80.65% (CE) with 50% of hemagglutinating activity for both samples. Samples from the best conditions of extraction and back-extraction applied to the CE revealed only one single PAGE band for basic protein and two SDS-PAGE bands. The gel filtration chromatography (AKTA) showed two protein peaks: one of 40 KDa and other of 29 KDa. The oligomeric nature of lectin was detected by SDS-PAGE and gel filtration chromatography. The comparison of the chromatographyc profile in gel filtration showed the efficiency of the reversed micelles system in the lectin purification.

I. INTRODUÇÃO

Os processos de isolamento e purificação de biomoléculas consistem, geralmente, de uma primeira etapa de separação sólido-líquido, seguida de uma nova etapa de concentração e finalmente, a etapa de purificação em função do grau de pureza pretendido (Aires-Barros e Cabral, 2003).

Em várias etapas independentes, as diversas propriedades físico-químicas da biomolécula, entre outras, de interesse são usadas para separá-la das demais. Assim, o tamanho, forma, afinidade de ligação e a carga elétrica são explorados durante o processo de purificação.

Os principais métodos empregados na purificação de proteínas em diversas áreas como biotecnologia, saúde pública ou no estudo dos poluentes ambientais são: precipitação salina (Romero *et al.*, 2001); cromatografia de afinidade (Alpuche *et al.*, 2005), de troca iônica (Zhao *et al.*, 2003) e de filtração em gel (Rojo *et al.*, 2003); ultrafiltração de afinidade (Vedajnananda *et al.*, 2001), extração líquido-líquido com duas fases aquosas (Porto *et al.*, 2002) e com micelas invertidas (Nascimento *et al.*, 2002); entre outros.

A maioria das proteínas é inicialmente purificada por procedimentos de fracionamento a partir da adição de um sal. Esta técnica baseia-se no fato de que as proteínas em solução estão associadas a moléculas de água na sua superfície, camada de solvatação, que impedem as interações proteína-proteína. A adição de concentrações elevadas de sais remove a água adsorvida, permitindo interações hidrofóbicas proteína-proteína e a sua precipitação. Em função das proteínas possuírem muitos grupos carregados, a sua solubilidade depende da concentração dos sais dissolvidos, aumentando à proporção que os sais são adicionados (*salting in*) voltando a diminuir à medida que mais

sais são adicionados (*salting out*). O sulfato de amônio, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, é o sal mais utilizado para precipitar proteínas, porque a sua alta solubilidade permite a precipitação protéica em soluções com elevada força iônica (Heu *et al.*, 1995).

A cromatografia é uma técnica de separação diferencial dos componentes de uma amostra entre uma fase móvel e uma fase estacionária (partículas esféricas empacotadas numa coluna). A mistura de proteínas ou outros produtos biológicos a separar é aplicada na fase móvel e migra através da coluna. A maior ou menor afinidade para a fase móvel ou estacionária afeta a sua separação. Geralmente a separação dos componentes da mistura é conseguida por eluição, em que as forças de ligação à matriz são perturbadas através da alteração da composição da fase móvel de um modo contínuo (gradiente linear) ou de um modo descontínuo (gradiente em degrau). Os processos cromatográficos normalmente conduzem a seletividades elevadas. Os fatores que influenciam a eficiência deste processo são a qualidade do suporte cromatográfico, a dispersão axial e a dificuldade de estabelecimento de equilíbrio entre as fases móvel e estacionária. Os suportes mais utilizados em cromatografia são polissacarídeos (dextrana, agarose e celulose), polímeros sintéticos (como poliacrilamida, poliestireno) materiais inorgânicos (sílica porosa, hidroxiapatita e vidro poroso) e materiais compósitos (poliacrilamida-agarose, dextrans-bisacrilamida, sílica porosa-dextrana). Dependendo do tipo de interações envolvidas os processos cromatográficos podem ser classificados em adsorção, filtração em gel, troca iônica, interação hidrofóbica, fase reversa e afinidade (Aires-Barros e Cabral, 2003).

A cromatografia de afinidade, técnica mais amplamente utilizada, tem como princípio de separação das proteínas por se ligarem especificamente a suportes polissacarídicos através de ligações não covalentes. Normalmente a proteína desejada é obtida com alto grau de pureza (Bhowal *et al.*, 2005), por alteração das condições de pH

(Datta *et al.*, 2001), da força iônica (Freire *et al.*, 2002) ou pela eluição com uma solução contendo um competidor (Oliveira *et al.*, 2002).

Na cromatografia de troca iônica a ligação da proteína ocorre com os grupos de carga de sinal contrário, imobilizados na matriz. Uma das matrizes mais utilizadas neste tipo de cromatografia é a celulose. Como exemplo temos a carboximetil (CM) celulose, um trocador catiônico carregado negativamente e a dietilaminoetil (DEAE) celulose, um trocador aniônico (Datta *et al.*, 2001).

Na cromatografia de filtração em gel, a separação ocorre de acordo com o tamanho da proteína. A fase estacionária consiste de esferas de gel contendo poros cujos intervalos de tamanho são relativamente estreitos. Quando uma solução aquosa contendo moléculas de vários tamanhos passa através da coluna, as moléculas maiores permanecem na solução que contorna as esferas e, portanto, atravessam a coluna mais rapidamente do que as moléculas pequenas, que atravessam os poros. Este tipo de cromatografia é utilizado tanto para obter preparações protéicas homogêneas (Freire *et al.*, 2002) como para a definição da massa molecular da proteína (Kawagishi *et al.*, 2001).

A ultrafiltração de afinidade é um outro processo de separação que se baseia na imobilização covalente de um ligante de afinidade a uma membrana visando a exclusão de biomoléculas fixadas ao ligante, promovendo a permeação de outras impurezas de baixo peso molecular dos poros da membrana. Isto é, a ultrafiltração de afinidade é a combinação de dois processos de separação, Adsorção de afinidade e Ultrafiltração (Vedajenananda *et al.*, 2001).

A extração líquido-líquido é um processo de separação em que se estabelece o contato entre duas fases líquidas, total ou parcialmente imiscíveis, havendo a transferência de um ou mais componentes de uma fase para a outra. A extração líquido-líquido pode

ocorrer através do contato de duas fases aquosas ou de uma fase aquosa e uma fase orgânica. Solventes orgânicos contendo micelas invertidas têm um grande potencial como um novo meio de bioseparação e biocatálise (Lu *et al.*, 1998; Nagayama *et al.*, 1998). Em particular, a extração de proteínas usando micelas invertidas tem ganhado uma grande atenção porque a extração líquido-líquido pode ser realizada em larga escala, em processos contínuos (Nishiki *et al.*, 1998).

O modelo experimental abordado neste trabalho foi a extração líquido-líquido com sistema de micelas invertidas utilizando o tensioativo aniônico Bis(2-etilhexil) sulfosuccinato de sódico (AOT), visando a purificação da lectina da entrecasca de *Crataeva tapia* (*C. tapia*).

1.1. EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO

A separação de produtos envolvendo o contato de duas fases líquidas imiscíveis é conhecida como extração líquido-líquido, ou ainda, como extração com solventes. Esta técnica baseia-se na distribuição ou partição de um ou mais solutos entre duas fases líquidas (Sebastião, 1996). A sua aplicação em larga escala começou a partir do início da década de 30, na remoção de hidrocarbonetos aromáticos do querosene (Seader *et al.*, 1998).

As contribuições de Luisi *et al.* (1977,1979) e Martinek *et al.* (1978), com as primeiras descobertas de que proteínas com atividade biológica poderiam ser isoladas no interior de agregados de tensioativos em solventes orgânicos, deram início à aplicação de isolamento e purificação de biomoléculas em sistemas micelares.

Nos últimos anos a extração líquido-líquido utilizando sistemas de micelas invertidas tem sido demonstrada como um método para a separação de produtos biológicos

tais como aminoácidos (Dövyap *et al.*, 2006), proteases alcalinas do meio de fermentação (Porto *et al.*, 2005, Monteiro *et al.*, 2005), antibióticos (Alves *et al.*, 2003), lectina de sementes de *Crathylia mollis* (Nascimento *et al.*, 2002), mantendo as suas propriedades funcionais.

1.1.1. Sistemas Micelares

Numa mistura binária água-óleo a tensão superficial entre as fases rica em água e rica em óleo é bastante elevada. Esta tensão superficial é consideravelmente reduzida quando à mistura binária é adicionado um componente anfifílico (surfactante), que se vai organizar na interface plana água-óleo formando uma monocamada. As moléculas anfifílicas são constituídas por duas regiões com comportamentos químicos muito diferentes, a “cabeça” hidrofílica (polar) que possui grande afinidade com a água e a “cauda” hidrofóbica (apolar), possuindo, no entanto, grande afinidade com compostos apolares como o óleo. Assim, estes tipos de moléculas têm tendência a serem adsorvidas na interface com as “cabeças” voltadas para a fase aquosa e as “caudas” a apontar para a fase apolar (Kuhn and Rehage, 1999). Este processo de alinhamento e organização molecular interfacial é responsável por uma redução efetiva da tensão superficial (Figura 1).

Interfaces modificadas por moléculas de anfifílicos são de grande relevância nas áreas fundamental e tecnológica, incluindo o aumento na recuperação de óleos, liberação de drogas, bio-sensores, formação de nanopartículas, lubrificação e produção de materiais bio-sintéticos (Rocha *et al.*, 2002)

Para baixas concentrações de anfifílico, a água e o óleo não se misturam ocorrendo uma separação de fases. Neste regime, as moléculas anfifílicas são adsorvidas na interface

água/óleo. À medida que a concentração do componente anfifílico aumenta há a formação de uma única fase isotrópica estável, fase microemulsão, que possui quantidades consideráveis de água e óleo (Laaksonen e Rosenholm, 1993).

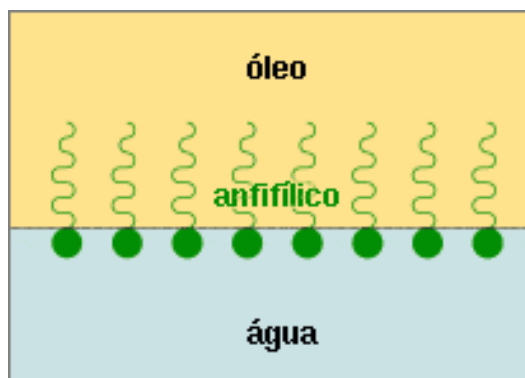


Figura 1. Alinhamento das moléculas do anfifílico (surfactante) na interface água/óleo.

As Micelas invertidas são agregados esféricos formados por surfactantes em solventes orgânicos, sendo que as cadeias alifáticas dos surfactantes estão dirigidas para fora (em direção ao solvente orgânico) e as cabeças polares estão dirigidas para o interior, formando um centro polar, que contém uma microfase aquosa, também denominada “piscina aquosa” (Figura 2). Assim, o sistema de micelas pode ser utilizado para solubilizar vários compostos altamente hidrofílicos de moléculas grandes como as proteínas (Lazarova & Tonova, 1999).

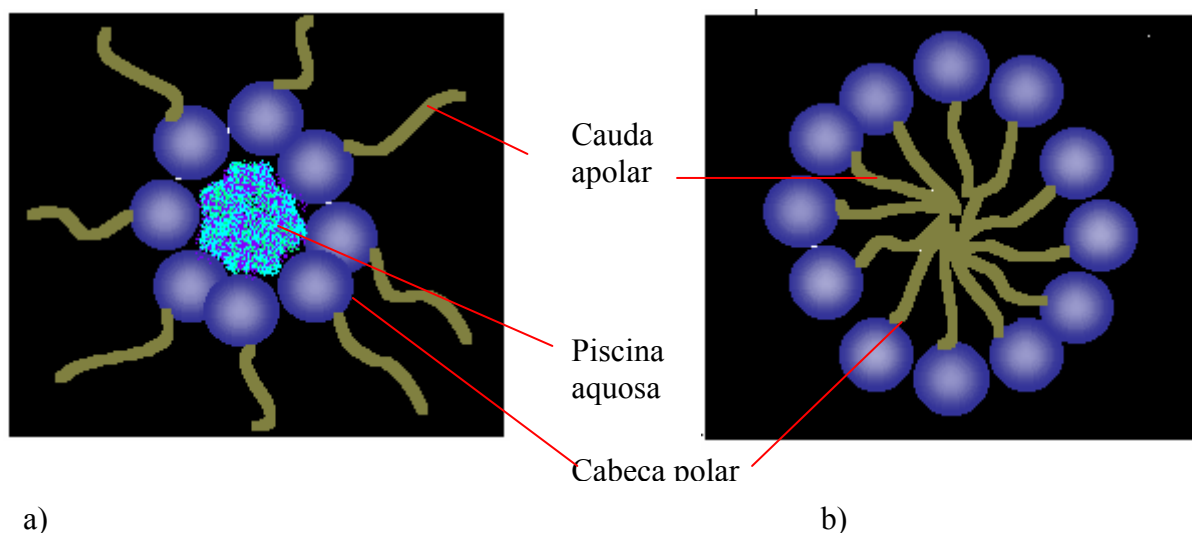


Figura 2. Diferentes formas de micelas: a) micela invertida (em solução orgânica) e b) micela normal (em solução aquosa).

A concentração micelar crítica (CMC) é a concentração mínima de surfactante, necessária para a formação das micelas (Carvalho & Cabral, 2000).

A técnica de extração líquido-líquido, utilizando sistemas de micelas invertidas, envolve duas etapas: a primeira baseia-se na capacidade das micelas invertidas em solubilizar proteínas contidas em uma solução aquosa, no interior da “piscina aquosa” do agregado do surfactante, protegendo-as do solvente orgânico, normalmente em volumes iguais de fases, sob agitação; a segunda, as proteínas solubilizadas no interior da micela são reextraídas para uma nova fase aquosa pela mudança das interações entre as proteínas e as micelas invertidas (Ferreira *et al.*, 2005).

A solubilização seletiva de proteínas pode ser obtida pela manipulação dos parâmetros dos sistemas tanto da fase aquosa como da fase micelar, nomeadamente, o pH e a força iônica da fase aquosa, o tipo e a concentração do tensioativo e a temperatura do sistema (Carneiro-da-Cunha *et al.*, 1996; Nascimento *et al.*, 2002). Através destas

condições favoráveis, uma proteína pode ser transferida para a fase micelar devido às interações eletrostáticas entre a proteína carregada e o grupo polar do tensioativo (Pessoa Jr, 1998) ou, por interações hidrofóbicas, com a cadeia alquil do tensioativo, especialmente, proteínas que possuem regiões hidrofóbicas na sua superfície, tal como as lipases (Vicente *et al.*, 1990; Aires-Barros e Cabral, 1991, Carneiro-da-Cunha, *et al.* 1994). As proteínas extraídas por este método, podem ser posteriormente recuperadas da fase micelar, pelo contato da fase orgânica com uma nova solução aquosa, conduzindo à reextração do produto purificado (Lu *et al.*, 2005).

A reextração da proteína para uma nova fase aquosa é alcançada pela escolha de um novo conjunto de condições, para esta etapa, tais como a força iônica, o pH e a temperatura, o qual desestabiliza as interações responsáveis pela transferência da proteína para fase micelar levando-a para a nova fase aquosa (Carneiro-da-Cunha *et al.*, 1994).

Mais recentemente, sistemas micelares foram aplicados na extração de uma glicose oxidase comercial (Ferreira *et al.*, 2005), de uma protease extracelular do meio de fermentação (Monteiro *et al.*, 2005; Porto *et al.*, 2005) de uma natoquinase do meio de fermentação (Liu *et al.*, 2004), de uma penicilinase (Alves *et al.*, 2003) e na extração de uma lectina de sementes de *Cratylia mollis* (Nascimento *et al.*, 2002).

Em particular, a extração de proteínas utilizando micelas invertidas tem sido alvo de muita atenção por ser uma metodologia atrativa de utilização em larga escala, em processos contínuos (Carneiro-da-Cunha *et al.*, 1997).

1.1.1.1. Efeito do Tipo e da Concentração do Surfactante

Agentes ativo de superfície, comumente denominados de surfactantes ou de tensioativos, são compostos anfipáticos contendo uma parte hidrofílica, cabeça polar, e parte hidrofóbica, cauda apolar ((Kilikian *et al.*, 2000; Carvalho & Cabral, 2000).

Um tensioativo típico possui a estrutura R-X, onde R é uma cadeia de hidrocarbonetos variando de 8-18 átomos (normalmente linear) e X é o grupo cabeça, polar (ou iônico). Dependendo de X, os tensioativos podem ser classificados como não-iônicos, catiônicos, aniônicos ou anfóteros. Um tensioativo catiônico possui em geral a fórmula $R_nX^+Y^-$, onde R representa uma ou mais cadeias hidrofóbicas, X é um elemento capaz de formar uma estrutura catiônica e Y é um contra íon. Em princípio, X pode ser N, P, S, As, Te, Sb, Bi ou halogênios. Dentre os tensioativos aniônicos mais frequentemente utilizados estão aqueles que possuem sais de ácidos carboxílicos (graxos) monopróticos ou polipróticos com metais alcalinos ou alcalinos terrosos, ácidos como sulfúrico, sulfônico e fosfórico contendo um substituinte de hidrocarboneto saturado ou insaturado. Os tensioativos anfóteros são aqueles que possuem ambos os grupos aniônicos e catiônicos, e dependendo do pH da solução e da estrutura, pode prevalecer a espécie aniônica, catiônica ou neutra. Os tensioativos não-iônicos são derivados do polioxietileno e polioxipropileno de compostos como alquil fenol e álcool, ésteres de ácidos graxos, alquilaminas, amidas de álcoois graxos e óxidos de amidas graxas (Maniasso, 2001).

A tabela 1 indica os principais agentes tensioativos empregados para o estabelecimento de ambientes organizados visando a melhoria de desempenho em métodos analíticos.

Tabela 1. Agentes tensioativos de uso comum em química analítica.

TIPO	AGENTE TENSIOATIVO	FÓRMULA
CATIÔNICOS	Brometo de cetiltrimetil amônio (CTAB)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{Br}^-$
	Brometo de dodeciltrimetil amônio (DTAB)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{Br}^-$
	Cloreto de cetilpiridino (CICP)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{N}^+(\text{C}_5\text{H}_5)\text{Cl}^-$
ANIÔNICOS	Dodecil sulfato sódico (SDS)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{SO}_4^-\text{Na}^+$
	Bis (2-etilhexil) sulfosuccinato sódico (AOT)	$[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{CH}(\text{C}_2\text{H}_5)\text{CH}_2\text{OCO}]_2\text{CHSO}_3^-\text{Na}^+$
	Dihexadecil fosfato (DHF)	$[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}]_2\text{PO}_2^-$
NÃO-IÔNICOS	Polioxietileno(9-10) p-tercotil fenol (Triton X-100)	$(\text{CH}_3)_3\text{C}(\text{CH}_2)\text{C}(\text{CH}_3)_2$  $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_{23}\text{OH}$
	Polioxietileno(23) dodecanol (brij 35)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_{23}\text{OH}$
ANFÓTEROS	3-(dodecildimetil amônio) proprano 1-sulfato (SB-12)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{N}^+(\text{CH}_3)_2(\text{CH}_2)_3\text{OSO}_3^-$
	4-(dodecildimetil amônio) butirato (DAB)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{N}^+(\text{CH}_3)_2(\text{CH}_2)_3\text{COO}^-$

Em relação à origem, os tensioativos são classificados em naturais ou sintéticos. Os tensioativos naturais incluem lipídeos simples (p. ex. ésteres de ácidos carboxílicos), lipídeos complexos (ésteres de ácidos graxos contendo fósforo, bases nitrogenadas, e/ou açúcar) e ácidos bilícos tais como ácido cólico e deoxicólico. Embora a maioria dos tensioativos sintéticos sejam quimicamente bastante resistentes, eles apresentam uma certa toxicidade, e por este motivo a utilização dos tensioativos naturais apresentam vantagens, principalmente por serem biodegradáveis. Porém, devido aos elevados custos de produção, apesar destes tensioativos serem obtidos a partir de recursos renováveis, não torna economicamente viável a sua utilização (Maniasso, 2001).

O tipo de tensioativo utilizado para formar micelas invertidas pode influenciar fortemente a solubilização de biomoléculas, principalmente proteínas com atividades biológicas. A solubilização de proteínas em micelas invertidas é geralmente expressa como função do grau de hidratação da micela, representada pelo parâmetro W_o (Luisi *et al.*, 1988). Este parâmetro é definido como a razão entre a concentração molar da água e do surfactante.

$$W_o = [\text{Água}] / [\text{Surfactante}]$$

Dentre os tensioativos mais utilizados no processo de extração líquido-líquido com sistemas de micelas invertidas são o AOT/isooctano e o CTAB / vários solventes, aniônico e catiônico, respectivamente. O AOT permite micelas maiores ($20 < W_o < 115$), enquanto que o CTAB forma micelas menores ($W_o < 3$), e para aumentar o seu tamanho é adicionado um co-surfactante ao sistema, geralmente um álcool alifático como hexanol (Kadam, 1986).

A concentração do surfactante na fase micelar em equilíbrio com a fase aquosa influencia no tamanho da micela, uma vez que aumenta a quantidade de água solubilizada. Por outro lado, como os pesos moleculares dos surfactantes são diferentes, a quantidade de água necessária para se obter um mesmo valor de W_o varia com cada surfactante utilizado, de modo que a quantidade e o diâmetro de cada “piscina aquosa” é diferente para cada surfactante, em um mesmo W_o (Yang & Russell, 1994).

O aumento da concentração do surfactante favorece a solubilização de proteínas na fase micelar, também denominada de fase orgânica (Kuwahara *et al.*, 2001), assim como na recuperação durante a reextração (Jurudilokkul *et al.*, 1998). Por outro lado, uma alta concentração de surfactante pode dificultar a reextração de uma proteína (Carneiro-da-Cunha *et al.*, 1994). Segundo Goklen & Hatton (1986), este comportamento é explicado pelo aumento da quantidade de micelas formadas, que leva a um aumento do complexo proteína-micela. Entretanto, para Leodidis & Hatton (1989), o aumento da concentração de AOT provoca o aumento da razão Na^+ / K^+ no sistema, levando à formação de micelas maiores, onde as proteínas são normalmente menos excluídas devido a limitações de tamanho. Portanto, uma concentração ótima de surfactante corresponde a um limite mínimo que possibilita a melhor combinação nas duas etapas de extração e reextração (Pires *et al.*, 1996).

Estudos recentes reportam que o aumento da concentração de AOT favoreceu a extração de uma notaquinase (Liu *et al.*, 2004) e de uma protease (Monteiro *et al.*, 2005) ambas de meio de fermentação, quando a concentração de AOT foi elevada de 50 para 200 mM.

1.1.1.2. Efeito do pH da Fase Aquosa

O pH da fase aquosa afeta a característica de solubilização da proteína porque ele modifica a distribuição das cargas sobre a superfície da proteína. Uma proteína é caracterizada pelo ponto isoelétrico (pI), que é o valor de pH em que ela apresenta uma carga líquida igual a zero. A valores de pH abaixo deste pI, uma proteína tem carga positiva, enquanto que acima deste pI encontra-se carregada negativamente. Em geral, a obtenção da extração da proteína ocorre por interações eletrostáticas entre a carga da superfície protéica e o grupo de moléculas da cabeça do surfactante (Goklen, 1987; Dekker, 1989).

As proteínas pequenas são solubilizadas em micelas invertidas a um pH próximo do seu pI, ao passo que nas proteínas de peso molecular mais elevado, a diferença entre o pI e o pH ótimo para a solubilização aumenta, não sendo possível, muitas vezes, obter 100% de solubilização da proteína (Pessoa Jr. & Vitolo, 1998).

As atrações eletrostáticas entre a proteína e a cabeça polar do surfactante favoreceram a transferência de uma cutinase (Carneiro-da-Cunha *et al.*, 1996), de uma inulinase (Pessoa Jr & Vitolo, 1998), de uma lectina (Nascimento *et al.*, 2002) de uma penicilina acilase (Alves *et al.*, 2003), e de uma lisozima (Nishii *et al.*, 2004) para a fase micelar, uma vez que estas proteínas apresentaram cargas opostas às do surfactante. Contudo, em alguns casos, a solubilização da proteína na fase micelar pode ocorrer, mesmo quando a proteína apresenta a mesma carga da cabeça polar do surfactante favorecendo as interações hidrofóbicas entre as regiões apolares do surfactante e da proteína (Lazarova & Tonova, 1999).

1.1.1.3. Efeito da Força Iônica e Tipos de Íons

A força iônica e o tipo dos íons da solução aquosa apresentam grande influência no processo de extração/reextração de proteínas, sugerindo uma interação específica dos íons com a proteína e/ou grupo polar do surfactante.

A força iônica da fase aquosa determina o grau de proteção do potencial eletrostático imposto pela superfície carregada. O aumento da força iônica pode causar dois efeitos importantes na extração em sistemas micelares: 1) induzir a um decréscimo da interação eletrostática entre a carga da proteína e a interface carregada do surfactante (Ichikawa *et al.*, 2000); 2) reduzir a repulsão eletrostática entre os grupos polares do surfactante, conduzindo a um decréscimo do tamanho das micelas (Kilikian *et al.*, 2000).

O tamanho do íon é uma outra variável neste processo. Estudos utilizando íons de diferentes tamanhos (Na^+ , K^+ , Mg^{+2} , Ca^{+2}) foram realizados para a extração de diferentes proteínas. Foi verificado que os íons de raios atômicos maiores, como o potássio, causaram uma “blindagem” eletrostática maior e, conseqüentemente, menor solubilização da proteína do que quando utilizados íons de raios menores, como o sódio (Nishiki *et al.*, 1993; Andrews & Haywood, 1994).

Os sistemas de micelas invertidas com AOT não são afetados pelos ânions presentes nos sais, portanto apenas os cátions e suas concentrações influenciam a transferência da proteína na extração e na reextração (Robie & Vera, 1996).

1.2. LECTINAS

As lectinas pertencem a uma classe de proteínas ubíqua na natureza que se ligam reversivelmente a mono e oligossacarídeos de glicoconjugados eucarióticos, não apresentam atividade catalítica e ao contrário dos anticorpos, não são produtos de uma resposta imune (Sharon & Lis, 2001).

A pesquisa por lectinas iniciou-se em 1888 quando Stilmark observou que extratos de mamona (*Ricinus communis* – ricina) aglutinavam eritrócitos porém, o estudo sobre estas proteínas só começou a ganhar ímpeto em 1960 (Sharon & Lis, 1998), abrindo uma vasta área de aplicação para as lectinas (Gabor *et al.*, 2001).

Estão amplamente distribuídas na natureza, sendo isoladas a partir de plantas (Correia & Coelho, 1995), animais (Dunphy *et al.*, 2002), microrganismos (Candy *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003) e organismos simbióticos como líquens (Molina & Vicente, 2000). Um grande número delas tem sido purificada de sementes de leguminosas (Ozeki *et al.*, 1996; Nascimento *et al.*, 2002). As plantas constituem ricas fontes de lectinas e a sua estocagem orgânica ocorre principalmente nas raízes, folhas, flores, frutos, sementes, tubérculos, bulbos, rizomas e na entrecasca (Rudiger, 1998). As lectinas são particularmente abundantes em sementes de leguminosas (Konozy *et al.*, 2003). Porém, tem crescido o interesse por lectinas presentes em tecidos como folhas (Moriyama *et al.*, 2003), tubérculos (Van Damme *et al.*, 2004), entrecasca (Rojo *et al.*, 2003), raízes (Naeem *et al.*, 2001), rizomas (Tateno *et al.*, 2003), flores (Liu *et al.*, 2002) e cotilédones (Oliveira *et al.*, 2002).

As lectinas da entrecasca têm papel importante no metabolismo do nitrogênio de árvores da região temperada (Van Damme *et al.*, 1995) e tem sido sugerida a sua participação no mecanismo de defesa das plantas (Rojo *et al.*, 1997). Outras funções

propostas para estas proteínas incluem a participação no metabolismo dos carboidratos e estocagem de proteínas de reserva (Spilatro *et al.*, 1996; Van Damme *et al.*, 2002).

A presença de lectinas numa amostra pode ser detectada a partir de ensaios nos quais estas interagem com as células, através dos seus sítios de ligação, resultando em aglutinação. Cada molécula de lectina possui um ou mais sítios de ligação para carboidratos. O ensaio de hemaglutinação é o mais comumente utilizado pela simplicidade e facilidade de visualização do fenômeno. Os eritrócitos de origem humana ou de outros animais, podem ser enzimaticamente utilizados (Sato *et al.*, 2000).

A confirmação de que a hemaglutinação é devida à presença da lectina na amostra se dá pela sua inibição com os carboidratos (Freire *et al.*, 2002) ou glicoproteínas (Coelho e Silva, 2000). A especificidade de uma lectina é dada pelo monossacarídeo que em menor concentração, possui maior habilidade para inibir a sua atividade de hemaglutinação ou de precipitação de polissacarídeos e glicoproteínas. Assim, as lectinas são classificadas como específicas apresentando interação com um monossacarídeo, ou não-específicas, apresentando interação com oligossacarídeos (Sharon & Lis, 1990).

Com base nas suas propriedades gerais e localização em diferentes tecidos vegetais, muitas funções fisiológicas para as lectinas já foram sugeridas, tais como proteínas de reserva, no mecanismo de defesa contra microrganismos fitopatogênicos, insetos e animais predadores (Panchel & Irache, 1998; Machuka *et al.*, 1999; Wang & Ng. 2003), assim como mediadores da simbiose planta-microrganismo (Limpens & Bisseling, 2003).

As lectinas desempenham os mais variados efeitos sobre as células, dentre os quais a aglutinação (Olafsen, 1992), a estimulação mitogênica (Maciel *et al.*, 2004), a redistribuição de componentes de superfície celular, a modificação da atividade de enzimas de membrana, a inibição de crescimento fúngico e a toxicidade *in vitro* e *in vivo* (Rojas *et*

al., 1997). Mais recentemente as lectinas têm sido utilizadas para o reconhecimento da gonadotrofina coriônica de células de coriocarcinoma (Kelly *et al.*, 2005). De acordo com alguns estudos, as lectinas de plantas são potentes inibidores *in vitro* de viroses. Algumas delas podem ter um papel antiviral indireto, por exemplo, a presença de lectinas inseticidas pode prevenir e/ou reduzir a difusão de doenças virais transmitidas por insetos (Peumans & Van Damme, 1995).

As lectinas mostraram ser uma inestimável ferramenta para a investigação estrutural e funcional de carboidratos complexos, especialmente glicoproteínas, e para examinar mudanças que ocorrem na superfície celular durante os processos fisiológicos e patológicos, desde a diferenciação celular ao câncer (Sharon & Lis, 2001).

1.3. *Crataeva tapia* L.

Crataeva tapia L. é uma planta da família Capparaceae, conhecida popularmente como trapiá ou cabaceira (Figura 3). É uma árvore típica da Mata Atlântica, que se pode encontrar desde Pernambuco até São Paulo e Minas Gerais (Zona da Mata), na mata pluvial Atlântica e no Pantanal Matogrossense (Lorenzi, 1998). Em Pernambuco foi encontrada no litoral, na zona da mata e em vegetação de caatinga (Costa e Silva., 2002). É uma planta de 5-12 m de altura, dotada de copa arredondada e densa. O seu tronco é geralmente tortuoso e mais ou menos cilíndrico, de 20-40 cm de diâmetro, com casca rugosa. As folhas são compostas trifolioladas, folíolos membranáceos, glabros em ambas as faces. As flores são apícolas e os frutos apresentam polpa carnosa, contendo muitas sementes. Na medicina popular as cascas são usadas como tônico, estomáquico, antidiarréico, febrífugo; o fruto é

usado no combate às infecções do trato respiratório e a entrecasca do caule é usada como hipoglicemiante (Guerrero e Rohledo, 1993).

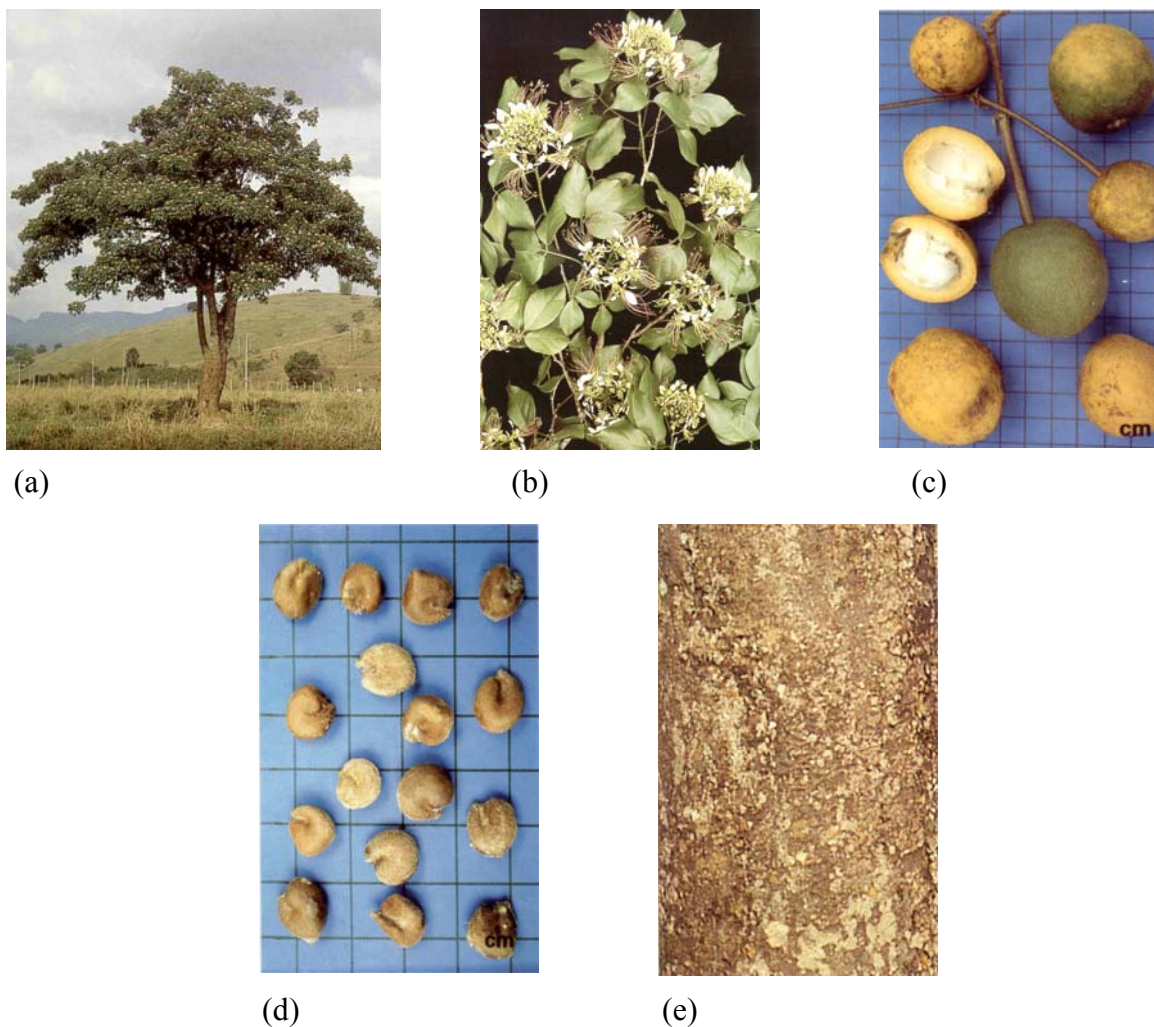


Figura 3. *Crataeva tapia*: árvore (a), folhas e flores (b), fruto (c), sementes (d) e entrecasca (e). Figuras reproduzidas de Costa e Silva (2002).

2. JUSTIFICATIVA

A recuperação e purificação de produtos de extratos brutos são essenciais em muitos processos industriais, uma vez que a natureza química do extrato é muito complexa e o grau elevado de pureza é necessário para vários produtos. O uso de um elevado número de etapas de purificação, e o fato das proteínas serem biomoléculas muito sensíveis à temperatura, ao pH, aos solventes, etc., tem como consequência a obtenção de rendimentos globais baixos podendo os custos de purificação representar 40-90% dos custos totais do processamento das proteínas. Consequentemente, novas técnicas de separação e purificação têm sido objeto de vários estudos.

O emprego de uma técnica alternativa de separação e purificação, como o sistema de extração líquido-líquido utilizando micelas invertidas, vem recebendo uma atenção especial por possibilitar a diminuição de algumas etapas do processo tradicional de purificação e possuir vantagens adicionais por ser um processo de fácil aplicação em larga escala, minimizando problemas encontrados em outras técnicas de separação quando industrializados, principalmente a perda da capacidade de resolução, utilização de equipamentos complexos, incapacidade de operação em sistemas contínuos e limitações econômicas.

Pelo exposto, o presente trabalho visa a extração e purificação da lectinas da entrecasca de *Crataeva tapia* em sistemas micelares de modo a permitir uma utilização mais eficiente e competitiva desta tecnologia.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Extrair e reextrair a lectina purificada por cromatografia de troca iônica (CrataBL) e do extrato bruto (EB) da entrecasca de *Crataeva tapia* L. utilizando o sistema de micelas invertidas, constituídas pelo surfactante dioctilsulfosuccinato de sódio (AOT) em isooctano.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito dos parâmetros: tempo de agitação, força iônica , pH da fase aquosa e concentração do surfactante, na extração da lectina CrataBL (previamente purificada por cromatografia) através do sistema de micelas invertidas constituídas de AOT / isooctano.
- Aplicar as melhores condições de extração / reextração obtidas com a preparação de CrataBL no extrato bruto.
- Caracterizar parcialmente a estrutura da lectina purificada pelo sistema de micelas invertidas.
- Determinar o rendimento do sistema em proteína e em atividade, assim como o fator de purificação da lectina.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

AIRES-BARROS M. R.; CABRAL, J. M. S., 1991. Selective And Purification Of Two Lipases From Chromabacterium Viscosum, Using Aot Reversed Micelles. Biotechnology And Bioengineering, v. 38, p.1302-1307.

_____. 2003. "Biosseparações" IN_ "Biotecnologia: Fundamentos e Aplicações" pp 195-218; Lima N & Mota, M. Portugal, Ed Lidel,

ALPUCHE, J.; PEREYRA, A.; AGUNDIS, C.; ROSAS, C.; PASCUAL, C.; SLOMIANNY, M. C.; VÁZQUEZ L.; ZENTENO, E., 2005. Purification and characterization of a lectin from the white shrimp *Litopenaeus setiferus* (Crustacea decapoda) hemolymph. Biochimica of Biophysica Acta. v. 1724, p. 86-93.

ALVES, J. R. S.; FONSECA, L. P.; RAMALHO, J. M. S.; CABRAL., 2003. Optimisation of Penicillin Acylase Extraction By Aot/ Isooctane Reversed Micellar Systems. Biochemical Engineering Journal, v. 15, p. 81-86.

ANDREWS, B.A.; HAYWOOD, K., 1994. Effect Of Ph, Ion Type And Ionic Strength On Partitioning Of Proteins In Reversed Micele Systems, J. Chromat. A. 668, p. 55-60.

BHOWAL, J.; GUHA, A. K. and CHATTERJEE, B. P., 2005. Purification and molecular characterization of a sialic acid specific lectin from the phytopathogenic fungus *Macrophomina phaseolina*. Carbohydrate Research. v. 340, p. 1973-1982.

CANDY, L.; VAN DAMME, E.J.H.; PEUMANS, W.J.; BOUAOUCHI, L. ERARD, M.; ROUGE, P., 2003. Structural and functional characterization of the GalNAc/Gal-specific lectin from the phytopathogenic ascomycete *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary. Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 308, p. 396-402.

CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G., AIRES-BARROS, M. R., TAMBOURGI, E. B. AND CABRAL, J. M. S., 1997. Continuous extraction of a recombinant cutinase with reversed micelles using a perforated rotating disc contactor, Florence- Italy, Proceedings ECCE, 2583-2586.

CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G.; CABRAL, J. M. S.; AIRES-BARROS, M. R., 1994. Studies on the extraction and back-extraction of a recombinant cutinase in a reversed micellar extraction process. Bioprocess Engineering, 11, p. 203-208.

CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G; MELO, E. P; CABRAL, J. M. S., AIRES-BARROS, M. R., 1996. Liquid-Liquid Extraction Of A Recombinant Cutinase From Fermentation Media With Aot Reversed Micelles. Bioprocess Engineering,, 15, p. 151-157.

CARVALHO, C.M.L.; CABRAL, J.M.S., 2000. Reverse Micelles As Reaction Media For Lipases. Biochimie, 82, p.1063-1085.

COELHO, L. C. B. B.; SILVA, M. B. R., 2000. Simple Method To Purify Miligram Quantities Of Galactose- Especific Lectin From Leaves Of *Bauhinia Monandra*. Phytochemical, Analysis, v. 11, p. 1-6.

CORREIA, M. T. S. AND COELHO, L. C. B. B., 1995. Purification Of A Glucose/Manose Specific Lectin, Isoforma 1, From Seeds Of *Cratylia Mollis* Mart. (Camaratu Bean). *Applied Biochemistry An Biotechnology*, p. 261-73.

COSTA E SILVA, M. B. Diversidade e distribuição da planta Capparaceae Juss no Estado de Pernambuco. In: TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. (orgs.). Diagnóstico da biodiversidade de Pernambuco. Recife: Ed. Massangana. Secretaria de Ciência e Tecnologia e Meio Ambiente, 2002. v. 1, p. 305-312, cap. 19.

DATTA, K.; USHA, R.; DUTTA, S. K.; SINGH, M. A., 2001. A comparative study of the winged bean protease inhibitors and their interaction with proteases. *Plant Physiology and Biochemistry*. v. 39, p. 949-959.

DEKKER, M.; HILHORS, R.; LAANE, C., 1989. Isolation Enzymes By Reversed Micelles. *Analytic Biochemistry*, v. 178, p. 217-226.

DÖVYAP, Z., Bayraktar, e., mehmetoglu, Ü. 2006. amino acid extraction and mass transfer rate in the reverse micelles system. *Enzyme and Microbial Technology*. .v. 38, p. 557-562.

DUNPHY, J. L.; BARCHAM, G. J.; BISCHOF, R. J.; YOUNG, A. R.; NASH, A.; MEEUSEN, E. N. T., 2002. Isolation and characterization of a novel eosinophyl-specific galectin released into the fungus in response to allergen challenge. *The Journal of Biological Chemistry*. v. 277, n.17, p. 14916-14924.

FERREIRA, L.F.P., TAQUEDA, M.E., VITOLO, M., CONVERTI, A., PESSOA JR., A., 2005. Liquid-liquid extraction of commercial glucose oxidase by reversed micelles. J. Biotechnol. 116, 411-416.

FREIRE, M. G. M.; GOMES, V. M.; CORSINI, R. E.; MACHADO, O. L. T.; DE SIMONE, S. G.; NOVELMO, J. C.; MARANGONI, S.; MACEDO, M. L. R., 2002. Isolation And Partial Characterization Of A Novel Lectin From *Talisia Esculenta* Seeds That Interferes With Fungal Growth. Plant Physiology And Biochemistry, v. 40, p. 61-68.

GABOR, F.; KLAUSEGGER, U.; WIRTH, M., 2001. The Interaction Between Wheat Germ Agglutinin And Other Plant Lectins With Prosta Cancer Cells Du-145. International Journal Of Pharmaceutics, v. 221, p. 35-47.

GOKLEN, K.; HATTON, T. A., 1986. Liquid Liquid Extraction Of Protein Using Reversed Micelles, In: Proceeding, Isec. p. 587-595.

GOKLEN, K.; HATTON, T. A., 1987. Liquid-Liquid Extraction Of Low Molecular Weight Proteins By Selective Solubilization In Reversed Micelles. Sep. Sci. Technol., 22, p. 831-841.

GUERRERO, R.O; ROHLEDO, L., 1993. Endemic Plants of Puerto Rico: Brine Shrimp Lethality and Antibacterial Activity. *P R Health Sci J*, 12(4), 259-62

HEU, M. S.; KIM, H. R.; PYEUN, J. H., 1995. Comparison of trypsin and chymotrypsin from the viscera of anchovy, *Engraulis japonica*. Comparative Biochemistry and Physiology, v. 112(B), n.3, p. 557-567.

ICHIKAWA, S.; SUGIURA,S.; NAKAJIMA,M., 2000. Formation of biocompatible reversed micelles systems using phospholipids. Biochemical Engineering Journal, 6,p.193-199.

JURUDILOKKUL, S.; POPPENBORG, L. H.; STUCKEY, D. C., 1999. Backward Extraction Of Reversed Micelles Encapsulated Proteins Using A Couterionic Surfactant. Biotechnology Bioengineering, 52, p. 594-601.

KADAM, K. I., 1986. Reversed Micelles As A Bioseparation Tool. Enzyme Microb. Technology, p. 8266-8273.

KAWAGISHI, H.; TAKAGI, J.; TAIRA, T.; MURATA, T.; USUI, T., 2001. Purification And Characterization Of A Lactin From The Mushrcom *Mycoleptodonoides Aitchsonil* . Phytochemistry, v. 56, p. 53-58.

KELLY, L. S.; KOZAK, M.; WALKER, T.; PIERCE, M.; PUETT, D., 2005. Lectin immunoassays using antibody fragments in detect glycoforms of human chorionic gonadotropin secreted by choriocarcinoma cells. Analytical Biochemistry. v. 338, p. 253-262.

KILIKIAN, B. V.; BASTAZIN, M. R.; MINAMI N. M; GONÇALVES, E. M. R. ; JUNIOR, A. P., 2000.. Liquid- Liquid .By Reversed Micelles In Biotechnological Processes. Brazilian Journal Of Chemical Engineering, v.17, n. 1, p. 29-38.

KONOZY, E. H. E.; BERNARDES, E. S.; ROSA, C.; FACA, V.; GREENE, L. J.; WARD, R. J., 2003. Isolation, purification and physiochemical characterization of a D-galactose-binding lectin from seeds of *Erythra speciosa*. Archives of Biochemistry and Biophysics. v. 410, p. 222-229.

KUWAHARA, Y.; GOTO, A.; IBUKI, Y; YAMAZAKI, K; GOTO, R., 2001. Catalytic Activity Of Hexokinase In Reversed Micelles. Journal Of Colloid And Interface Science, v. 233, p. 190-196.

LAAKSONEN, L. E ROSENHOLM, J.B., 1993. Molecular dynamics simulations of the water / octanoate interface in the presence of micelles. Chem. Phys. Lett. 216, p. 42.

LAZAROVA, Z ;TONOVA, K., 1999. Integrated Reversed Micellar Extraction And Stripping Of α -Amylase, Biotechnology And Bioengineering, v.63, p. 583-591.

LEODIDIS, E. B.; HATTON, T. A., 1989. Specific Ion Effects In Electrical Double Layers: Selective Solubilization Of Cations In Aerosol-Oil Reversed Micelles. Langmuir, v.5, p. 741-753.

LIMPENS, E.; BISSELING, T., 2002. Singnaling in symbiosis. Current Opinion in Plant Biology. v. 6, p. 343-350.

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

LIU, J.-G., XING, J.-M., SHEN, R., YANG, C.-L., LIU, H.-Z., 2004. Reverse micelles extraction of nattokinase from fermentation broth. Biochem. Eng. J. 21, 273-278.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Vol. 2-2 ed. – Nova Odessa, SP: Ed. Plantarum, 1998.

LU, Q.; CHEN, H.; LI, K.; SHI, Y., 1998. Transport between an aqueous phase and a CTAB / hexanol-octane reversed micellar phase, Biocmemistry Engineering J. 1, p. 45-52.

LUISI, P. L.; BONNER, F. J.; PELLEGRINI, A.; WIGET, P. E WOLF, R., 1979. “Micellar Solubilization Of Proteins In Aprotic Solvents And Their Sptroscopic Characterization”. Helv. Chim. Acta, 62, p. 740-752.

LUISI, P. L.; HENNINGER, F.; JOPPICH, M.; DOSSENA, A.; CASNATI, G., 1977. Solubilization And Spectroscopic Proprieties Of A-Chymotrpsin In Cyclohexane. Bichem. Biophys. Res. Comm., 74, p. 1384-1389.

MACHUKA, J. S.; OKEOLA, O. G.; ELS, J. M. V. D.; CHRISPEELS, M. J.; LEUVEN, F. V.; PEUMANS, W. J., 1999. Isolation And Partial Characterization Of Galactose-Specific Lectins From African Yam Beans, *Sphenostyles Stenocarda* Harms. *Phytochemistry*, v. 51, p. 721-728.

MACIEL, E.V.M.; ARAUJO-FILHO, V.S. NAKAZAWA, M.; GOMES, Y.M.; COELHO, L.C.B.B.; CORREIA, M.T.S. Mitogenic activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes. *Biologicals, articles in press*.

MANIASSO, N., 2001. Ambientes Micelares em Química Analítica, *Quim. Nova*, v. 24, n. 1, p.87-93.

MARTINEK, K.; LEVASHOV, A. V.; KLYACHKO, N. L.; PANTIN, V. I. E BEREZIN, L. V., 1978. "Catalysis By Water Soluble Enzymes In Organic Solvents. Stabilization Of Enzymes Against Denaturation (Inactivation) Trough Their Inclusion In Reversed Micelles Of Surfactants". *Doklad. Akad. Nauk. Sssr (Engl. Edit)* 236, p. 920-923.

MOLINA, M. C.; VICENTE, C., 2000. Purification and characterization of two isolectins with arginase activity from the lichen *Xanthoria parietina*. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. v. 33, n. 4, p. 300-307.

MONTEIRO, T. I. R. C.; PORTO, T. S.; CARNEIRO-LEÃO, A. M. A.; SILVA, M. P. C.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G., 2005. Reversed micellar extraction of an extracellular

protease from *Nocardiosis* sp. fermentation broth. Biochemical Engineering Journal. v. 24, p. 87-90.

MORIYAMA, H.; IIZUKA, T.; NAGAI, M.; MIYATAKA, H.; SATOH, T., 2003. Antiinflammatory activity of heat-treated *Cassia alata* leaf extract and its flavonoid glycoside. Yakugaku Zasshi. v 123, p. 607-611.

NAEEM, A.; KHAN, R. H.; VIKHRAM, H.; AKIF, M., 2001. Purification of *Cajanus cajan* root lectin and its interaction with rhizobial lipopolysaccharide as studied by different spectroscopic techniques. Archives of Biochemistry and Biophysics. v. 396, p. 99-105.

NAGAYAMA, K.; MATSU-URA, S. L.; DOE, T. ; IMAI, H. J., 1998. Kinetic characterization of esterification catalyzed by *Rhizopus delemar* lipase in lecithin AOT microemulsion systems, J. Mol. Catal. B: Enzymatic, 4, p. 25-32.

NASCIMENTO C. O., COELHO L. C. B. B., CORREIA M. T. S. & CARNEIRO-DA-CUNHA M. G., 2002. Liquid-Liquid Extraction Of Lectin From *Cratylia Mollis* Seeds Using Reversed Micelles. Biotechnology Letters, 24, 905-907.

NISHII, Y.; KISHI, Y.; ITO, M.; MORITA, Y.; KANOB, A.; SHINTANI, M.; KINUGASA, T.; NII, S.; TAKAHASHI, K., 2004. Effect of cation species on equilibrium of reversed micellar extraction of lysozyme. 37, p 161-167.

NISHIKI, T.; SATO, I.; MUTO, A.; KATAOKA, T., 1998. Mass transfer characterization in forward and back extraction of lysozyme by AOT-isooctane reverse micelles across flat liquid-liquid interfaces. *Biochemistry Engineering Journal*. v. 1, p. 91-97.

NISHIKI, T.; SATO, I.; KATAOKA, T.; KATO, D. 1993. Partitioning Behavior And Enrichment Of Proteins With Reversed Micellar Extraction: I. Forward Extration Of Protein From Aquoues To Reversed Micellar Phase. *Biotechnology Bioengineering*, v.42, p. 596-600.

OLAFSEN, J. A., FLETCHER, T. C. AND GRANT, P. T., 2002. Agglutinin activity in pacific oyster (*Crassostrea gigas*) hemolymph following in vivo *Vibrio anguillarum* challenge. *Developmental & Comparative Immunology*. v. 16, p. 125-138.

OLIVEIRA, J. T .A.; MELO, V. M. M.; CAMARA, M. F. L.; VASCONCELOS, I. M.; BELTRAMINI, L. M.; MACHADO, O. L. T.; GOMES, V. M.; PEREIRA, S. P.; FERNANDES, C. F.; NUNES, E. P.; CAPISTRANO, G. G. G.; MOSTEIRO-MOREIRA, A. C. O., 2002. Purification and physicochemical characterization of a cotyledonary lectin from *Luetzelburgia auriculata*. *Phytochemistry*. v. 61, p. 301-310.

OZEKI, M.; KAMEMURA, K.; MURIYAMA, K. ITOH, Y.; FURUICHI, Y.; UMEKAWA, H.; TAKAHASHI, T., 1996. Purification and characterization of a lectin from *Amaranthus hypochondriacus* var. Mexico seeds . *Bioscience Biotechnology Biochemistry*. v. 60, n.12, p. 2049-2051.

PESSOA Jr., A; VITOLO., 1998. Recovery Of Inulinase Using Bdbac Reversed Micelles. *Process Biochemistry*, v. 3, n. .33, p. 291-297.

PEUMANS, W. J. & VAN DAMME, E. J. M., 1995. Lectins as plant defense proteins. *Plant. Physiol.* v. 109, p. 347-352.

PIRES, M. J. L.; AIRES-BARROS, M. R.; CABRAL, J. M. S., 1996. Liquid-Liquid Extraction Of Protein With Reversed Micelles, *Biotechnology Progress.*, 12, p. 290-301.

PONCHEL, G., IRACHE, J. M., 1998. Specific and non-specific bioadhesive particulate systems for oral delivery to the gastrointestinal tract. *Advanced Drug Delivery Reviews.* v. 34, p. 191-219.

PORTO, T.S., MONTEIRO, T.I.R., MOREIRA, K.A., LIMA-FILHO, J.L., SILVA, M.P.C., PORTO, A.L.F. AND CARNEIRO-DA-CUNHA, M.G., 2005. Liquid-liquid extraction of an extracellular alkaline protease from fermentation broth using aqueous two-phase and reversed micelles systems. *J. Microbiol. Biotechnol.* 21, 655-659.

RABIE, V. H.; VERA, J. H., 1996. Generalised water uptake modelling of water-in-oil microemulsions. New experimental results for aerosol-ot-isooctane-water-salts systems. *Fluid Phase Equil.*, 122:169-86.

ROJO, M. A.; CITORES, L.; JIMÉNEZ, P.; FERRERAS, J. M.; ARIAS, F. J.; MENDEZ, E. GERBES, T., 2003. Isolation and characterization of a new d-galactose-binding lectin from *Sambucus racemosa* L. Protein Pept. Letters. v. 10, p. 287-293.

ROJO, M. A.; YATO, M.; ISHII-MINAMI, N.; MINAMI, E.; KAKU, H.; CITORES, L.; GIBES, T.; SHIBUYA, N., 1997. Isolation cDNA cloning, biological properties, and carbohydrates binding specificity of siebolding-b, a type II ribosome-inactivating protein from the bark of Japanese elderberry (*Sambucus sieboldiana*). Archives of Biochemistry and Biophysics. v. 340, n. 2, p. 185-194.

ROMERO, J. F.; GARCIA, L. A. SALAS, J. A.; DÍAZ, M.; QUIRÓS, L. M., 2001. Production, purification and characterization of two extracellular proteases from *Serratia marcescens* grown in whey. Process Biochemistry, v. 36, p. 507-515.

RUDIGER, M., 1998. Plant lectin-more than just tools for glycoscientists occurrence, structure, and possible functions of plant lectins. Acta Anatomica (Basel). v. 181, p. 130-152.

SATO, Y.; MURAKAMI, M.; MIYAZAWA, K.; HORI, K., 2000. Purification And Characterization Of A Novel Lectin From A Freshwater Cyanobacterium, *Oscillatoria Agardhii*. Comparative Biochemistry And Physiology Part B, v. 125, p. 169-177.

SEADER, J.P.; HENLEY, J. E., 1998. Separation Process Principles, New York: John Wiley & Sons, p.886.

SEBASTIÃO, M. J., CABRAL, J. M. S. AND AIRES-BARROS, M. R., 1996. Improved purification protocol of a *Fusarium solani pisi* recombinant cutinase by phase partitioning in aqueous two-phase systems of polyethylene glycol and phosphate. *Enzyme and Microbial Technology*, 18, 251-60.

SHARON, N.; LIS, H., 1990. Legume lectins – a large family of homologous proteins. *FASEB Journal*. v. 4, p. 3198-3208.

SHARON, N.; LIS, H., 2001. The Structural Basis For Carbohydrate Recognition By Lectins. *The Molecular Immunology Of Complex Carbohydrates – 2*. Taiwan: Kuwer Academic / Plenum Publishers, p. 1-19.

SPILATRO, S.R.; COCHRAN, G.R.; WALKER, R.E.; CABLISH, K.L.; BITTNER, C.C. , 1996. Characterization of a new lectin of soybean vegetative tissues. *Plant Physiology*. v. 110, p. 825-834.

TATENO, M.; WINTER, H. C.; PETRYNIAK, J.; GOLDSTEIN, I. J., 2003. Purification, characterization molecular cloning and expression of novel members of Jacalin-related lectins from rhizomes of the true fern *Plebidium aureum* (L) J. Smith (Polypodiaceae). *Journal Biology Chemistry*. v. 278, p. 10891-10899.

VAN DAMME, E. J. M.; BARRE, A.; BEMER, V.; ROUGE, P.; VAN LEUVEN, F.; PEUMANS, W. J., 1995. A lectin and a lectin-related protein are the two most prominent

proteins in the bark of yellow wood (*Cladrastis lutea*). Plant Molecular Biology. v. 29, p. 579-598.

VAN DAMME, E. J. M.; HAUSE, B.; HU, J.; BARRE, A.; ROUGE, P.; PROOST, P.; PEUMANS, W. J., 2002. Two distinct jacalin-related lectins with a different specificity and subcellular location are major vegetative storage proteins in the bark of the black mulberry tree. Plant Physiology. v. 130, p. 757-759.

VERDAJNANANDA, S.; CHOWDHURY, R.; BHATTACHARYA, F., 2001. Mathematicaç modellium of the washing phase of a semi-batch affinity ultrafiltration system for enzyme separation. Biochemical Engineering Journal, v. 9, p. 41-48.

WANG, H. X.; NG, T. B., 2003. Putification and castamolin a novel antifungal protein from Chinese chestnuts. Protein Expression and Purification. v. 32, p. 44-51.

WANG, H.; NG, T. B.; LIU, Q., 2003. A novel lectin from the wild mushroom *Polyporus adusta*. Biochemical and Biophysical Research Communications. v. 307, p. 533-539.

YANG, F.; RUSSEL, A. J., 1994. Two-Step Biocatalytic Conversion Of An Ester To An Aldehyde In Reversed Micelles. Biotechnology And Bioengineering, v. 43, p. 232-241.

ZHAO, C.; SUN, H.; TONG, X.; QI, Y., 2003. An antitumor lectin from the edible mushroom *Agrocybe aegerita*. Biochemistry Journal. v. 374, p. 321-327.

5. ARTIGO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY

Liquid-liquid extraction of a lectin from *Crataeva tapia* bark using reversed micelles

**Liquid-liquid extraction of a lectin from *Crataeva tapia* bark using
reversed micelles**

C.O. Nascimento ^{1,2}, R. M.P.B. Costa^{1,2}, R.M.S. Araújo¹, L.C.B.B. Coelho¹, P.M.G.
Paiva ¹, M.T.S. Correia ¹, M.G. Carneiro-da-Cunha ^{1,2} *

¹*Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de
Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego s/n, 50.670-420, Recife, PE, Brazil,*

²*Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA/UFPE, Recife, PE, Brazil*

**Author for correspondence (Fax: +55.81.21268576; E-mail: mgcc@ufpe.br)*

Abstract

A lectin from *Crataeva tapia* bark was purified using reversed micelles of sodium di(2-ethylhexyl)sulfosuccinate (AOT) in isooctane. The effect of pH, ionic strength, AOT concentration and agitation time was investigated. High extraction (70%) of the protein was achieved at pH 5.5 with 10 mM citrate phosphate buffer solution containing 30 mM NaCl, with 5 min of agitation. Protein was recovered (80%) from a reversed micellar phase (5 mM AOT/isooctane) into a 10 mM sodium citrate buffered solution at pH 5.5 containing 1000 mM KCl and 5% (v/v) butanol, with 5 min of agitation. The optimal conditions for direct extraction of lectin from crude extract led to a yield of protein and activity of 56% and 53%, respectively. Crude extract and purified lectin by reversed micelles system were applied on Sephacryl S-300 column. Comparison of gel filtration chromatographic profiles indicates the efficiency of reversed micellar system to lectin isolation. The oligomeric native of lectin was detected by SDS-PAGE and gel filtration chromatography

Keywords: Liquid-liquid extraction; Reversed micelles; AOT, Purification; Lectin; *Crataeva tapia*.

1. Introduction

The liquid-liquid extraction using reversed micelles has demonstrated to be a potential method to separate biological products, among them proteins which are solubilized in organic solvents with surfactants, while maintaining their functional properties; proteins can be transferred between an aqueous solution and a reversed micellar organic phase (Monteiro *et al.*, 2005).

Reversed micellar extraction is a separation process which can be applied in downstream processing for recovery and purification of valuable biological products. The process can be performed by a forward extraction of the target protein or contaminants, from an aqueous solution to a reversed micellar organic phase, and a back-extraction, by which the biomolecules are released from micelles and transferred to a fresh aqueous phase (Carneiro-da-Cunha *et al.*, 1996).

The major factors determining protein solubilization in reversed micellar systems are electrostatic interactions between the solutes and heads as well as aggregation properties of surfactant. The protein extraction process from the aqueous phase by reversed micelles and its back extraction to an aqueous solution is critical by dependent on several interrelated parameters. Selective solubilization of proteins can be achieved by manipulating parameters of the system both in micellar and aqueous phase nature of organic solvent, type and concentration of surfactant and temperature (Pires *et al.*, 1996). In recent years, the extraction and purification of protein using reversed micellar systems have been reported, such as extraction of an extracellular protease (Monteiro *et al.*, 2005), glucose oxidase (Ferreira *et al.*, 2005), chitanases (Chen *et al.*, 2005) and nattokinase (Liu *et al.*, 2004).

Lectins are ubiquitous proteins in nature that can reversibly bind to mono, oligo, polysaccharides and glycoconjugates; they do not present catalytic activity and, unlike antibodies, are not products of immune reply. These proteins are used in the studies of biochemistry, cell biology, immunology, glycobiology and have widespread applications in biomedical researches, such as in structural and functional investigations of complex carbohydrates, to analyze changes at cellular surface during physiological and pathological processes (Sharon and Lis, 2001), treatment of pre-cancerous conditions (Wroblewski *et al.*, 2001), biological insecticide (Yáskara *et al.*, 2005).

Seeds, mainly, tuber and bark have been sources of plant lectins which showed biological activity. In Northeast Brazil *Crataeva tapia* bark infusions have been used to control blood glycemic level (Costa e Silva, 2002).

This work describes the extraction and back-extraction of a lectin from *Crataeva tapia* bark, CrataBL, using a reversed micellar system of an anionic surfactant sodium di(2-ethylhexyl) sulfosuccinate (AOT) in isooctane. The pH, ionic strength, surfactant concentration and agitation time, factors that affect the performance of the reversed micellar system, were investigated in this study.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Sodium di(2-ethylhexyl) sulfosuccinate (AOT) was from Sigma (USA); isooctane, butanol, glutaraldehyde, analytical grade was obtained from Merck (Germany);

bicichoninic acid (BCA) was obtained from Pierce. All other chemicals were of analytical grade.

2.2. Lectin preparation

Crataeva tapia bark was collected in the region of Recife city (Pernambuco, Brazil) and the extract [10% (w/v) in 150 mM NaCl] was obtained by trituration, agitation overnight at 4 °C, filtration on gaze and centrifugation (4,000 x g for 15 min); supernatant was denominated crude extract (CE). The lectin purified by ionic exchange chromatography (CrataBL) was a kind gift of Regina M. S. Araújo, M.Sc.

2.3. Protein extraction and back-extraction with reversed micelles

The reversed micellar system was constituted by anionic surfactant, sodium di(2-ethylhexyl) sulfosuccinate (AOT) in isooctane. Extraction and back-extraction procedures were performed as follows: 1) to buffered lectin preparations (3 ml; NaCl, KCl or CaCl₂) was added to a final concentration ranging from 30 to 300 mM) an equal volume of micellar phase (3 ml; AOT in isooctane at a concentration range of 5-100 mM) was added and both phases were stirred for 5 - 20 min for protein extraction; mixture was then centrifuged for 5 min at 3,000 x g, for phase separation; 2) after extraction, separated micellar phase (2 ml), containing solubilized protein, was added to an equivalent volume of buffered aqueous solution at different pH (citrate phosphate 10 mM, pH 5.0 - 6.0 and sodium phosphate 10 mM, pH 7.0) containing 50 - 1000 mM KCl and to the system was added 5% (v/v) of butanol. Mixture was stirred for 5 min, centrifuged for 5 min at 3,000 x g

for phase separation and the lectin was recovered in new aqueous phase. The parameters agitation speed (900 rpm), temperature (25 °C) and protein concentration (0.374 mg/ml) were maintained constant in all experiments.

2.4. Protein assays

The protein content in the aqueous and organic phases was spectrophotometrically determined using the bicinchoninic acid according to Smith *et al.* (1985), with bovine serum albumin as standard, at a range of 0 – 600 µg/ml.

2.5. Determination of hemagglutinating activity

The determination of hemagglutinating activity (HA) in aqueous phase was performed in microtitre plates, using a rabbit erythrocyte suspension (2.5%, v/v) treated with glutaraldehyde (Correia and Coelho, 1995). The determination of protein activity in back-extraction aqueous phase was carried out after dialysis due to interference of salt concentration and butanol used. HA was determined by the function log.

2.6. Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)

Electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulphate (SDS-PAGE) was performed on 10 % (w/v) gel according to Laemmli (1970). Polypeptide bands of lectin (150 µg of protein) and standards (bovine serum albumin, 66 KDa; ovalbumin, 45 KDa;

glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, 36 KDa; carbonic anhydrase, 29 KDa; trypsinogen, 24 KDa; trypsin inhibitor, 20 KDa; α -lactalbumin, 14.2 KDa from Sigma, USA) were stained with Coomassie Brilliant Blue. PAGE for native basic [7.5 % (w/v) gel] and acidic [12 % (w/v) gel] proteins were made according to Reisfeld *et al.* (1962) and Davis (1964), respectively.

2.7. Gel filtration chromatography

Lectin extracted by reversed micelles was chromatographed on gel filtration Hiperp 16/60 Sephacryl S-300 column (16 mm x 60 cm); Akta FPLC system (Amersham Pharmacia Biotech, Sweden) pre-equilibrated at 24 °C with 0.5 M NaCl. Samples (2.0 ml; 1 mg of protein) were injected and eluted with same solution at a flow rate of 1.0 ml min⁻¹. The standards (Sigma, USA) similarly chromatographed were bovine serum albumin (66 KDa), fetuin (64 KDa), ovalbumin (45 KDa) and trypsin inhibitor type III-O chicken (28 KDa).

3. Results and discussion

3.1. Effect of contact time on the extraction of CrataBL

The effect of contact time during forward extraction of CrataBL (10 mM citrate phosphate buffer, pH 5.5, containing 30 mM NaCl) in reversed micelles of AOT (5 mM) was firstly investigated at a time ranging from 5 to 20 min. Protein extraction remained constant (100 %) in the whole range of tested contact time. The equilibrium seems to be

established at a short contact time of 5 min after the initiation of extraction, making easy total protein transfer to organic phase. Similar result was reported for the extraction of a nattokinase from fermentation broth, when contact time was prolonged from 8 to 12 min (Liu *et al.*, 2004). In general, too long extraction time increases the chance for the protein to contact the solvent, leading to protein denaturation and affecting performance. Therefore, the extraction time was fixed at 5 min for subsequent experiments.

3.2. Effect of ionic strength on the extraction of CrataBL

The influence of ionic strength on the extraction of CrataBL (aqueous phase), at pH 5.5 in reversed micelles of AOT (5 mM) in isooctane was evaluated. Different salts (KCl, NaCl and CaCl₂) were used with a concentration range from 30 to 300 mM. The percentage of protein transferred (100 %) remained constant in the whole range of tested concentrations. The main effect of ionic strength is that it reduces electrostatic repulsion among surfactant head groups, resulting in size decrease of reverse micelles at higher ionic strength (Monteiro *et al.*, 2005). The size of protein molecule also influences its uptake by reversed micelles. In this case, CrataBL (40 KDa) probably was solubilized inside micelle independently of salt type and concentration used. The 30 mM NaCl was selected for further experiments since lectin preparation (item 2.1) was performed with NaCl.

3.3. Effect of pH on the extraction of CrataBL and CE

The major factors determining protein solubilization in reversed micellar systems are electrostatic interactions among biomolecules and charged surfactant heads as well as

the aggregation properties of surfactant. The influence of pH on lectin extraction in reversed micelles of AOT (5 mM) was studied. The pH of aqueous phase (CrataBL and CE) was varied at pH 3.0 – 12.0, using different types of buffer systems according to their pKa value (Fig. 1). The results for CrataBL showed that protein transferred to micellar phase was found to be stable (100 %) within the pH range of 3.0 – 5.5 and decreased gradually up to pH 12.0, whereas for CE a discrete increase on the extraction occurred within the same pH range, with a maximum of 70 % at pH 5.5 and decreased for higher pH values. Similar situation was reported to *Cratylia mollis* seed lectin by Nascimento *et al.* (2002), where the maximum extraction was obtained at pH 5.0. This behaviour suggests that pH 5.5 was more selective, since it was possible to transfer ca. 100 % and 70 % of CrataBL and lectin of CE, respectively, probably due to favorable attractive electrostatic interactions between positively charged lectin at pH 5.5 (basic protein) and negatively charged surfactant heads. For smaller proteins, using anionic surfactants at pH conditions below the protein pI their transfer from aqueous to micellar solution is favoured (Pessoa Jr & Vitolo, 1998). Therefore, the selected pH used in further studies was pH 5.5.

3.4. Effect of AOT concentration on the extraction CrataBL and CE

The size of micelles relative to the size of protein is critical to the ability of micelles to solubilize proteins. The influence of AOT concentration on lectin extraction (CrataBL and CE) under 30 mM of NaCl and pH 5.5 conditions, was evaluated over an AOT concentration range of 5 – 100 mM (figure 2). The results showed that CrataBL was totally transferred (100%) in all studied concentrations, whereas for CE extraction remained at the level of 70% over the AOT concentration range of 5 – 50 mM with a slight decrease of 5 %

in AOT concentration of 100 mM. It is well known that increase in the amount of surfactant in organic phase leads to an increase of protein solubilization due to the increase of the amount of surfactant aggregation and/ or the increase of size of reverse micelles (Nishiki *et al.*, 2000). Nevertheless, no significant differences were found on extraction over AOT concentration range of 5 – 50 mM. These results could be explained by the size of lectin associated to a strong interaction between protein and surfactant. Similar situation was reported on extraction of a lipase from *Penicillium citrinum* under an AOT concentration range of 100 – 350 mM (Krieger *et al.*, 1997). The 5 mM AOT concentration was selected for the following experiments.

3.5. Effect of pH and ionic strength on the back-extraction of CrataBL and CE

In reverse micellar extraction processes, particularly in the back-extraction step, the micellar interaction has to be considered one important factor and more difficult to accomplish (Dungan *et al.*, 1991). Initially, the study on lectin back-extraction using different pH and ionic strength values did not allow any recuperation, probably due to strong electrostatic interactions between positive lectin charges and negative charges of AOT. Similar behavior was reported for back-extraction of a nattokinase from fermentation broth (Liu *et al.*, 2004). The presence of alcohol molecule (propanol, butanol, pentanol, hexanol and octanol) can affect micellar system modifying whole interactions (Hong and Kuboi, 1999). A small amount of alcohol added to an organic solution improves the back-extraction behavior of proteins depending on the concentration and alcohol species (Lee *et al.*, 2005). Also, the presence of butanol in the system may change the water properties inside reversed micelles (Porto *et al.*, 2005). In all experiments of back-extraction step of

this study was then added 5 % of butanol. Figure 3a illustrates influence of ionic strength and pH on back-extraction of CrataBL, where was observed that it was possible to get recuperations of protein to a new aqueous phase only with concentrations above 200 mM KCl for all pH values, except for pH 7.0 which showed a recovery of 5 % at 200 mM of KCl. The back-extraction increased with the increase of pH from 5.0 to 7.0, with a maximum of back-extraction (47.5 %) for pH 6.0 and 7.0 containing 1000 mM KCl. Therefore, the higher hemagglutinating activity (50 %) was obtained at pH 5.5 containing 1000 mM KCl with 45.25 % of protein recovery (Figure 3b). This results suggest that the pH 5.5 was more selective for the back transfer of lectin.

Similar behavior was observed for the CE lectin. Figure 4a illustrates that the amount of protein back-extracted to new aqueous phase increased with the increase of pH value and KCl concentration with a maximum of recovery (85.25 %) at pH 7.0 containing 1000 mM KCl however, the higher purification factor (1.7), illustrated in the Figure 4b, was obtained at pH 5.5 containing 1000 mM KCl which only yielded 77.76 % of back-extraction. These results suggest that the increase of percentage of transferred protein to a new aqueous phase when pH was increased from 5.5 to 7 was not lectin content but other contaminant proteins. Similar purification factors of protein, 1.8 and 1.5, using micellar systems, were reported for an extracellular alkaline protease from fermentation broth (Porto *et al.*, 2005) and xylanase from fermentation broth (Rodrigues *et al.*, 1999), respectively. The presence of alcohol (butanol) in the system permitted the back-extraction of lectin from a reversed micellar phase to an aqueous phase, probably for some structural factor change of the micelles, corroborated with Liu *et al.* (2004) and Lee *et al.* (2005). The optimal conditions for direct extraction of lectin from crude extract led to a yield of protein and activity of 56 % and 53 %, respectively.

3.6. Partial characterization of Structure of purified lectin by reversed micellar system

The purified lectin by reversed micellar system was electrophoresed. PAGE for native basic protein revealed only a single lectin band (Fig. 6b); no band was detected for acidic proteins. SDS-PAGE showed two polypeptide bands of molecular mass 21 KDa and 40 KDa (Fig. 6a).

Evaluation of purified lectin by reversed micelles system by gel filtration chromatography (Fig. 5b) revealed two peak protein leaves of 40 KDa and 29 KDa. When the crude extract was chromatographic (Fig 5a) one main peak of 40 KDa and additional peaks of 26, 19 and 7.6 KDa were detected. Minimal protein of 29 KDa was also observed. The chromatographic profile indicates lectin isolation by reversed micelles system. The crude extract contains multiple protein contaminants was not detected after purification process.

The two peaks of purified lectin by reversed micelles reflect dissociation of subunits already observed in SDS-PAGE (Fig. 6a). The difference in molecular mass obtained by SDS-PAGE (21 KDa) and gel filtration (29 KDa) is probably due to glycoprotein native of subunit (Puri & Surolia, 1994).

4. Conclusion

The present work indicates that parameters, such as, pH, ionic strength and concentration of AOT affect the lectin partition in the reversed micellar systems constituted of anionic surfactant AOT/isooctane and the agitation time range studied (5 – 20 min) do not make any influence. The best obtained conditions for the extraction (10 mM citrate

phosphate buffer solution, pH 5.5 containing 30 mM NaCl; 5 mM AOT; 5 min agitation) and back-extraction (10 mM citrate phosphate buffer solution, pH 5.5 containing 1000 mM KCl, 5 min agitation) allowed an yield of protein and activity of 56% and 53%, respectively. The lectin obtained revealed only one band on native PAGE and two peaks of 40 and 29 KDa by gel filtration chromatography (Äkta FPLC system). Comparison of gel filtration chromatographic profiles indicates the efficiency of reversed micellar system to lectin isolation;

Acknowledgements

C.O Nascimento acknowledges receipt of fellowships from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). The authors are deeply grateful for the technical assistance of Maria Barbosa Reis da Silva and João Antonio Virgínio.

References

- Carneiro-da-Cunha, M.G., Melo, E.P., Cabral, J.M.S., Aires-Barros, M.R., 1996. Liquid-liquid extraction of a recombinant cutinase from fermentation media with AOT reversed micelles. *Bioproc. Eng.* 15, 151-157.
- Chen, Y.-L., Su, C.-K., Chiang, B.H., 2005. Optimization of reversed micellar extraction of chitosanases produced by *Bacillus cereus*. *Proc. Biochem.* Article *in press*.
- Correia, M. T. S. and Coelho, L. C. B. B., 1995. Purification of a glucose/manose specific lectin, isoforma 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu Bean). *App. Biochem. an Biotechnol.* 261-73.
- Davis, B.J., 1964. Disc electrophoresis II: method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 121, 404-427.
- Dungan, S. R., Thorsten B., Hatton, T. A., Pawel P. and Walter N., 1991. Interfacial transport processes in the reversed micellar extraction of proteins. *J. Colloid and Interface Sci.* 145, 1,
- Ferreira, L.F.P., Taqueda, M.E., Vitolo, M., Converti, A., Pessoa Jr., A., 2005. Liquid-liquid extraction of commercial glucose oxidase by reversed micelles. *J. Biotechnol.* 116, 411-416.
- Hong, D.-P. and Kuboi, R., 1999. "Evaluation of the alcohol-induced interaction between micelles using percolation processes of reverse micellar systems". *Biochem. Eng. J.*, 4, 23.
- Krieger, N., Taipa, M.A., Aires-Barros, M.R., Melo, E.H.M., Lima-Filho, J.L., Cabral, J.M.S., 1997. Purification of *Penicillium citrinum* lipase using AOT reversed micelles. *J. Chem. Technol. Biot.* 69, 77-85.

- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227, 680-685.
- Lee, S.-S., Hwang, K.-S., Lee, B.-K., Hong, D.-P. and Kuboi, R., 2005. Interaction between reverse micelles as a key factor governing back-extraction of proteins and its control systems. *J. Chem. Eng.* 22 (4), 611-616.
- Liu, J.-G., Xing, J.-M., Shen, R., Yang, C.-L., Liu, H.-Z., 2004. Reverse micelles extraction of nattokinase from fermentation broth. *Biochem. Eng. J.* 21, 273-278.
- Monteiro, T.I.R.C., Porto, T.S., Carneiro-Leão, A.M.A., Silva, M.P.C., Carneiro-da-Cunha, M.G., 2005. Reversed micellar extraction of an extracellular protease from *Nocardiopsis* sp. fermentation broth. 24, 87-90.
- Nascimento C. O., Coelho L. C. B. B., Correia M. T. S. & Carneiro-Da-Cunha M. G. 2002. Liquid-liquid extraction of lectin from *Cratylia mollis* seeds using reversed micelles. *Biotechnol. Lett.*, 24, 905-907.
- Nishiki, T., Nakamura, K., Kato, D., 2000. Forward and backward extraction rates of amino acid in reversed micellar extraction. *Biochem. Eng. J.* 4, 189-195.
- Pessoa Jr., A., Vitolo, M., 1998. Recovery of inulinase using BDBAC reversed micelles. *Proc. Biochem. J.* 291-297.
- Pires, M.J., Aires-Barros, M.R., Cabral, J.M.S., 1996. Liquid-liquid extraction of protein with reversed micelles. *Biotechnol. Proc.* 12, 290-301.
- Porto, T.S., Monteiro, T.I.R., Moreira, K.A., Lima-Filho, J.L., Silva, M.P.C., Porto, A.L.F. and Carneiro-da-Cunha, M.G., 2005. Liquid-liquid extraction of an extracellular alkaline protease from fermentation broth using aqueous two-phase and reversed micelles systems. *J. Microbiol. Biotechnol.* 21, 655-659.

- Puri, K.D., Surolia, A., 1994. Amino acid sequence of the winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus*) basic lectin. *J. Biol. Chem.* 269, 30917-30926.
- Reisfeld, R.A., Lewis, U.J., Williams, D.E., 1962. Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. *Nature.* 195, 281-283.
- Rodrigues, E.M.G., Milagres, A.M.F. & Pessoa, A.A. Jr., 1999. Xylanase recovery effects of extraction conditions on the AOT-reversed micellar systems using experimental desing. *Proc. Biochem.* 34, 121-125.
- Sharon, N., Lis, H. 2001. The structural basis for carbohydrate recognition by lectins. the molecular immunology of complex carbohydrates – 2. Taiwan: Kuwer Academic / Plenum Publishers. 1-19.
- Smith, P.K., Krohn, R.J., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gardner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, C.K., Gocke, N.M., Olson, R.J., Klenk, D.C., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 776-85.
- Wroblewski, S; Berenson, M; Kopeckova, P; Kopecek. J. 2001. Potential of lectin-N- (2-hydroxypropyl) methacrylamide copolymer drug conjugates for the treatment of precancerous conditions. *Journal of Controlled Release.* 74, 283-293.
- Yáskara, F. M. M L.; Silva, L. M. C. M.; Amorim, R. C. N.; Freire, E. A.; Jorge, D. M. M.; Grangeiro, T. B.; Benevides, N. M. B. 2005. Purification of a lectin from the marine red alga *Gracilaria ornata* and its effect on the development of the cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Biochimica et Biophysica Acta.* 1724, 137-145.

FIGURE CAPTIONS

Figure 1. Effect of pH on extraction lectin preparations with 30 mM NaCl, AOT (5 mM) in isooctane reversed micelles. (♦) CrataBL and (■) CE.

Figure 2. Effect of AOT concentration on extraction lectin preparations with 30 mM NaCl, pH 5.5. (♦) CrataBL and (■) CE.

Figure 3. Effect of pH and ionic strength on back-extraction CrataBL at pH 5.5 added by 30 mM NaCl, with AOT (5 mM) in isooctane reversed micelles to a new 10 mM buffered aqueous phase at pH 5.0, 5.5 and 6.0 (citrate phosphate) and pH 7.0 (sodium phosphate) with addition of KCl concentrations (50-1000 mM). Initial concentration of protein in micellar phase 0.374 mg/ml, initial activity = 1.5. HA = hemagglutinating activity. (a) % Back-extraction protein to aqueous phase, (b) HA in back-extraction aqueous phase.

Figure 4. Effect of pH and ionic strength on back-extraction CE at pH 5.5, with AOT (5 mM) in isooctane reversed micelles to a new 10 mM buffered aqueous phase at pH 5.0, 5.5 and 6.0 (citrate phosphate) and pH 7.0 (sodium phosphate) with addition of KCl concentrations (50-1000 mM). Initial concentration of protein in micellar phase 0.374 mg/ml, initial activity = 1.5. HA = hemagglutinating activity. (a) % Back-extraction protein to aqueous phase, (b) Purification factor in back-extraction aqueous phase.

Figure 5. Gel filtration chromatography on Sephacryl S-300 of sample back-extraction pH 5.5 containing 1000 mM KCl and added of 5 % (v / v) butanol at 25 °C. (a) Crude extract (2 ml; 4 mg) and (b) purified lectin (2ml; 0.3 mg) were applied on column (16 mm x 60 cm) equilibrated with 500 mM NaCl fractions (3 ml) were collected at 1.0 ml / min.

Figure 6. PAGE of the sample back-extraction pH 5.5 containing 1000 mM KCl and added of 5 % (v/v) butanol at 25 °C. A) SDS – PAGE: (1) Molecular weight and (2) Purified lectin; B) PAGE to native basic protein: (1) purified lectin and (2) citocromo c.

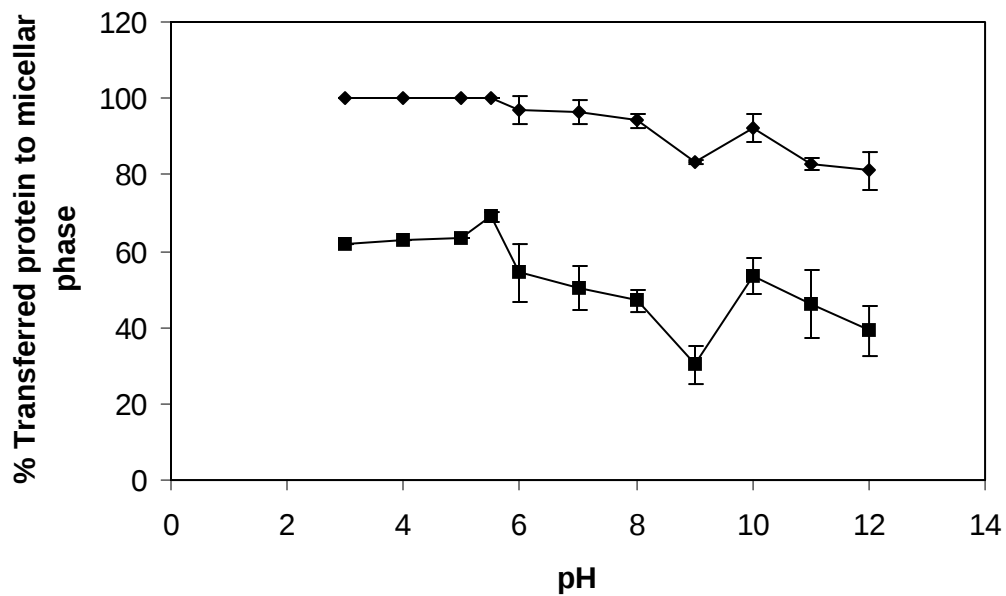


Figure 1. Effect of pH on extraction lectin preparations with 30 mM NaCl, AOT (5 mM) in isooctane reversed micelles. (♦) CrataBL and (■) CE.

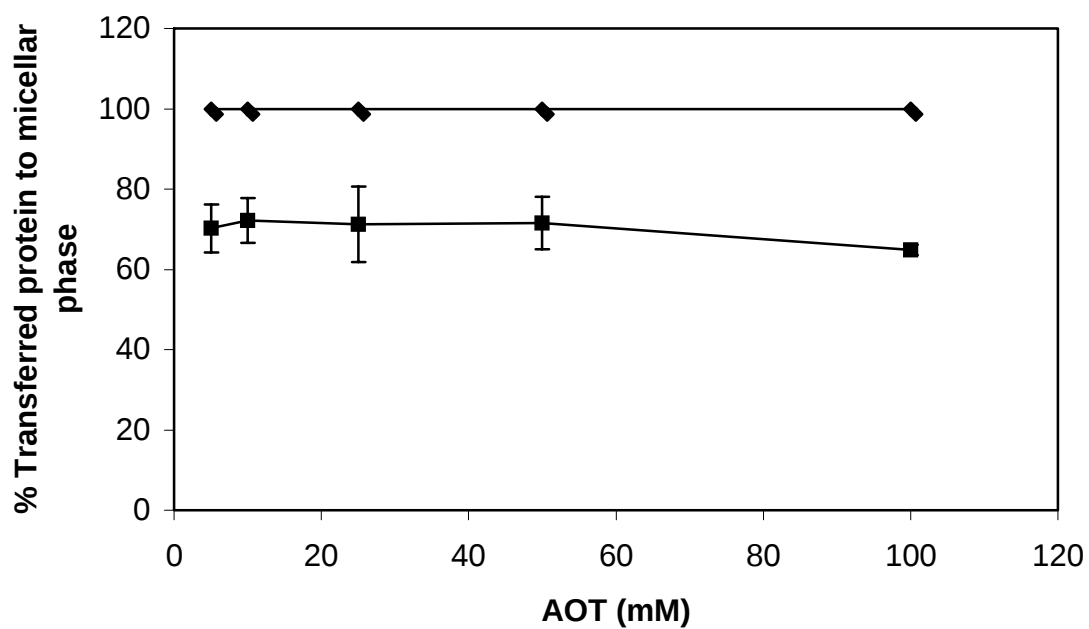


Figure 2. Effect of AOT concentration on extraction lectin preparations with 30 mM NaCl, pH 5.5. (♦) CrataBL and (■) CE.

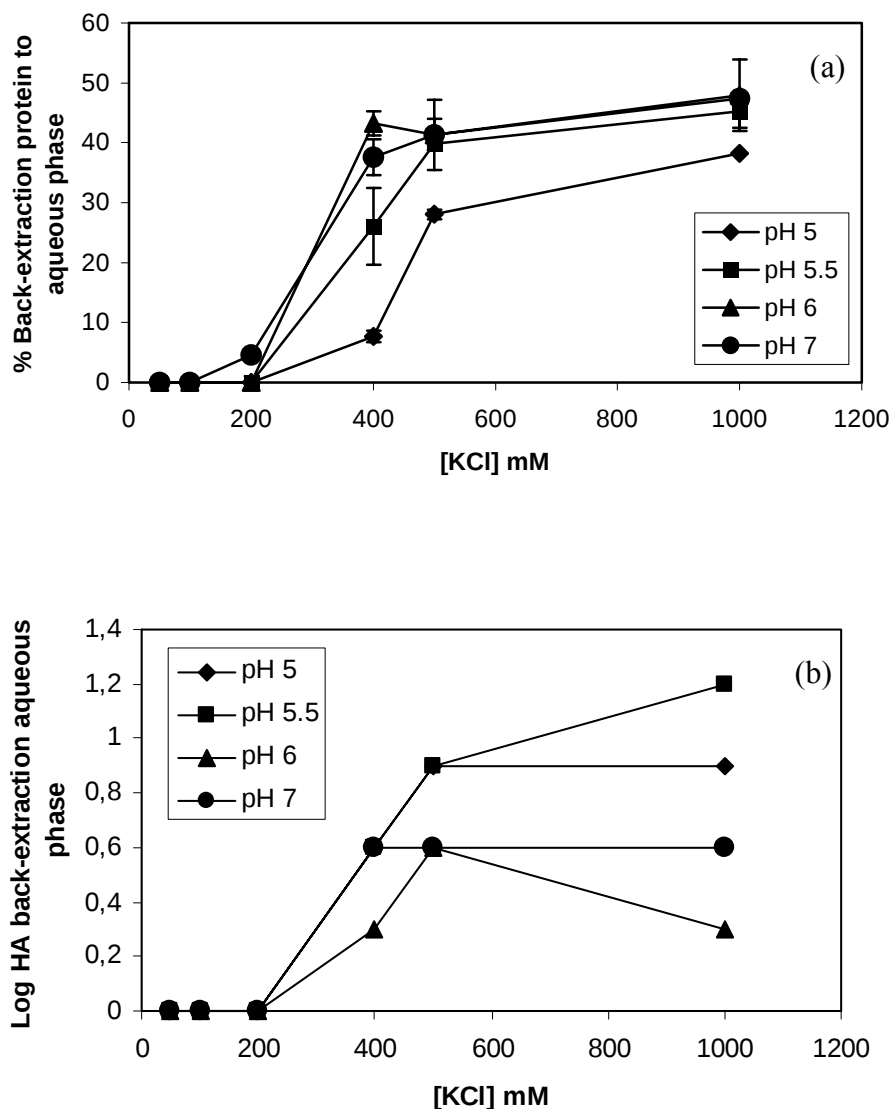


Figure 3. Effect of pH and ionic strength on back-extraction CrataBL at pH 5.5 added by 30 mM NaCl, with AOT (5 mM) in isooctane reversed micelles to a new 10 mM buffered aqueous phase at pH 5.0, 5.5 and 6.0 (citrate phosphate) and pH 7.0 (sodium phosphate) with addition of KCl concentrations (50-1000 mM). Initial concentration of protein in micellar phase 0.374 mg; ml, initial activity = 1.5. HA = hemagglutinating activity. (a) % Back-extraction protein to aqueous phase, (b) Log HA in back-extraction aqueous phase.

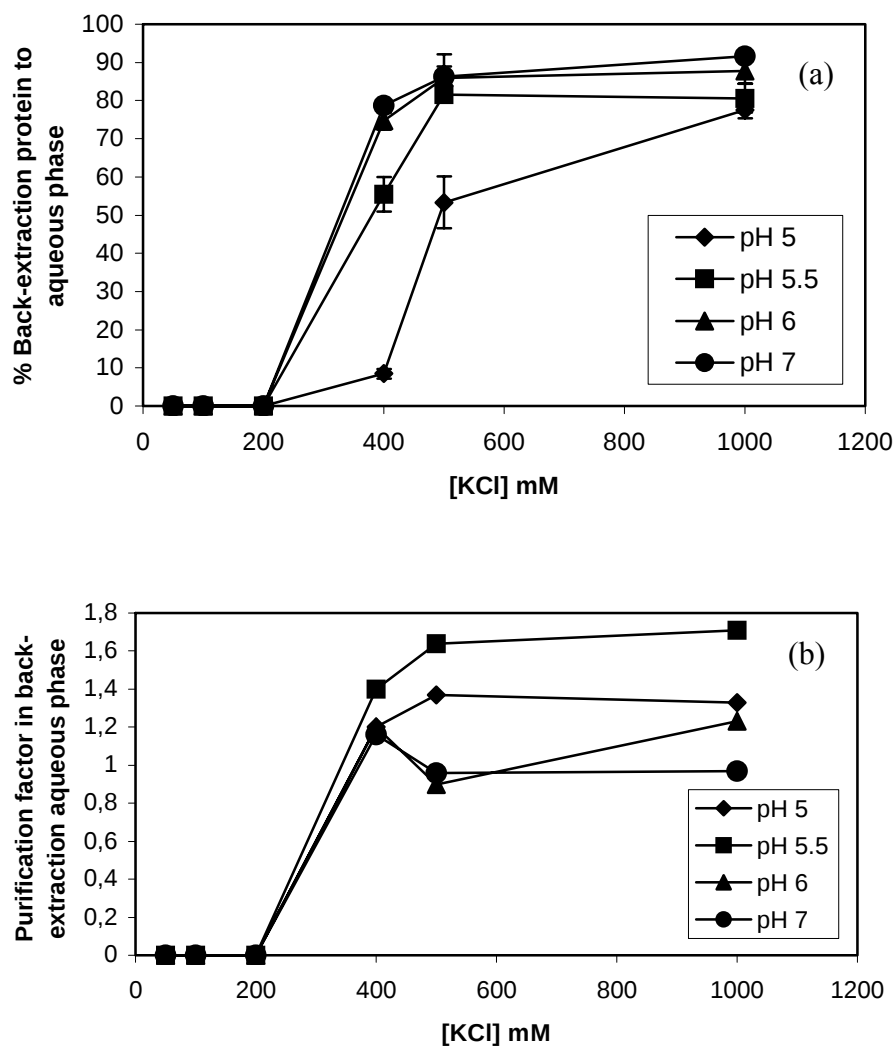


Figure 4. Effect of pH and ionic strength on back-extraction CE at pH 5.5, with AOT (5 mM) in isooctane reversed micelles to a new 10 mM buffered aqueous phase at pH 5.0, 5.5 and 6.0 (citrate phosphate) and pH 7.0 (sodium phosphate) with addition of KCl concentrations (50-1000 mM). Initial concentration of protein in micellar phase 0.374 mg/ml, initial activity = 1.5. HA = hemagglutinating activity. (a) % Back-extraction protein to aqueous phase, (b) Purification factor in back-extraction aqueous phase.

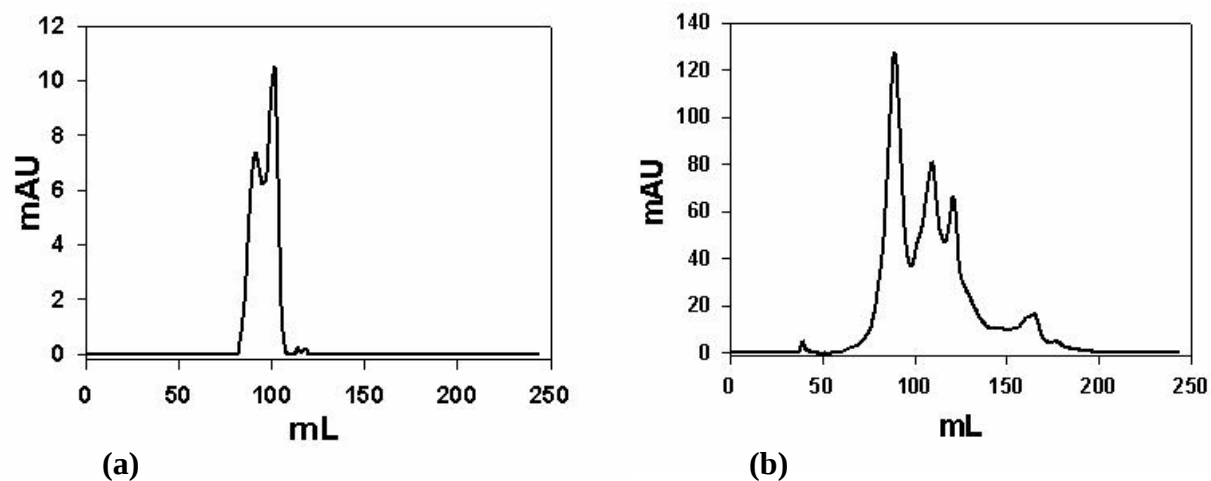


Figure 5. Gel filtration chromatography on Sephacryl S-300 of sample back-extraction pH 5.5 containing 1000 mM KCl and added of 5 % (v / v) butanol at 25 °C. (a) Crude extract (2 ml; 4 mg) and (b) purified lectin by reversed micelles (2ml; 0.3 mg) were applied on column (16 mm x 60 cm) equilibrated with 500 mM NaCl fractions (3 ml) were collected at 1.0 ml / min.

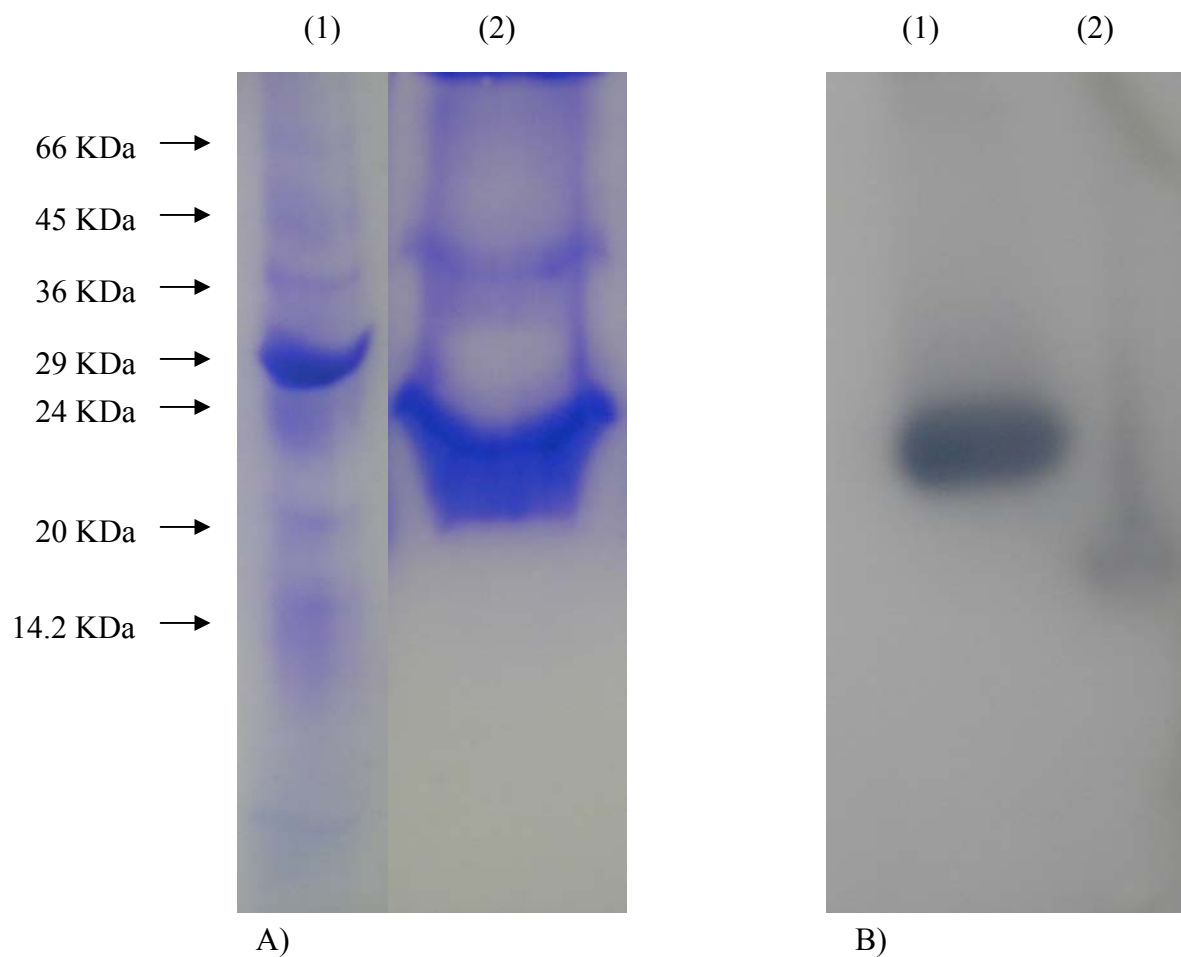


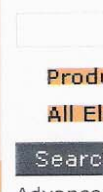
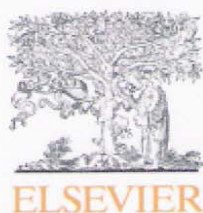
Figure 6. PAGE of the sample back-extraction pH 5.5 containing 1000 mM KCl and added of 5 % (v/v) butanol at 25 °C. A) SDS – PAGE: (1) Molecular weight and (2) Purified lectin by reversed micelles; B) PAGE to native basic protein: (1) purified lectin by reversed micelles and (2) citocromo c.

6. CONCLUSÕES

Os estudos desenvolvidos no presente trabalho mostraram que:

1. É possível extrair lectina da entrecasca de *Crataeva tapia*, utilizando o sistema de micelas invertidas de AOT em isooctano e, que os melhores parâmetros foram: fase aquosa tamponada com citrato fosfato 10 mM, pH 5,5 a 25°C contendo NaCl (30 mM) e fase orgânica constituída por AOT (5 mM) / isooctano e, tampão citrato fosfato 10 mM, pH 5,5 com 1000 mM de KCl e 5 % de butanol a 25°C, para a extração e reextração, respectivamente. Estes parâmetro permitiram extrações de 100 % e 70 %, e reextrações de 45,25 % e 77,76 %, para a CrataBL e EB, respectivamente, com um fator de purificação de 1,7 para a lectina do EB.
2. A PAGE para proteínas básicas apresentou uma única banda e SDS-PAGE apresentou duas bandas peptídicas de 21 KDa (banda principal) e de 40 KDa.
3. A natureza oligomérica da lectina foi demonstrada pela detecção de duas bandas protéicas em SDS-PAGE e dois picos no perfil cromatográfico de filtração em gel.
4. A PAGE para proteínas nativas e básicas apresentou uma única banda, revelando a eficiência do sistema de micelas invertidas para a purificação da lectina.

7. ANEXO



Products

Journal of Biotechnology

Journal information

Product description
Editorial board
Audience
Abstracting/indexing
Special issues and supplements

For Authors

Guide for authors
Online Submission

Subscription information

Bibliographic and ordering information
Conditions of sale
Dispatch dates

Journal related information

Impact factor
Most downloaded articles
Other journals in same subject area

Support & contact

About Elsevier

Select your view

JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY

Guide for Authors

Journal of Biotechnology provides a medium for the rapid publication of both full-length articles and short communications on all aspects of biotechnology. The Journal will accept papers ranging from genetic or molecular biological aspects to those covering biochemical, chemical or bioprocess engineering aspects, provided that in each case the material is directly relevant to biotechnological systems. **Papers presenting information of a multi-disciplinary nature, that would not be suitable for publication in a journal devoted to a single discipline, are particularly welcome.** The following areas are covered by the Journal: Nucleic Acids / Molecular Biology; Physiology / Biochemistry; Biochemical Engineering / Bioprocess Engineering; Industrial Processes / New Products; Medical Biotechnology.

Submission of manuscripts

Submission of a paper to the *Journal of Biotechnology* implies: (1) that it is not being submitted for publication elsewhere; (2) the transfer of the copyright from the author to the Publisher.

Authors are requested to submit their manuscripts electronically, by using the EES online submission tool at <http://ees.elsevier.com/jbiotec/>. After registration, authors will be asked to upload their article, an extra copy of the abstract, and associated artwork. The submission tool will generate a PDF file to be used for the reviewing process. The submission tool generates an automatic reply and a manuscript number will be generated for future correspondence.

Types of papers

- (1) *Full-length papers*, generally not exceeding 20 typewritten pages. Full-length papers should:
 - (a) be divided into sections (Abstract, Introduction, Materials and methods, Results, Discussion);
 - (b) contain an Abstract, not exceeding 200 words, at the beginning of the paper, followed by 3-6 keywords;
 - (c) not exceed 12-15 printed pages (approximately 20 typewritten pages) including the space required for figures. Longer papers will be considered, but may be subject to delayed publication.
- (2) *Short Communications*, not exceeding 1500 words or equivalent space including figures and tables. These must be brief definitive reports and not preliminary findings. Short communications may not be divided into Materials and Methods, Results and Discussion, instead, Materials and Methods may be described in the text or, if appropriate, in figure legends or table footnotes.
- (3) *Reviews* will be published following invitation from Review Editor or by the suggestion of authors.
- (4) *Special Issues* on highlighted aspects of biotechnology are also published. Special Issues may contain selected contributions from international meetings, or a collection of papers on a specific topic, and may be composed of review articles, research papers, and short notes. Guest Editors responsible for the organisation of Special Issues will be

invited by the Editors of the Journal, but may also be suggested by scientists who are willing to organize a special issue on a topic that deserves publication.

(5) *Letters to the Editor* and announcements of meetings and courses will be included at the discretion of the Editors and the Publisher.

(6) *Supplements* will be published at the discretion of the Publisher in consultation with the Chief Editor. Please contact the Publishing Editor direct for further information: Floris de Hon, Journal of Biotechnology, Elsevier, Radarweg 29, 1043 NX Amsterdam, The Netherlands, E-mail: f.hon@elsevier.com

Manuscripts

The manuscript should be typed with double spacing and wide margins, and should be accompanied by a separate title page giving the authors' names and affiliations, as well as an address for correspondence including fax number and e-mail address. If it is a resubmission this has to be indicated and the former J. Biotechnol. MS No. has to be given. All pages have to be numbered consecutively, including the abstract, figure legends, and tables. Place the last two items after the References section. Copies of in-press and submitted manuscripts that are important for judgement of the present manuscript should be enclosed to facilitate reviewing.

For the title, avoid numbered series titles.

In the Abstract, avoid abbreviations and references. The Abstract should be followed by up to six Keywords.

The Material and Methods section should include sufficient technical information to allow the experiments to be repeated. When experimental conditions are critical, give enough information to enable another investigator to repeat the procedure. For commonly used methods a simple reference is sufficient. If several alternative methods are described in the paper cited, please identify the method briefly in addition to the reference. Describe new methods completely.

Present the Results as concise as possible in either table(s) or figure(s). Avoid extensive use of graphs to present data that might be more concisely presented in the text or tables. The Results and Discussion sections may be combined.

References should be assembled on a separate sheet. In the text they should be referred to by name and year (Harvard System). More than one paper from the same author in the same year must be identified by the letters a, b, c, etc., placed after the year of publication. In the text, when referring to a work by more than two authors, the name of the first author should be given followed by et al. and year in brackets. Literature references must consist of names and initials of all authors, year, title of paper referred to, abbreviated title of periodical, volume number and first and last page numbers of the paper. Periodicals, books and multi-author books should follow the examples below:

Ponti, C., Sonnleitner, B. and Fiechter, A. (1995) Aerobic thermophilic treatment of sewage sludge at pilot plant scale. 1. Operating conditions. J. Biotechnol. 38, 173-182. Walter, H., Brooks, D.E. and Fisher, D. (1985) Partitioning in aqueous two-phase systems. Academic Press, Inc., Orlando, FL. Hamer, G. (1989) Fundamental aspects of aerobic thermophilic digestion. In: Bruce, A.M., Colin, F. and Newman, P.J. (Eds.), Treatment of Sewage Sludge: Thermophilic Aerobic Digestion and Processing Requirements for Landfilling. Elsevier Applied Science, London, pp. 2-19.

Abbreviations of journal titles should conform to those adopted by List of Serial Title Word Abbreviations, International Serials Data System, 20 rue Bachaumont, 75002 Paris, France. ISBN 2- 904938-02-8.

Tables should be typed double-spaced on separate sheets, numbered

consecutively with Arabic numerals, and only contain horizontal lines. A short descriptive title should appear above each table, with possible legend and footnotes (identified with a, b, c, etc.) below.

Figures should be line drawings in black ink. Figures should be completely labeled, the size of the lettering being appropriate to that of the drawing, taking into account the necessary reduction in size. All legends should be typed double-spaced on separate sheets. If figures are not to be reduced their format should not exceed 16.0 x 20.2 cm. Colour reproduction is possible. Authors wishing to publish colour figures will be expected to pay for their production costs. Figure legends have to be submitted on separate sheets.

Equations have to be numbered consecutively.

Nomenclature. A list of symbols and abbreviations (e.g., of enzymes) should be provided. 'Fermentation' and 'fermenter' have become very ambiguous expressions and, therefore, should be avoided in this Journal. Preferably use other expressions such as cultivation or bioreactor, respectively. Units and Dimensions should be expressed according to IUPAC nomenclature, e.g.

Time, s, min, h, d, a; Mass, ng, mg, g, kg, t;
Length, nm, μ m, mm, cm, m, km; Volume, l, ml, μ l; Dalton, Da, for molecular mass.
Molecular weight has no dimension.
Negative powers should be used instead of fractions, e.g., g l⁻¹ h⁻¹, nmol ml⁻¹, etc.
Dimensions should not be mixed with specifications, e.g., protein per biomass (g g⁻¹) instead of g protein/g biomass.

Scientific and Engineering Symbols. Growth kinetics and cultivation: As recommended by the International Commission at the 2nd Int. Symposium on Cont. Cultivation of Microorganisms, Prague 1962 (Proceedings published by Academic Press, New York, p. 379, 1962). Other symbols: as per 'Perry's Chemical Engineering Handbook'.

Instructions regarding GenBank/DNA Sequence Linking:

DNA sequences and GenBank Accession numbers: Many Elsevier journals cite "gene accession numbers" in their running text and footnotes. Gene accession numbers refer to genes or DNA sequences about which further information can be found in the database at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) at the National Library of Medicine. Elsevier authors wishing to enable other scientists to use the accession numbers cited in their papers via links to these sources, should type this information in the following manner:

For each and every accession number cited in an article, authors should type the accession number in **bold, underlined text**. Letters in the accession number should always be capitalised. (See Example 1 below). This combination of letters and format will enable Elsevier's typesetters to recognize the relevant texts as accession numbers and add the required link to GenBank's sequences.

Example 1: "GenBank accession nos. **AI631510**, **AI631511**, **AI632198**, and **BF223228**, a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. **BE675048**), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. **AA361117**)".

Authors are encouraged to check accession numbers used very carefully. An error in a letter or number can result in a dead link. In the final version of the **printed article**, the accession number text will not appear bold or underlined (see Example 2 below).

Example 2: "GenBank accession nos. AI631510, AI631511, AI632198, and BF223228, a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia

(GenBank accession no. BE675048), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. AA361117)".

In the final version of the **electronic copy**, the accession number text will be linked to the appropriate source in the NCBI databases enabling readers to go directly to that source from the article.

All questions arising after acceptance of the manuscript, especially those relating to proofs, should be directed to: Elsevier Ireland Ltd., Issue Manager Journal of Biotechnology, Elsevier House, Brookvale Plaza, East Park, Shannon, Co. Clare, Ireland, E-mail: g.duggan@elsevier.com.

Proofs will be sent to the first-named author of an article, unless an alternative is requested on the title page of the manuscript. They should be checked carefully and returned within 2 days of receipt. Only printer's errors may be corrected: no changes in or additions to the edited manuscript will be allowed at this stage.

Page charges will not be made.

Reprints may be ordered by filling in and returning to the Publishers the order form sent to the author with the proofs. Twenty-five free offprints per contribution will be made available.



[Printer-friendly version](#)

[Home](#) | [Site map](#) | [Privacy policy](#) | [Terms and Conditions](#) | [Feedback](#) |
A Reed Elsevier company

Copyright © 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.