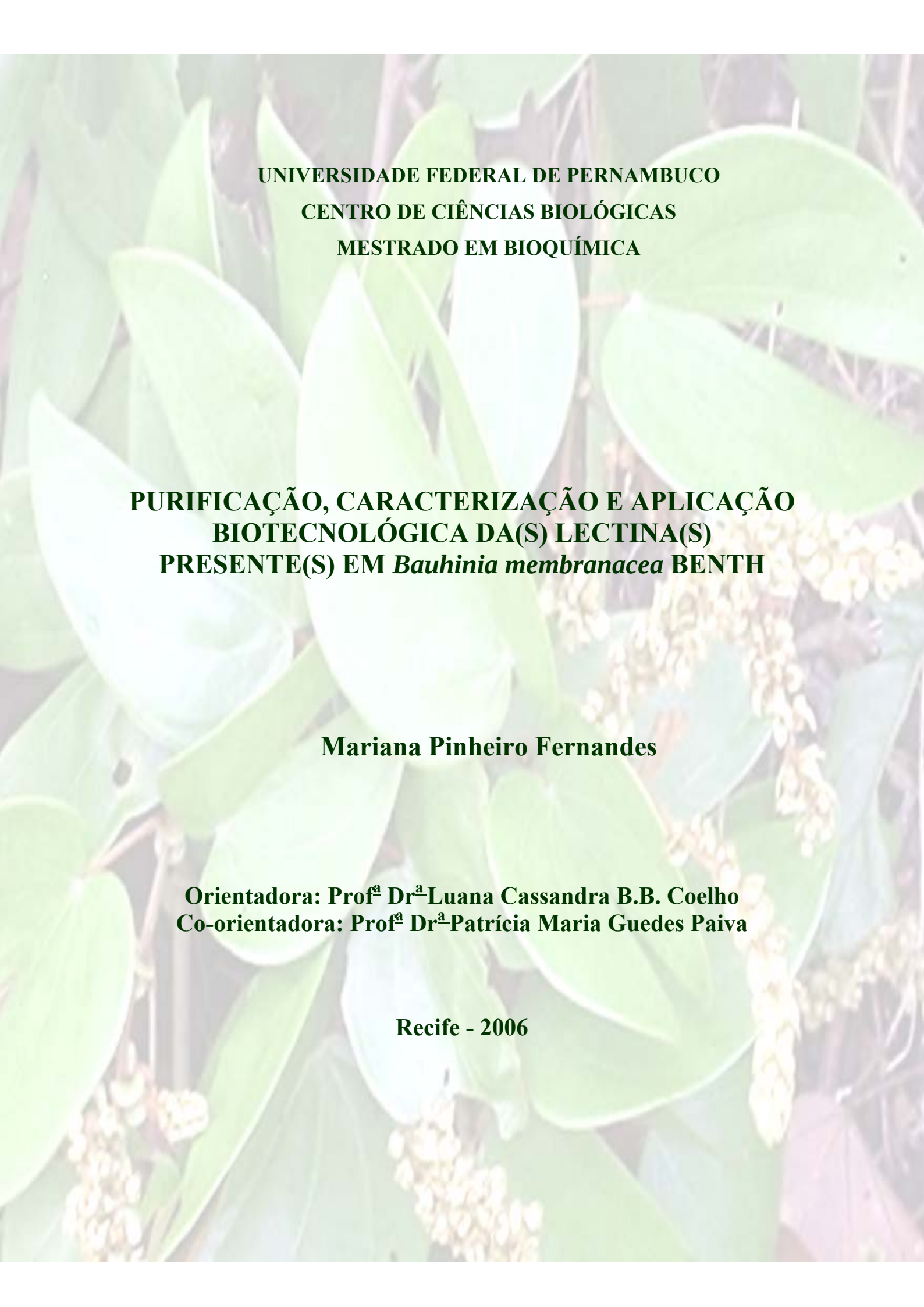




UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM BIOQUÍMICA

**PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO
BIOTECNOLÓGICA DA(S) LECTINA(S)
PRESENTE(S) EM *Bauhinia membranacea* BENTH**

Mariana Pinheiro Fernandes

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Luana Cassandra B.B. Coelho
Co-orientadora: Prof^ª Dr^ª Patrícia Maria Guedes Paiva

Recife - 2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM BIOQUÍMICA

PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO
BIOTECNOLÓGICA DA(S) LECTINA(S)
PRESENTE(S) EM *Bauhinia membranacea* BENTH

Mariana Pinheiro Fernandes

Orientadora: Prof^a Dr^a Luana Cassandra B.B. Coelho
Co-orientadora: Prof^a Dr^a Patrícia Maria Guedes Paiva

Recife - 2006

Mariana Pinheiro Fernandes

**PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO
BIOTECNOLÓGICA DA(S) LECTINA(S)
PRESENTE(S) EM *Bauhinia membranacea* BENTH**

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

Aprovada por:

Fevereiro-2006

Fernandes, Mariana Pinheiro

Purificação, caracterização e aplicação biotecnológica da(s) lectina (s) presente (s) em *Bauhinia membranacea* Benth / Mariana Pinheiro Fernandes. – Recife : O Autor, 2006.

vi, 50 folhas : il., fig., tab.

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

Inclui bibliografia e anexo.

1. Purificação de lectina. 2. Lectina de folhas – *Bauhinia membranacea*. 3. Imobilização. 4. Glicoproteínas. I. Título.

**577.112
572.6**

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

**UFPE
BC2006-077**

Ata da defesa de dissertação do Mestrando **Maria Pinheiro Fernandes**, realizada em 17 de fevereiro de 2006, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Às 9:20 horas, do dia 17 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 Mariana Pinheiro Fernandes, 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. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho, de sua Co-orientadora, Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva, e da Banca Examinadora composta pelos professores doutores: Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho, na qualidade de Presidente, Maria Tereza dos Santos Correia, ambas do Depto. de Bioquímica/CCB/UFPE, Adriana Carla Cavalcante Malta Argôlo, Pesquisadora do Depto. de Bioquímica/CCB/UFPE e Aníbal Eugênio Vercesi, do Depto. de Patologia Clínica/UNICAMP. 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: **"Purificação, Caracterização e Aplicação Biotecnológica da(s) Lectina(s) Presente(s) em *Bauhinia membranacea* BENTH"**, 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, Prof. Dr. Aníbal Eugênio Vercesi, que agradeceu o convite, fez alguns comentários e deu algumas sugestões e iniciou sua arguição. Ao final, o referido professor deu-se por satisfeito. Em seguida, a Sra. Presidente passou a palavra para a Profa. Dra. Adriana Carla Cavalcante Malta Argôlo, 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. Maria Tereza dos Santos Correia, que após agradecer e fazer alguns comentários iniciou sua arguição. Ao final, a referida professora deu-se por satisfeita. Daí, a Sra. Presidente usou da palavra para tecer alguns comentários, agradecer à Banca Examinadora e parabenizar o candidato e sua co-orientadora. 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, 17 de fevereiro de 2006.

Em Tempo:
na linha 1,
onde se lê
"Maria", leia-se
"Mariana".

Em 22/02/2006.



Djalma Gomes da Silva
Assessor da Coordenação do Curso de
Mestrado em Bioquímica/CCB/UFPE

Maria Tereza dos Santos Correia

Adriana Carla C. M. Argôlo.

**A Deus, por ser a fonte de luz
viva presente na minha vida;
Aos meus pais, Mauro e Ana,
pelo exemplo de vida e
constante apoio em todos os
momentos;
Aos meus irmãos, Thiago,
Hugo e Rose, pelo carinho e
apoio;
Ao meu noivo Márcio pelo
companheirismo, carinho e
dedicação constantes;
Ao meu sobrinho Gabriel e à
minha afilhada Adrielle, pela
alegre convivência.**

**Porque desde a antiguidade
não se ouviu, nem com
ouvidos se percebeu, nem
com os olhos se viu um Deus
além de ti, que trabalha para
aquele que nele espera.**

Isaías 64:4

ÍNDICE ANALÍTICO

AGRADECIMENTOS	I
LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE TABELAS	IV
RESUMO	V
ABSTRACT	VI
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE LECTINAS	1
1.1.1 Histórico e distribuição na natureza	1
1.1.2 Características estruturais	1
1.1.3 Purificação e caracterização de lectinas	4
1.1.4 Lectinas vegetativas	6
1.1.5 Aplicação biotecnológica e papel fisiológico	7
1.2 Imobilização de Proteínas	9
1.3 Glicoproteínas	12
1.4 O gênero <i>Bauhinia</i> e a espécie <i>B. membranacea</i>	13
2 JUSTIFICATIVA	14
3 OBJETIVOS	15
3.1 Objetivos gerais	15
3.2 Objetivos específicos	15
4 ARTIGO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO	16
BIOTECHNOLOGY PROGRESS	
Título: Purification of a leaf lectin from <i>Bauhinia membranacea</i> and its immobilization on Sepharose CL-4B to isolate glycoproteins	
5 CONCLUSÕES	38
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela oportunidade de viver este momento e por sua constante presença na minha vida.

À Prof.^a Dr.^a Luana Cassandra B. B. Coelho, pela orientação científica, confiança, apoio e, principalmente pela amizade estabelecida desde a iniciação científica.

À Prof.^a Dr.^a Patrícia Maria Guedes Paiva, por sua co-orientação, amizade e confiança.

À Prof.^a Dr.^a Maria Tereza dos Santos Correia, pela amizade e valioso incentivo desde o início da graduação.

À Maria Barbosa Reis da Silva, pela ajuda constante, apoio científico e principalmente pela convivência amiga. Seus ensinamentos foram valiosos para a realização deste trabalho.

A João Virgínio, pela atenção dedicada à minha pessoa, amizade, ajuda constante e por sempre acreditar em mim.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Bioquímica da UFPE, em especial a Miron e Neide, pela amizade, paciência e constante apoio.

A todos que fazem o Laboratório de Glicoproteínas do Departamento de Bioquímica da UFPE, pela colaboração, companheirismo e pelos laços de amizade que se formaram durante este período de convivência; em especial, Andréa, Amanda, Elba, Francis, Hernando, Jaira, Juliene, Fernanda, Giseli, Lidiane, Luciana, Lucíola, Mariana Cristina, Michele, Nathaly, Neila, Raquel, Rodrigo, Rosely, Sandro e Thiago.

Às minhas amigas Andréa Santos, Cynthia de Oliveira, Flávia Fabianny, Maria Danielly, Nathalia Varejão, Regina Maria, Renata Angeli e Vanessa Brustein com as quais compartilhei momentos difíceis, mas também muitos momentos alegres que jamais serão esquecidos. Vocês foram imprescindíveis para essa conquista.

À minha amiga-irmã Adriana Argolo, pela amizade, paciência, companhia fiel em todos os momentos, por não medir esforços e por sempre ter a palavra certa para me consolar nas horas difíceis. A você declaro toda minha admiração.

Aos meus amigos Fernando, Rafael, Romero e Roberto por toda paciência, companheirismo, apoio e dedicada amizade.

A todos meus colegas do mestrado, em especial aos amigos Ana Catarina, Ana Cristina, Catarina, Sérgio e Suzan pelo companheirismo.

À minha família; em especial aos meus pais, Mauro e Ana, por toda dedicação, amor e ensinamentos ao longo da minha vida. A vocês declaro todo meu carinho e admiração.

Aos meus irmãos Thiago, Hugo e Rose pela paciência, amizade e incentivo.

Ao meu sobrinho Gabriel e à minha afilhada Adrielle pela alegria e carinho dedicados a mim.

Ao meu noivo Márcio André, que sempre esteve ao meu lado, incentivando e acreditando nos meus objetivos.

À minha amiga-sogra Creuza, por sempre me apoiar em todos os momentos, especialmente nos difíceis.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para esta conquista.

LISTA DE FIGURAS

Introdução

Figura 1. Representação esquemática da aglutinação de eritrócitos por lectina	2
Figura 2. Inibição da aglutinação de eritrócitos por lectinas em presença de carboidrato	2
Figura 3. Esquema da Imobilização de lectinas em Sepharose CL-4B	11
Figura 4. Aspecto de folhas de <i>Bauhinia membranacea</i>	13

Artigo: Purification of a leaf lectin from *Bauhinia membranacea* and its immobilization on Sepharose CL-4B to isolate glycoproteins

Figure 1. Chromatogram (● absorbance at 280 nm; □ log HA) of <i>Bauhinia membranacea</i> leaf lectin on a guar gel column	31
Figure 2. Electrophoretic patterns of BmeLL	32
Figure 3. BmeLL Gel Filtration Chromatography	33
Figure 4. Specific hemagglutinating activity of BmeLL at different temperatures	34
Figure 5. Effect of pH on the specific hemagglutinating activity of BmeLL	35
Figure 6. Chromatography on BmeLL-Sepharose CL-4B	36
Figure 7. Electrophoretic patterns of commercial thyroglobulin (1) and glycoprotein from hog thyroid crude homogenate (2) desorbed from BmeLL-Sepharose CL-4B column	37

LISTA DE TABELAS***Introdução***

Tabela 1: Especificidade de ligação a carboidratos das lectinas de plantas	3
---	----------

Artigo: Purification of a leaf lectin from *Bauhinia membranacea* and its immobilization on Sepharose CL-4B to isolate glycoproteins

Table 1. Summary of BmeLL purification	30
---	-----------

RESUMO

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas de origem não-imune que se ligam bioespecificamente a carboidratos, com capacidade de aglutinar células de forma reversível. Folhas de plantas do gênero *Bauhinia* têm ampla utilização na medicina popular com propriedades ditas hipoglicemiantes e diuréticas. Diversos extratos de folhas de *Bauhinia membranacea* Benth demonstraram a presença de lectina, indicada pela atividade hemaglutinante (AH). O objetivo deste trabalho foi a purificação da lectina de folhas de *B. membranacea* (BmeLL) e sua imobilização em Sepharose CL-4B para isolar glicoproteínas. Um extrato escolhido (10 %, p/v) foi preparado em tampão citrato fosfato 10 mM, pH 6,5, contendo cloreto de sódio 0,15 M (tampão selecionado), por 16 h, a 4 °C. O extrato foi tratado com sulfato de amônio e a fração 0-80 % (F0-80%) foi selecionada para realização dos experimentos de purificação devido à maior AH específica (AHE). Cromatografia em coluna de gel de guar foi feita para purificar a lectina; a matriz foi equilibrada com cloreto de sódio 0,15 M. Eluição da proteína foi feita com hidróxido de sódio 0,02 M, pH 11. SDS-PAGE (8,5 %, p/v) revelou a pureza de BmeLL. A lectina aglutinou a títulos altos eritrócitos de coelho e humanos e não foi estimulada em presença de íons (Ca^{++} , Mg^{++}). BmeLL apresentou melhor AHE com tampão citrato fosfato 10 mM, pH 6,0, contendo cloreto de sódio 0,15 M. Teste de temperatura revelou que BmeLL é uma lectina termoestável. O perfil cromatográfico em gel filtração numa coluna de Sephacryl S-300 mostrou um pico protéico principal. Caseína, fetuína, asocaseína, asialofetuína e tiroglobulina aboliram a atividade da lectina. BmeLL imobilizada em Sepharose CL-4B foi eficiente para ligar avidina e tiroglobulina como também, glicoproteínas da clara do ovo e tireóide de porco. Preparações contendo BmeLL serão utilizadas em ensaios biológicos que permitam avaliar seu papel como agente hipoglicemiante; BmeLL purificada será utilizada para caracterizar superfícies celulares.

ABSTRACT

Lectins are proteins or glycoproteins of non-immune origin which bind biospecifically carbohydrates with agglutinant cell capacity of a reversible way. Plant leaves of *Bauhinia* genus have been used in popular medicine with properties said hypoglicemiant and diuretic. Several leaf extracts of *Bauhinia membranacea* Benth showed lectin presence, indicated by hemagglutinating activity (HA). The aim of this work was the purification of *B. membranacea* leaf lectin (BmeLL) and its immobilization on Sepharose CL-4B to isolate glycoproteins. A chosen extract (10 %, w/v) was prepared in 10 mM citrate-phosphate buffer, pH 6.5, containing 0.15 M sodium chloride (selected buffer) by 16 h at 4 °C. The extract was treated with ammonium sulphate and a 0-80 % fraction (F0-80%) was used to isolate the lectin since it showed the highest specific hemagglutinating activity (SHA). Chromatography on guar gel column was used to purify the lectin; the matrix was equilibrated with 0.15 M sodium chloride. Protein elution was performed with 0.02 M sodium hidroxide, pH 11. SDS-PAGE (8.5 %, w/v) revealed pure BmeLL. The lectin agglutinated at higher titers rabbit and human erythrocytes; it was not stimulated in the presence of ions (Ca^{++} , Mg^{++}). BmeLL showed better SHA with 0.01 M citrate-phosphate buffer, pH 6.0, containing 0.15 M sodium chloride. A temperature assay revealed that BmeLL was thermostable. The gel filtration chromatographic profile on a Sephacryl S-300 column showed a main protein peak. Casein, fetuin, thyroglobulin, azocasein and asialofetuin abolished lectin activity. BmeLL immobilized on Sepharose CL-4B was efficient to bind avidin and thyroglobulin as well as glycoproteins from egg white and hog thyroid. Preparations containing BmeLL will be utilized in biological assays which permit to evaluate its use as hypoglicemic agent; BmeLL purified will be utilized to characterize cell surfaces.

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE LECTINAS

1.1.1 Histórico e distribuição na natureza

O termo “lectina” (do latim *lectus*, significa selecionado, escolhido) foi proposto por Boyd & Shapleigh (1954) para designar um grupo de proteínas que apresenta a característica comum de seletividade na interação com carboidratos. O termo aglutinina é usado como sinônimo para lectina, porque refere-se à habilidade de aglutinar eritrócitos ou outras células (Peumans & Van Damme, 1995). Segundo Goldstein e colaboradores (1980) lectinas são proteínas ou glicoproteínas de origem não imune possuidoras de pelo menos dois sítios moleculares de ligação através dos quais interagem com carboidratos, aglutinam células e precipitam polissacarídeos sem alterar suas estruturas.

Atualmente, a definição mais usada para as lectinas, baseada em suas estruturas, é aquela proposta por Peumans & Van Damme (1995). Desta maneira, eles definiram lectinas como proteínas de origem não imune contendo pelo menos um sítio não-catalítico de ligação reversível a mono ou oligossacarídeos específicos (Peumans & Van Damme, 1998; Peumans *et al.*, 2001).

As lectinas possuem ampla distribuição na natureza podendo ser encontradas em microorganismos (Bhowal *et al.*, 2005), animais (Zhong *et al.*, 2005) e plantas (Sultan *et al.*, 2005). O reino vegetal tem demonstrado constituir ótima fonte de lectinas, servindo como material para a purificação dessas macromoléculas.

1.1.2 Características estruturais

Ensaio de hemaglutinação com eritrócitos de animais e humanos detectam a presença de lectinas em uma amostra (Figura 1). As lectinas, através dos seus sítios moleculares, ligam-se a carboidratos da superfície dos eritrócitos formando uma malha entre as células. Este tipo de ensaio é o mais comumente utilizado para detecção promovendo a visualização da capacidade de aglutinação de eritrócitos por lectinas. Os

eritrócitos podem ou não ser submetidos a tratamentos com enzimas ou com soluções químicas para que haja um aumento na sensibilidade de aglutinação por lectinas (Ozeki *et al.*, 1991; Nomura *et al.*, 1998; Coelho & Silva, 2000).

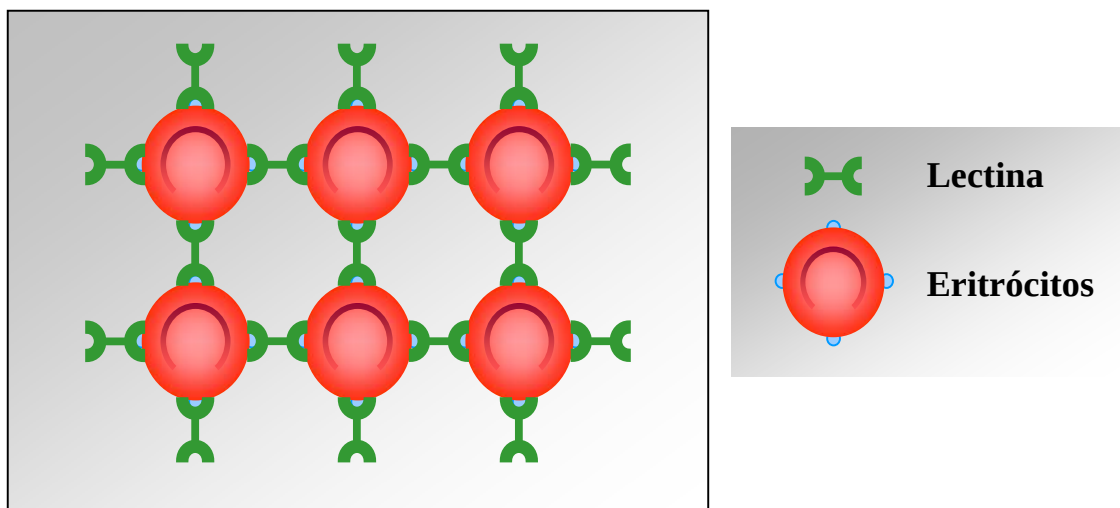


Figura 1. Representação esquemática da aglutinação de eritrócitos por lectina.

A confirmação da presença de lectina em uma amostra é feita baseando-se na sua capacidade de ligação a carboidratos e/ou glicoproteínas. As lectinas se ligam aos carboidratos ou glicoproteínas da solução teste em lugar de interagirem com os eritrócitos que ao ficarem livres, precipitam (Figura 2).

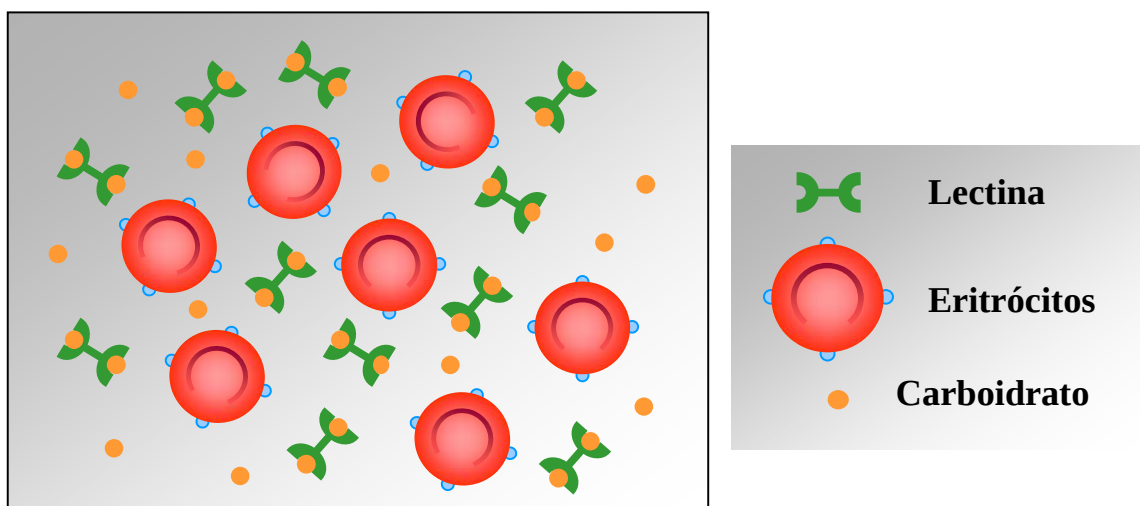


Figura 2. Inibição da aglutinação de eritrócitos por lectinas em presença de carboidrato.

Quanto ao número de sítios de ligação a carboidratos a maioria das lectinas são di ou polivalentes. A ligação a carboidratos ocorre através de pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas, com especificidades características (Kennedy *et al.*, 1995). Algumas lectinas não apresentam um monossacarídeo inibidor e são inibidas apenas por oligossacarídeos (Lis & Sharon, 1981). Conforme Sharon & Lis (1990) algumas lectinas apresentam interações mais fortes com oligossacarídeos em comparação com monossacarídeos, outras são quase exclusivas para oligossacarídeos. De acordo com essas propriedades de ligação a carboidratos, as lectinas podem ser classificadas como específicas quando apresentam interação com um monossacarídeo ou não específicas quando interagem com oligossacarídeos.

As lectinas de plantas exibem ampla variedade de especificidade de ligação a carboidratos como demonstrado na tabela 1 (Peumans & Van Damme, 1998).

Tabela 1: Especificidade de ligação a carboidratos das lectinas de plantas.

Especificidade	Exemplo de lectinas
Grupo Fucose	
Fucose	<i>Ulex europaeus</i> I
Grupo Galactose/ N-acetilgalactosamina	
Galactose>>GalNAc	<i>Artocarpus integrifolia</i>
Gal=GalNAc	<i>Clerodendron trichotomum</i>
Gal<<GalNAc	<i>Glycine Max</i>
Grupo N-acetilglicosamina	
GlcNAc	<i>Triticum aestivum</i>
(GlcNAc) _n	<i>Urtica dioica</i>
Grupo Manose	
Manose	<i>Galanthus nivalis</i>
Manose/ glicose	<i>Canavalia ensiformis</i> , <i>Cratylia mollis</i>
Manose/ maltose	<i>Calystegia sepium</i>
Grupo Ácido siálico	
Ácido siálico	<i>Triticum aestivum</i>
Neu5Aca(2,6)gal/GalNAc	<i>Sambucus nigra</i>
Neu5Aca(2,3)gal/GalNAc	<i>Maackia amurensis</i>
Grupo Complexo glicano	
Complexo com especificidade conhecida	<i>Phaseolus vulgaris</i>
Complexo com especificidade desconhecida	<i>Euonymus europaeus</i>

As lectinas são usadas como ferramentas para a investigação funcional e estrutural de carboidratos complexos, especialmente para a análise de mudanças que ocorrem nas proteínas da superfície celular durante os processos fisiológicos e patológicos, partindo da diferenciação celular ao câncer (Sharon & Lis, 2001).

Uma outra classificação para lectinas de plantas baseia-se no número de domínios de ligação a carboidrato e outros de natureza não catalítica, dividindo-as em quatro principais tipos distintos: merolectinas, hololectinas, quimerolectinas (Peumans & Van Damme, 1998 a) e superlectinas (Peumans *et al.*, 2001).

- Merolectinas: são proteínas formadas exclusivamente por um domínio de ligação a carboidrato e, por conta de sua natureza monovalente, são incapazes de precipitar glicoconjugados ou aglutinar células.
- Hololectinas: são proteínas formadas exclusivamente de domínios de ligação a carboidratos, que contêm dois ou mais destes domínios idênticos ou muito semelhantes. Este grupo compreende as lectinas que possuem múltiplos sítios de ligação, com capacidade de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados.
- Quimerolectinas: compreende as proteínas que possuem um domínio de ligação a carboidrato e um domínio não relacionado que atua de forma independente.
- Superlectinas: compreende as proteínas com dois sítios de ligação a carboidratos, estruturalmente diferentes, reconhecendo carboidratos distintos.

1.1.3 Purificação e caracterização de lectinas

As lectinas são purificadas com base em características como tamanho molecular, solubilidade, carga e afinidade específica de ligação a carboidratos. São diversas as técnicas utilizadas para eliminar moléculas que não sejam de interesse (contaminantes).

Condições de extração são definidas e envolvem a seleção do extrator, temperatura e tempo. Soluções aquosas são solventes apropriados para a extração de lectinas de sementes, desde que a maioria delas são solúveis em água e em solução salina (Oshikawa *et al.*, 2000; Moure *et al.*, 2001). A preparação obtida, dita extrato bruto, é então avaliada quanto à concentração protéica e utilizada como material inicial para o isolamento da proteína.

A partir do extrato bruto, as proteínas podem ser fracionadas por métodos tais como a precipitação seletiva de proteínas com sais (Paiva & Coelho, 1992) ou elevadas temperaturas (Bezerra *et al.*, 2001). O sulfato de amônio é o sal mais comumente utilizado (Coelho & Silva, 2000) devido à sua elevada solubilidade.

O fracionamento salino é um processo que se baseia no princípio de que a solubilidade da maioria das proteínas é diminuída em altas concentrações de sais. Esse efeito é chamado *salting-out* e o sulfato de amônio é muito utilizado para este fim. Em geral as lectinas podem ser parcialmente purificadas por este processo, uma vez que o sal retira a camada de solvatação existente ao redor das proteínas fazendo com que as mesmas precipitem. A precipitação com sulfato de amônio pode estabilizar a atividade hemaglutinante da proteína, mesmo após longos períodos de armazenamento (Kennedy *et al.*, 1995; Coelho & Silva, 2000).

A diálise separa as lectinas de moléculas pequenas através da utilização de uma membrana (celulose) semipermeável (Kabir *et al.*, 1998). As moléculas com dimensões maiores são retidas dentro do saco de diálise e as menores e os íons atravessam os poros e permanecem na solução.

Vários métodos cromatográficos são realizados para purificar lectinas. As técnicas cromatográficas utilizadas incluem cromatografia de filtração em gel (Rego *et al.*, 2002), de troca iônica (Ng & Yu, 2001) e cromatografia de afinidade (Coelho & Silva, 2000). Contudo, devido à propriedade de ligação a carboidrato, cromatografia de afinidade em colunas contendo suportes polissacarídeos (Cavada *et al.*, 1998; Machuka *et al.*, 1999; Coelho & Silva, 2000) ou glicoproteínas (Nomura *et al.*, 1998; Kawagishi *et al.*, 2001) tem sido a técnica mais comumente utilizada.

Na cromatografia de filtração em gel ou exclusão molecular as moléculas são separadas através do tamanho. A cromatografia de troca iônica separa as proteínas em função de sua carga; as proteínas com carga negativa (aniônicas) ligam-se em coluna de DEAE-Celulose, contendo cargas positivas; as proteínas com cargas positivas (catiônicas) podem ser separadas em colunas de CM-Celulose, de carga negativa. Outro método eficiente é a cromatografia de afinidade, técnica que se baseia na ligação da lectina a grupos químicos específicos existentes em suporte insolúvel, como é o exemplo da ligação de lectinas que reconhecem resíduos de glicose em Sephadex, matriz formada por

dextrana, biopolímero produzido pela ação bacteriana sobre a sacarose, um dissacarídeo, formado por unidades de glicose (Brazil & Entlicher, 1999). A proteína desejada é obtida com alto grau de pureza (Ye & Ng, 2002), alterando-se as condições de pH (Datta *et al.*, 2001), força iônica (Chung *et al.*, 2001) ou pela eluição com solução contendo um competidor (Lima *et al.*, 1997).

Métodos eletroforéticos são utilizados na caracterização estrutural de lectinas e baseiam-se no princípio que uma molécula com carga elétrica líquida mover-se-á em um campo elétrico. A velocidade de migração de uma proteína depende da intensidade do campo, da carga líquida da proteína e do coeficiente de atrito. As separações eletroforéticas são quase sempre feitas em gel, onde os de poliacrilamida são os escolhidos por serem quimicamente inertes e porque o tamanho dos seus poros pode ser controlado (Stryer, 2004). A inclusão do detergente sulfato sódico de dodecila (SDS) no sistema, possibilita a desnaturação da molécula protéica e, como consequência, a definição da massa molecular de subunidades (Coelho & Silva, 2000).

Uma outra caracterização da molécula é a definição da seqüência aminoacídica ou estrutura primária da lectina e a subsequente determinação da homologia com outras proteínas (Rego *et al.*, 2002).

1.1.4 Lectinas vegetativas

As lectinas têm sido purificadas principalmente a partir de sementes de leguminosas maduras, representando cerca de até 10% do conteúdo de proteína total (Konozy *et al.*, 2003); no entanto estas proteínas ou glicoproteínas também podem ser obtidas de diferentes tecidos vegetais tais como raízes (Wu *et al.*, 2000), cascas de árvores (Wititsuwannakul *et al.*, 1998), folhas (Konozy *et al.*, 2002), flores (Ito, 1986), frutos (Sampietro *et al.*, 2001), bulbos (Mo *et al.*, 1994) e rizomas (Ng *et al.*, 2001).

As lectinas de sementes diferem estruturalmente. Por exemplo, a lectina de *Vatairea macrocarpa* é uma molécula constituída por uma única ou duas cadeias polipeptídicas, que mantêm 55% de sua atividade após aquecimento a 100 °C durante 5 min (Cavada *et al.*, 1998). Similarmente, a lectina isolada de sementes de *Sphenostyles stenocarpa* (Machuka *et al.*, 1999) também apresenta uma estrutura oligomérica, um tetrâmero de massa

molecular 122.000 Da, porém sua atividade foi totalmente abolida após tratamento térmico (80 °C).

Duas lectinas de folhas de amoreira (*Morus alba*) MLL 1 e MLL 2 apresentam alta especificidade de ligação ao ácido siálico; inibição do crescimento de uma bactéria fitopatogênica chamada *Pseudomonas syringae* pv *mori* foi observada com MLL 1. Ácido siálico encontrado freqüentemente em carboidratos de glicoconjugados representa importante papel em muitos mecanismos de reconhecimento biológico. Lectinas com especificidade para diferentes formas de ácido siálico têm sido usadas como ferramenta diagnóstica na identificação de bactérias patogênicas e tumores malignos (Ratanapo *et al.*, 1998 e 2001).

Outras lectinas foram purificadas a partir de folhas como a de *Bauhinia monandra*, BmoLL, uma lectina galactose-específica (Coelho & Silva, 2000) e a de *Erythrina indica*, EiLL (Konozy *et al.*, 2002).

Diferentes funções têm sido creditadas a lectinas de plantas, incluindo transporte de carboidratos, empacotamento e/ou mobilização de proteínas estocadas (Nomura *et al.*, 1998, Ratanapo *et al.*, 2001), defesa contra o ataque de insetos e outros predadores (Sengupta *et al.*, 1997); muitas lectinas são potentes imunomoduladores (Oudrhiri *et al.*, 1985), influenciando a proliferação de linfócitos humanos (Ghosh *et al.*, 1999).

1.1.5 Aplicação biotecnológica e papel fisiológico

As lectinas apresentam vasta área de aplicabilidade podendo ser ferramentas valiosas em processos biotecnológicos, nas áreas de pesquisa médica, biológica, farmacológica e bioquímica. As lectinas têm sido utilizadas para detecção e separação de glicoconjugados. Podem ser usadas para explorar superfícies celulares, ligando-se a porção carboidrato de glicoproteínas ou glicolipídeos que se projeta na célula (Sarkar *et al.*, 1991) e portanto para diagnóstico em processos de desenvolvimento, diferenciação e transformação neoplásica (Remani *et al.*, 1994) bem como na determinação de tipos sanguíneos (Khang *et al.*, 1990). As lectinas já são usadas no tratamento de condições pré-cancerosas (Wroblewski *et al.*, 2001), na avaliação de linhagens de células de câncer mamário humano (Schumacher *et al.*, 1995) e quando imobilizadas em suportes inertes,

servem como matrizes de afinidade para o isolamento de glicoconjugados (Paiva *et al.*, 2003).

A lectina de *Canavalia ensiformis*, concanavalina A (Con A) age como um mitógeno e sua atividade pode ser inibida por baixas concentrações de monossacarídeos, como manose. A inibição da atividade levou à conclusão que a estimulação mitogênica resultou da ligação da lectina a carboidratos da superfície celular dos linfócitos (Sharon & Lis, 1987; Sharon, 1989). Outro excelente mitógeno, para as células T humanas e esplênicas murina, é a lectina artocarpina isolada de sementes de *Artocarpus integrifolia* (Miranda-Santos *et al.*, 1991 b).

A lectina de alho (*Allium sativum*) eficientemente reduziu o crescimento de células tumorais humanas e portanto tem perspectivas de aplicação clínica (Karasaki *et al.*, 2001); a propriedade de ligação a células tumorais torna as lectinas potenciais ferramentas bioadesivas na entrega de drogas (Gabor *et al.*, 2001).

A observação que a lectina com atividade antifúngica isolada de *Phaseolus vulgaris* exerceu forte ação inibitória sobre a protease HIV-1 (Ng *et al.*, 2002) é mais um exemplo do potencial aplicativo dessas biomoléculas.

A associação da aglutinina de germe de trigo (WGA) a copolímeros como a N-(2-hidroxipropil) metacrilamida (HPMA) permitiu a formação de um conjugado copolímero-droga que foi usado para o tratamento de condições pré-cancerosas (Wróblewski *et al.*, 2001).

Algumas lectinas de planta apresentam ação inseticida contra larvas de insetos, que causam danos à produção agrícola resultando em grandes perdas econômicas, o que possibilita o uso destas proteínas como bio-inseticida. Uma lectina extraída da alga vermelha *Gracilaria ornata*, GOL, apresentou ação inseticida contra larvas da espécie *Callosobruchus maculatus* (Yáskara *et al.*, 2005). A lectina de folhas de *Bauhinia monandra*, BmoLL, atuou como inseticida biológico contra larvas de *Anagasta kuehniella*, *Zabrotes subfasciatus* e *Callosobruchus maculatus* (Macedo *et al.*, 2006).

Fisiologicamente as lectinas atuam no mecanismo de defesa da planta inibindo o crescimento de algumas bactérias fitopatogênicas (Ratanapo *et al.*, 2001), na interação parasito/hospedeiro (Piazza *et al.*, 1996), na adesão de agentes infecciosos às células

hospedeiras (Hirsch, 1999) e no recrutamento de leucócitos aos sítios inflamatórios (Moreira *et al.*, 1998; Sharon & Lis, 2001).

1.2 Imobilização de Proteínas

As proteínas imobilizadas podem ser definidas como aquelas moléculas que estão fisicamente confinadas ou localizadas em uma região definida do espaço. Estabelece-se em torno delas um micro-ambiente distinto daquele que é observado na proteína nativa e solúvel. São estas circunstâncias micro-ambientais que originam a alteração das suas propriedades e que dependem da sua natureza, do suporte e de outros intervenientes, tais como substratos e inibidores.

A imobilização de proteínas em suportes insolúveis tem sido objeto de estudo nas últimas décadas e conseqüentemente, muitas metodologias e uma vasta gama de aplicações tem sido sugerida, porque o derivado protéico obtido retém parte ou a totalidade das suas propriedades biológicas. As proteínas têm sido imobilizadas em estruturas poliméricas, insolúveis em meio aquoso, de maneira que conjugados biotecnologicamente ativos são obtidos (Carneiro-da-Cunha *et al.*, 1999, 2002); o método visa o aumento da estabilidade da molécula protéica e a reutilização do produto obtido (Chagas, 2001; Amorim *et al.*, 2003).

As metodologias utilizadas em imobilização podem ser agrupadas em quatro grandes classes: adsorção; enclausuramento em uma matriz semipermeável ou no interior de polímeros; reações cruzadas, através do uso de reagentes multifuncionais ou bifuncionais; e ligação covalente a suportes poliméricos, via grupamentos químicos (Powell, 1990). Nesse método, a proteína se liga a um suporte sólido através de ligação covalente envolvendo diretamente os resíduos de aminoácidos e os grupos reativos da superfície do suporte ou, através do uso de reagentes di ou multifuncionais. Como a maioria dos suportes utilizados para a ligação covalente não apresenta grupos reativos que se ligam diretamente à proteína, torna-se necessário o uso de métodos de ativação que podem ser reações de diazotação, de formação de derivados azidas, de alquilação, de amidação e de utilização de reagentes de condensação, entre outros (Kennedy & White, 1985).

Cromatografia por afinidade com lectinas imobilizadas, resultou em uma crescente utilização dessas versáteis proteínas como instrumento em pesquisas biotecnológicas.

Suportes de afinidade com lectinas comerciais imobilizadas são largamente utilizados (Saito *et al.*, 1993; Hashim *et al.*, 1994; Gottschalk *et al.*, 2002). Con A imobilizada tem sido usada para purificar glicoproteínas (Helmholz *et al.*, 2003), entre estas se pode citar a purificação de peroxidase de diferentes fontes (Miranda *et al.*, 2002, Guo & Ruckenstein, 2003; Fraguas *et al.*, 2004). Um inibidor de tripsina de sementes de *Echinodorus paniculatus* foi isolado utilizando cromatografia de afinidade sobre uma preparação contendo isolectinas de *Cratylia mollis* imobilizada em Sepharose CL-4B (Paiva *et al.*, 2003). Uma lectina bastante conhecida comercialmente, WGA, quando imobilizada em contas de agarose superporosas, ativadas por brometo de cianogênio foi capaz de se ligar a células vermelhas do sangue (Gottschalk *et al.*, 2003).

A interação entre imunoglobulinas e lectinas também tem sido demonstrada por diversos autores. Como exemplo, tem-se uma lectina de sementes de *Artocarpus integer* imobilizada a Sepharose 4-B capaz de se ligar a IgA1 purificada, além de outras glicoproteínas O-glicosiladas presentes no soro humano como a α_1 -antiquimotripsina, glicoproteína α_2 -HS e hemopexina. Ig A1 não O-glicosilada não foi capaz de se ligar à lectina imobilizada (Rahman *et al.*, 2002).

Lectinas imobilizadas também têm sido usadas para a separação entre linfócitos normais e células T leucêmicas correlacionando a eficiência da separação com a ligação lectina/célula (Bakalova & Ohba, 2003).

Além da Sepharose CL-4B, ativada por brometo de cianogênio (Figura 3), outros suportes podem ser utilizados para imobilizar proteínas, por exemplo, o dacron ferromagnetizado (polietilenotereftalato) foi eficiente na imobilização de uma lectina de pericarpo de *Punica granatum* L. (Alves, 2002); a polianilina (PANI), polímero orgânico obtido a partir da polimerização da anilina, foi eficiente na fixação da xantina oxidase (Nadruz *et al.*, 1996) e da glicose oxidase (Leite *et al.*, 1994) preservando as propriedades catalíticas das mesmas. Polimixina B (PmB), um decapeptídeo cíclico, é considerado como suporte natural isolado de *Bacillus polymyxa* capaz de imobilizar a Con A por adsorção, principalmente, através de ligações hidrofóbicas entre o peptídeo e a lectina (Masárová *et al.*, 2004).

A característica de lectinas em se ligarem específica e reversivelmente a carboidratos, permite suas imobilizações em matrizes inertes para a purificação e caracterização de glicoconjugados (Theopold *et al.*, 2001).

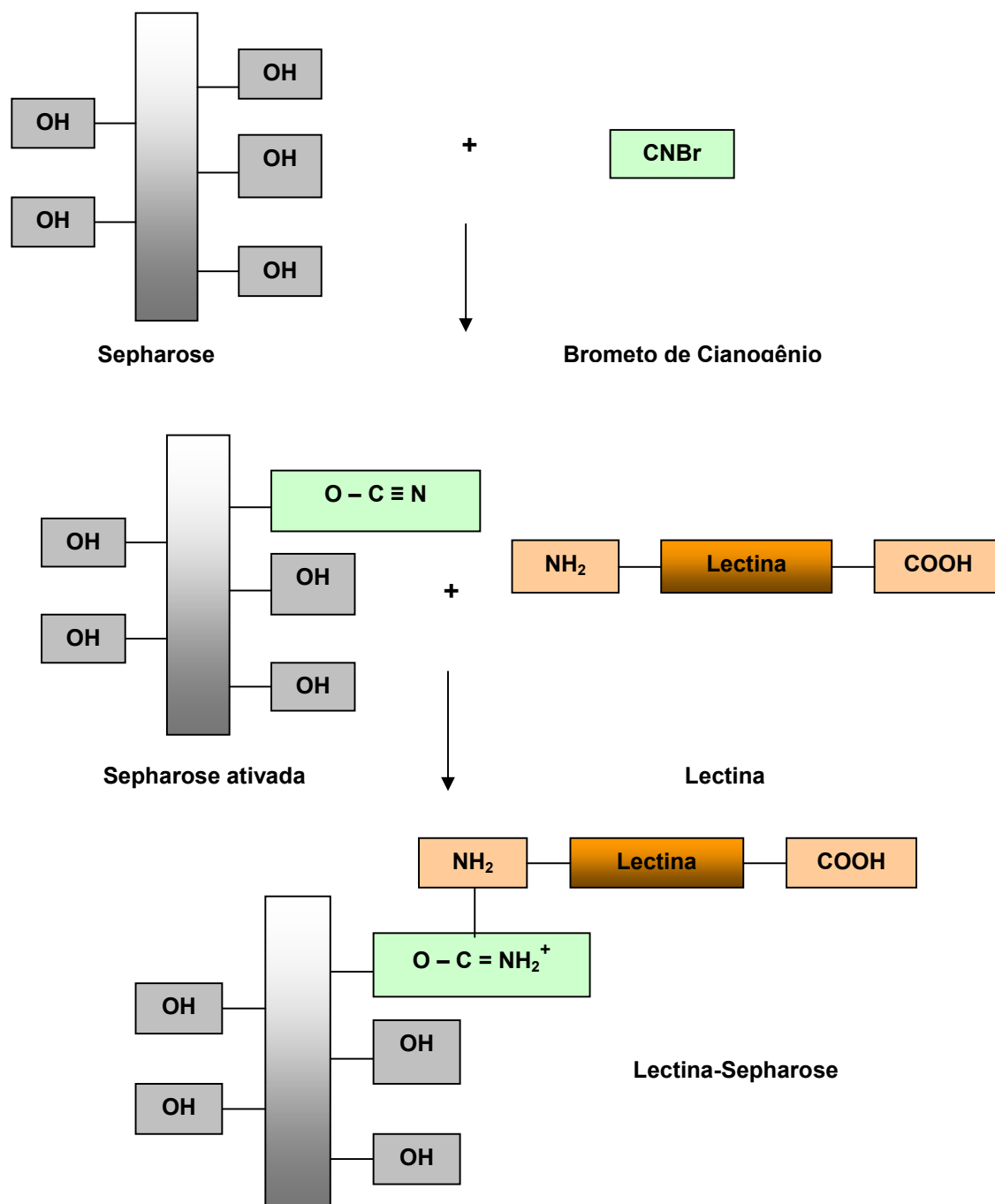


Figura 3. Esquema da Imobilização de lectinas em Sepharose CL-4B.

1.3 Glicoproteínas

O termo glicoproteínas refere-se àquelas proteínas possuidoras de arranjos mais ou menos complexos de oligossacarídeos ligados covalentemente. A maioria das proteínas secretadas por células eucarióticas são glicoproteínas. A densidade e a negatividade elétrica das cargas das cadeias de oligossacarídeos protegem algumas proteínas do ataque de enzimas proteolíticas. A porção carboidrato comumente constitui entre 1 % e ao redor de 70 % o peso de uma glicoproteína. Algumas glicoproteínas têm apenas um ou poucos grupos de carboidratos; outras apresentam numerosas cadeias de oligossacarídeos, as quais podem ser lineares ou ramificadas (Lehninger, 2002).

A porção glicídica das glicoproteínas lhes confere uma vasta área de aplicabilidade nas pesquisas médica, farmacológica e bioquímica. São várias as glicoproteínas conhecidas de interesse comercial.

A glicoproteína avidina constitui 0,05 % das proteínas totais da clara do ovo e possui um ponto isoelétrico de 10. A avidina tem uma massa molecular de 66.000 Da sendo composta de quatro subunidades idênticas, capazes de se ligar a moléculas de biotina. O complexo avidina-biotina é uma das mais estáveis interações não covalentes conhecidas e tem uma constante de dissociação de 10^{-5} M. A formação do complexo entre biotina e avidina é extremamente rápida e uma vez formado é resistente a ampla faixa de valores de pH, temperatura e solventes orgânicos. O complexo avidina-biotina é extremamente usado como um reagente de detecção para anticorpos e proteínas (Rothmund *et al.*, 2002).

Tiroglobulina é uma glicoproteína precursora de hormônios contendo iodo, presente no colóide de folículos da glândula tireóide (Giraud *et al.*, 2005). Supre o corpo com hormônios da tireóide (tiroxina e 3,5,3'-triiodotironina) e é usada clinicamente para tratar hipotireoidismo, condição em que a glândula não produz esses hormônios em quantidades suficientes (Djemli *et al.*, 2004). Também é usada como marcador seguro de doenças recorrentes em pacientes com carcinoma de tireóide bem diferenciado após cirurgia (Pacini & Pinchera, 1999).

1.4 O gênero *Bauhinia* e a espécie *B. membranacea*

O gênero *Bauhinia* (Fabaceae) compreende aproximadamente 300 espécies encontradas principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do hemisfério ocidental e oriental (Lewis, 1987). Este gênero contém numerosas espécies ornamentais que estão bem distribuídas nas cidades brasileiras; espécies nativas ou introduzidas têm sido usadas como forrageiras e na medicina popular, para o tratamento de diabetes e como um diurético.

Uma característica peculiar do gênero *Bauhinia* é o formato de suas folhas bifoliadas em forma de “pata-de-vaca”, conforme é conhecida popularmente. Em Pernambuco, podem ser encontradas espécies nativas como *B. acuruana* Moric, *B. breviola* Benth, *B. cheilantha* Stend, *B. forficata* Link, *B. heterandra* Benth, *B. monandra* Kurz, *B. membranacea* Benth, entre outras.

A espécie *B. membranacea* é encontrada na Região da Zona da Mata do Estado de Pernambuco. É conhecida como “pata-de-vaca” ou “mororó rasteiro” (Figura 4) sendo comumente utilizada na pastagem por animais da região. *B. membranacea* é uma planta trepadeira que apresenta flores pequenas e de cor branca, características que a diferenciam de outras espécies do mesmo gênero.



Figura 4. Aspecto de folhas de *Bauhinia membranacea*.

2 JUSTIFICATIVA

Infusões de folhas do gênero *Bauhinia* são bastante utilizadas na medicina popular por apresentar efeito hipoglicemiante e diurético.

Esse efeito hipoglicemiante foi comprovado cientificamente após o uso de *B. divaricata* (Roman-Ramos *et al.*, 1992), *B. candicans* (Lemus *et al.*, 1999), e mais recentemente *B. forficata*, a qual apresentou atividade hipoglicemiante em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina (Pepato *et al.*, 2002) e por aloxano (Silva *et al.*, 2002 b).

Em termos comparativos com lectinas de sementes, escassa literatura relata a purificação de lectina de folhas, talvez por conta do seu baixo rendimento. Todavia, a vasta utilização de infusões de folhas de diversas famílias na medicina popular tem despertado interesse na purificação de lectinas a partir deste tecido vegetal com o objetivo de atribuir ou não o efeito farmacológico à ação destas proteínas. A observação de que algumas espécies vegetais são resistentes a bactérias fitopatogênicas, ou seja, suas folhas permanecem íntegras quando em contato com determinados patógenos, também chamou a atenção de pesquisadores.

A purificação de uma lectina, galactose específica, de folhas de *B. monandra*, BmoLL, (Coelho & Silva, 2000) despertou interesse na purificação de lectinas de outras espécies do mesmo gênero, dentre as quais a *B. membranacea*.

A importância do trabalho encontra diretrizes quanto à utilização da lectina de folhas de *B. membranacea* (BmeLL) em futuros testes de atividades biológicas que permitam avaliar seu papel como agente hipoglicemiante possibilitando, também, a redução de possíveis efeitos adversos decorrentes da utilização de um extrato que contém numerosos compostos além da substância de interesse, determinando uma concentração padrão na relação droga-resposta, evitando possíveis riscos de superdosagem. BmeLL poderá igualmente servir à caracterização celular de superfícies transformadas malignamente, como também, servir como matriz de afinidade, após imobilização em um suporte, para purificar glicoproteínas de interesse comercial.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Identificar em folhas de *B. membranacea* proteína com atividade hemaglutinante, bem como purificar e caracterizar a lectina isolada.

3.2 Objetivos específicos

- Extrair a lectina de folhas de *B. membranacea*;
- Isolar a lectina através de fracionamento salino;
- Purificar a lectina através de métodos cromatográficos;
- Avaliar as preparações lectínicas através de eletroforese;
- Avaliar o efeito do pH, de íons e da temperatura na atividade hemaglutinante da lectina pura;
- Avaliar a atividade hemaglutinante da lectina pura frente a eritrócitos de coelho e humanos;
- Inibir a atividade hemaglutinante da lectina usando diferentes carboidratos e glicoproteínas;
- Imobilizar a lectina em Sepharose CL-4B para purificar glicoproteínas de interesse biotecnológico.

4 Artigo a ser submetido ao periódico Biotechnology Progress

**PURIFICATION OF A LEAF LECTIN FROM
Bauhinia membranacea AND ITS IMMOBILIZATION
ON SEPHAROSE CL-4B TO ISOLATE
GLYCOPROTEINS**

MARIANA P. FERNANDES, PATRÍCIA M. G. PAIVA & LUANA C. B. B. COELHO.

PURIFICATION OF A LEAF LECTIN FROM *Bauhinia membranacea* AND ITS IMMOBILIZATION ON SEPHAROSE CL-4B TO ISOLATE GLYCOPROTEINS

MARIANA P. FERNANDES, PATRÍCIA M. G. PAIVA & LUANA C. B. B. COELHO*

Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, 50.670-420, Recife-PE, Brazil.

Abstract

Species of the genus *Bauhinia* (Fabaceae) have been used in popular medicine as hypoglycaemic agents. The aim of this work was the purification of *B. membranacea* leaf lectin (BmeLL) and its immobilization on Sepharose CL-4B to isolate glycoproteins. A chosen extract (10 %, w/v) was prepared in 0.01 M citrate-phosphate buffer, pH 6.5, containing 0.15 M sodium chloride (selected buffer) by 16 h at 4 °C. The extract was treated with ammonium sulphate and a 0-80 % fraction (F0-80%) was used to isolate the lectin since it showed the highest specific hemagglutinating activity (SHA). Chromatography on guar gel column was used to purify the lectin; the matrix was equilibrated with 0.15 M sodium chloride. Protein elution was performed with 0.02 M sodium hidroxide, pH 11. SDS-PAGE (8.5 %, w/v) revealed pure BmeLL. The lectin agglutinated at higher titers rabbit and human erythrocytes; it was not stimulated in the presence of ions (Ca^{++} , Mg^{++}). BmeLL showed better SHA with 0.01 M citrate-phosphate buffer, pH 6.0, containing 0.15 M sodium chloride. A temperature assay revealed that BmeLL was thermostable. The gel filtration chromatographic profile on a Sephacryl S-300 column showed a main protein peak. Casein, fetuin, thyroglobulin, azocasein and asialofetuin abolished BmeLL activity. BmeLL immobilized on Sepharose CL-4B was efficient to bind avidin and thyroglobulin as well as glycoproteins from egg white and hog thyroid.

Keywords: Purification, lectin, *Bauhinia membranacea*, immobilization, avidin and thyroglobulin.

*Corresponding autor. Tel.-fax: 55-0(xx)8121268541; E-mail address: marianapfernandes@yahoo.com.br

1. Introduction

Lectins are multivalent proteins or glycoproteins, of non-immune origin, which bind carbohydrates and reversibly agglutinate cells (1, 2). Lectins have a wide distribution in nature being identified in microorganisms (3), animals (4), and plants (5). The latter has being the largest source of lectins, serving as the main tools for the purification of this macromolecules. Lectins have been obtained from different vegetative tissues such as seeds (5), barks (6), roots (7), bulbs (8), pods (9) and leaves (1).

Lectins are invaluable tools in glycoconjugate research due to their unique ability to recognize and bind specifically carbohydrates without chemically modifying them (10). The lectins have broad application in biotechnology processes, on areas such as medical, biological, pharmacological and biochemistry research. Lectins have already being used in treatment of pre-cancerous conditions (11), such as histochemistry markers for meningothelial tumor (12), assessment of cell lineage from human mammary cancer (13), biological insecticide (14) and when immobilized in inert supports, act as affinity matrices to glycoconjugate isolation (15).

Two leaf lectins from mulberry (*Morus alba*) MLL 1 and MLL 2 showed high specificity to sialic acids; growth inhibition of the phytopatogenic bacterium *Pseudomonas syringae* pv *mori* was observed with MLL 1. Sialic acids which are often found as terminal sugars of glycoconjugates play important roles in many biological recognition mechanisms. Lectins with specificity to different forms of sialic acids therefore have been increasingly used as diagnostic tools to identify pathogenic bacteria and malignant tumors (1,16).

The genus *Bauhinia* (Fabaceae) contains a number of ornamental species which are well distributed in Brazilian cities; besides the beauty of flowers this genus attract attention since the leaves are similar to a cow paw, according to popular acquaintance. Infusions of leaves from *Bauhinia* have been used in popular medicine with hypoglicemiant and diuretic properties (17). Lectins have already been isolated from *Bauhinia* genus; a leaf lectin from *B. monandra* (BmoLL) was purified by guar gel column and showed especificity to galactose. An insecticidal action was detected to BmoLL (18). *B. membranacea* species is a vine leguminoseae, used as native forage, with small white flowers.

Methods of protein immobilization are important steps in the analysis of lectin–glycoconjugate interaction. It is advantageous to immobilize the lectin because of the possibility for rapid screening of a large number of glycoconjugates in a relatively short time (19).

The interest on glycoprotein purification represents a broad area of application on biotechnological research. The glycoprotein avidin constitutes 0.05% of total egg white protein and has an isoelectric point of 10.0. Avidin has a molecular mass of 66,000 Da and is composed of four identical subunits. Each subunit is made up of 128 amino acid residues and is able to bind one molecule of biotin. The ability of avidin to bind biotin with exceptionally high affinity has been the basis for its exploitation as a molecular tool in biotechnological, diagnostic and therapeutic applications, collectively known as avidin-biotin technology (20, 21).

Thyroglobulin (Tg) is the main iodoprotein of the thyroid gland, stored at high concentrations in the thyroid follicular lumen, with a molecular mass of 660,000 and a sedimentation coefficient of about 19S on homodimeric form. During thyroperoxidase-catalysed oxidation, as side effects, some Tg molecules generate other polymeric forms of Tg with sedimentation coefficients of 27S and 37S and an insoluble multimeric form. Tg provides the support for the synthesis of thyroxine (T4) and 3,5,3'-triiodothyronine (T3), the main thyroid hormones, which are released from the thyroid gland following Tg proteolysis (22, 23).

The present study describes a simple protocol purification of the leaf lectin from *B. membranacea* (BmeLL) in mg amounts, its immobilization on Sepharose CL-4B and affinity adsorption of avidin and thyroglobulin on chromatography on BmeLL-Sepharose column.

2. Materials and Methods

2.1 Extraction and ammonium sulphate treatment. Leaves of *B. membranacea* were triturated and the leaf flour was mixed in 0.01 M citrate-phosphate buffer, pH 6.5, containing 0.15 M sodium chloride (selected buffer), for a final concentration of 10% (w/v). The extraction was performed under constant agitation (16 h at 4°C). The extract was passed through gauze and centrifuged at 8.000 rpm, for 15 min, at 4°C. Then the crude

extract was submitted to 80% (w/v) ammonium sulphate fractionation by addition of solid salt. After 4 h at room temperature, the fraction 0-80 % (F0-80 %) was dialysed against distilled water, followed by 0.15 M sodium chloride for 8 h .

2.2 Hemagglutinating activity assay. Hemagglutinating activity (HA) was determined in wells of microtiter plates (Kartell S.P.A., Italy) in a final volume of 100 μ L. Each well contained 50 μ L of lectin solution and 50 μ L of glutaraldehyde (Merck, Germany) treated erythrocytes (24). Agglutination was assessed after incubation for 45 min at room temperature, and agglutinating activity was expressed as units, namely, the reciprocal of the highest dilution that gave a positive result.

2.3 Purification protocol for BmeLL. BmeLL was purified from leaves of *B. membranacea* by affinity chromatography using guar gel column (10 mL) at a flow rate of 20 mL/h. A sample (38 mg) of F0-80 % was applied to the column and the matrix was washed with 0.15 M sodium chloride until absorbance at 280 nm < 0.03. The lectin was then eluted with 0.02 M sodium hidroxide solution, pH 11, containing 0.15 M sodium chloride. The fractions exhibiting the hemagglutination activity were combined and protein concentration was measured according to Smith *et al.* (25). The material was stored at -20 °C till further use.

2.4 Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). The homogeneity of purified lectin was evaluated in 8.5 % (w/v) PAGE in the presence of sodium dodecyl sulphate (SDS) according to Laemmli (26), with and without β -mercaptoethanol. Molecular weight markers used were bovine serum albumin, 66,000 Da, ovalbumin, 45,000 Da, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, 36,000 Da, carbonic anhydrase, 29,000 Da, trypsinogen, 24,000 Da, trypsin inhibitor, 20,000 Da and α -lactalbumin, 14,200 Da (Sigma, USA). The gel was stained for protein with Coomassie Brilliant Blue (26). PAGE for native basic (10 %, w/v) and acidic (10 %, w/v) proteins were made according to Reisfeld *et al.* (27) and Davis (28), respectively.

2.5 Gel filtration chromatography. The molecular mass of the native purified lectin was determined by gel filtration Hiperp 16/60 Sephacryl S-300 column (16 mm x 60 cm)/Åkta FPLC system (Amersham Pharmacia Biotech, Sweden) pre-equilibrated at 24 °C with 0.5 M sodium chloride. Samples (2.0 mL; 1 mg of protein) were injected and eluted (3.0 mL fraction) with the same solution at a flow rate of 1 ml min⁻¹. The standards (Sigma, USA) similarly chromatographed were bovine serum albumin (66,000 Da), fetuin (64,000 Da), ovalbumin (45,000 Da), trypsin inhibitor type III-O chicken (28,000 Da) and trypsin (25,000 Da).

2.6 Effects of ions, temperature and pH on BmeLL activity. BmeLL was incubated at room temperature with CaCl₂ and MgCl₂ (0.02 and 0.04 M), submitted to the thermal treatment at 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 and 100 °C for 30 min and evaluated at different pH values. The lectin (50 µL) was diluted in 0.01 M Tris-hydrochloric acid buffer (pH values of 7.5, 8.0, 8.5, 9.0 and 9.5), 0.01 M sodium phosphate buffer (pH values of 6.5, 7.0 and 7.5), and 0.01 M citrate-phosphate buffer (pH values of 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 and 6.5). HA was determined before and after incubation using rabbit erythrocytes.

2.7 Evaluation of BmeLL hemagglutinating activity and inhibition assay. HA of BmeLL was performed with rabbit and human erythrocytes (A, B, AB and O). Inhibition assay was made with sugars (galactose, glucose, mannose, fructose, sucrose, lactose, raffinose, trehalose, cellobiose, arabinose, N-acetyl-D-glucosamine, rhamnose, xylose, methyl- α -D-mannopyranoside, methyl- α -D-glucopyranoside and glucuronic acid) and glycoproteins (asialofetuin, asocasein, casein, fetuin, ovalbumin, thyroglobulin and bovine fetal serum). The inhibition assay was performed in microtiter plates: 50 µL of a solution containing either carbohydrate (200 mM) in 0.15 M sodium chloride, or glycoprotein (125, 250 and 500 µg/mL) in 0.15 M sodium chloride were applied in wells, except on the second well where was applied a solution with twice as concentration tested. Following, 50 µL of lectin preparation was applied in second well and successive dilutions were performed. After 15 min at room temperature, 50 µL of a 2.5 % (v/v) suspension of rabbit erythrocytes was added in a final volume de 100 µL. The result was recorded visually after 45 min at room temperature.

2.8 BmeLL immobilization on Sepharose CL-4B. Cyanogen bromide-activated Sepharose CL-4B (Pharmacia, Sweden) was used for BmeLL immobilization according to Paiva *et al.* (15). CNBr-activated Sepharose CL-4B (3 g) was washed with 0.5 M sodium chloride, pH 2.5, followed by 0.1 M NaHCO₃/0.5 M sodium chloride, pH 8.2. Then, incubation (24 h, 4 °C) was performed with BmeLL (A 280 nm = 2.959, vol = 4 mL). After filtration and washing with NaHCO₃ solution BmeLL-Sepharose CL- 4B matrix was washed with 0.1 M NaHCO₃/0.5 M sodium chloride, pH 8.2, followed by 0.1 M sodium acetate/0.5 M sodium chloride, pH 4.0 and distilled water. A 280 nm was determined in the preparations obtained after filtration and wash; for determination of immobilized BmeLL, the values were compared to total A 280 nm used to immobilization.

2.9 Evaluation of glycoprotein binding on BmeLL-Sepharose CL-4B. Avidin, thyroglobulin (Sigma, USA) glycoproteins (500 µg), crude extract from egg white and crude homogenate from hog thyroid (500 µL) were chromatographed on BmeLL-Sepharose CL-4B column (1 mL) equilibrated (flow rate of 10 mL/h) with 0.15 M sodium chloride. The lectin affinity support was washed with the same solution until A 280 nm < 0.03 nm. Elution was performed with 0.1 M mannose followed by 1.0 M sodium chloride. The procedure for each sample was performed three times. The crude extract from egg white (10 %, v/v) was performed in 0.15 M sodium chloride, while the crude homogenate from hog thyroid (10 %, w/v) was obtained by mild maceration (in potter) in phosphate buffered saline (PBS), pH 7.3.

2.10 Statistical analysis. Statistical analysis used computer package GraphPad Prism, version 4.02. Data were expressed as mean $\pm$ standard deviation.

3. Results and discussion

Lectins have already been purified in mg amounts from the genus *Bauhinia* (29, 30), which could be an indication that fresh leaves from *B. membranacea* contained lectin. In fact, *B. membranacea* leaf extracts in selected buffer agglutinated rabbit erythrocytes. The ammonium sulphate fractionation of proteins in the extract, F0-80 %, was evaluated in

relation to hemagglutinating activity (Table 1); fractionation with salt concentrated interest proteins (1, 31).

F0-80 % was used to isolate the lectin since it showed the highest specific hemagglutinating activity (SHA). A leaf lectin from *Erythrina indica*, EiLL, was also obtained through ammonium sulphate fractionation on a 80 % concentration (2).

Guar gel beads were successfully employed to isolate BmeLL. The chromatographic profile revealed a proteic peak eluted with 0.02 M sodium hidroxide, pH 11. HA was detected only on fractions obtained after elution (Figure 1). This cheap protocol provided BmeLL in mg quantities (Table 1) with a short execution time. Another lectin of the same genus, leaf lectin from *B. monandra*, BmoLL, was also purified by affinity chromatography on guar gel column (29).

SDS-PAGE of active fraction revealed that guar gel column was efficient on BmeLL purification; the lectin showed different pattern in the presence and absence of β -mercaptoethanol reducing agent (Figure 2A). BmeLL on PAGE for native acidic proteins gave a single band (Figure 2B); no protein was detected on PAGE to native basic proteins. The molecular weight after gel filtration chromatography revealed a molecular mass of 29 kDa. The ÄKTA-FPLC system of BmeLL showed a main protein peak revealing the purity of lectin (Figure 3).

The effect of divalent cations on BmeLL SHA revealed that the lectin was not stimulated by Ca^{+2} or Mg^{+2} . Hemagglutinating activity of lectins have been stimulated, inhibited or not affected by ions (31). Hemolymph lectin from the white shrimp *Litopenaeus setiferus* (*Crustacea decapoda*), LsL, was divalent cation-dependent (4), although rhizome lectin from *Arundo donax*, ADL, did not require metal ions for its hemagglutination activity (10).

BmeLL was a thermostable lectin since it showed activity after heating at 100 °C, by 30 min (Figure 4); heating at 100 °C, by 1 h keep 25 % of activity. The lectin from *Vatairea macrocarpa* kept 55 % of activity after heating at 100 °C during 5 min (32). Some lectins lose completely activity after thermal treatment, for example, the seed lectin from *Sphenostyles stenocarpa* had activity completely abolished after heating at 80 °C (33).

The effect of pH on BmeLL hemagglutinating activity showed that the lectin was more active in 0.01 M citrate-phosphate buffer, pH 6.0. The lectin was also active with 0.01

M tris-hydrochloric acid buffer, pH 7.5 to 9.5, and 0.01 M sodium phosphate buffer, pH 6.5 to 7.5 (Figure 5). The maintenance of BmeLL activity at physiological pH is important for biological applications. Some lectins show activity in acidic and basic buffer, others are very sensitive to pH variation. Lectins from *Agardhiella tenira* kept stable at pH 4.0 a 9.0, reduced activity at pH 2.0, 3.0 and 11 and was inactive at pH 12; *Ptilota filicina* lectin kept active at pH range 4.0 to 9.0 (34).

The lectin showed high affinity with all tested erythrocytes. The SHA of BmeLL with rabbit and human A, AB and O was 640; type B human erythrocytes had SHA of 320. No HA inhibition was observed with tested carbohydrates. BmeLL was completely inhibited by glycoproteins casein, fetuin, thyroglobulin, azocasein and asialofetuin; ovalbumin and bovine fetal serum inhibited lectin activity (SHA:1280) to 40 and 80, respectively. Some lectins are not inhibited by mono- or disaccharides but by glycoproteins. The lectin from marine red alga *Gracilaria ornata*, GOL, was not inhibited by L-arabinose, D-fructose, L-fucose, D-fucose, D-galactose, D-galactosamine, D-raffinose, N-acetyl-D-galactosamine, lactose, lactulose, melibiose, methyl α -D-galactopyranoside, glucuronic acid, 2-nitrophenyl α -D-galactopyranoside and 4-nitrophenyl α -D-galactopyranoside, but by complex glycoproteins porcine stomach mucin, lactotransferrin, asialofetuin and bovine and porcine thyroglobulins (14).

BmeLL was immobilized on Sepharose CL-4B (78 % of immobilization); the affinity matrix retained pure glycoproteins avidin and thyroglobulin, as well as glycoproteins from egg white crude extract and hog thyroid crude homogenate. No proteic peak was observed with 0.1 M mannose in 0.15 M sodium chloride but, after this previous stage, elution of glycoproteins was performed with 1.0 M sodium sodium chloride (Figure 6). Column irrigation with mannose probably alter lectin binding site, but protein elution needs changing of ionic strength (35).

The avidin-biotin complex was used for studies on *Helix pomatia* lectin (HPA) binding to detect altered glycoforms in cancer as a prognostic tumoral marker. The tissue section was first incubated with unconjugated HPA which recognised GalNAc residues on cellular glycoproteins. HPA binding was detected by subsequent incubation with first polyclonal rabbit antibody directed against HPA, then a biotinlabelled secondary antibody, and finally horseradish peroxidase labelled avidin (36).

Immobilized BmeLL-Sepharose CL-4B was also efficient on the purification of thyroglobulin from hog thyroid crude homogenate, showing the same standard of eluted material from commercial thyroglobulin (Figure 7). This glycoprotein supplies the body with thyroid hormone and is used to treat hypothyroidism, a condition where the thyroid gland does not produce enough thyroid hormone (37). When human body does not have enough thyroid hormone, it does not function properly, resulting in poor growth, slow speech, lack of energy, weight gain, hair loss, dry thick skin, and increased sensitivity to cold. When taken correctly, thyroglobulin reverses these symptoms.

Affinity BmeLL-Sepharose CL-4B can be an alternative matrix to purify glycoproteins of large biotechnological interest.

4. Conclusions

The present work indicates a simple protocol to isolate in high purity a leaf lectin from *B. membranacea* (BmeLL) in mg amounts. BmeLL, purified by guar gel chromatography, is a thermostable lectin, which showed activity in physiological pH and was inhibited by glycoproteins. Immobilization of BmeLL in Sepharose CL 4-B allowed affinity adsorption of avidin, thyroglobulin and glycoproteins from egg white crude extract and hog thyroid crude homogenate; polyacrylamide gel electrophoresis showed efficient affinity purification of hog thyroid thyroglobulin.

Acknowledgements

The authors express their gratitude to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasil) for research grants and fellowship (LCBBC). The authors are also deeply grateful to the technical assistance of Mrs. Maria Barbosa Reis da Silva.

References

- (1) Ratanapo, S.; Ngamjunyaporn, W.; Chulavatnatol, M. Sialic acid binding lectins from leaf of mulberry (*Morus alba*). *Plant Science* **1998**, 139, 141-148.

- (2) Konozy, E. H. E.; Mulay, R.; Faca, M.; Ward, R. J.; Greene, L. J.; Roque-Barriera, M. C.; Sabharwal, S.; Bhide, S. V. Purification, some properties of a D-galactose-binding leaf lectin from *Erythrina indica* and further characterization of seed lectin. *Biochimie* **2002**, 84, 1035-1043.
- (3) Bhowal, J.; Guha, A. K.; Chatterjee, B. P. Purification and molecular characterization of a sialic acid specific lectin from the phytopathogenic fungus *Macrophomina phaseolina*. *Carbohydrate Research* **2005**, 340, 1973–1982.
- (4) Alpuche, J.; Pereyra, A.; Agundis, C.; Rosas, C.; Pascual, C.; Slomianny, M. C.; Vázquez, L.; Zenteno, E. Purification and characterization of a lectin from the white shrimp *Litopenaeus setiferus* (Crustacea decapoda) hemolymph. *Biochimica et Biophysica Acta* **2005**, 1724, 86-93.
- (5) Sultan, N. A. M.; Swamy, M. J. Fluorescence quenching and time-resolved fluorescence studies on *Trichosanthes dioica* seed lectin. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2005**, 80, 93–100.
- (6) Macewicz, L. L.; Suchorada, O. M.; Lukash, L. L. Influence of *Sambucus nigra* bark lectin on cell DNA under different in vitro conditions. *Cell Biology International* **2005**, 29, 29-32.
- (7) Kino, M.; Yamaguchi, K.; Umekawa, H.; Funatsu, G. Purification and characterization of three mitogenic lectins from the roots of pokeweed (*Phytolacca americana*). *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **1995**, 59, 683-688.
- (8) Mo, H.; Van Damme, E. J. M.; Peumans, W. J.; Goldstein, J. J. Isolation and Characterization of an N-acetyl-D-galactosamine-binding lectin from Dutch iris bulbs which recognizes the blood group A disaccharide (GalNAc α 1-3Gal). *Journal of Biological Chemistry* **1994**, 269, 7666-73.
- (9) Kamemura, K.; Ozeki, M.; Furuichi, Y.; Umekawa, H.; Takahashi, T. Characterization of a lectin from the leaves of Great Northern bean, *Phaseolus vulgaris* L. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **1996 a**, 60 (4), 608-611.
- (10) Kaur, A.; Singh, J.; Kamboj, S. S.; Sexana, A. K.; Pandita, R. M.; Shamnugavel, M. Isolation of an N-acetyl-D-glucosamine specific lectin from the rhizomes of *Arundo donax* with antiproliferative activity. *Phytochemistry* **2005**, 66, 1933-1940.

- (11) Wroblewski, S; Berenson, M; Kopeckova, P; Kopecek, J. Potential of lectin-N- (2-hydroxypropyl) methacrylamide copolymer drug conjugates for the treatment of pre-cancerous conditions. *Journal of Controlled Release* **2001**, 74, 283-293.
- (12) Beltrão, E. I. C.; Medeiros, P. L.; Rodrigues, O. G.; Figueredo-Silva, J.; Valença, M M.; Coelho, L. C. B. B.; Carvalho, Jr. L. B. *Parkia pendula* lectin as histochemistry marker for meningothelial tumor. *European Journal of Histochemistry* **2003**, 47 (2), 139-142.
- (13) Schumacher, U.; Adam, E.; Brooks, S. A.; Leathem, A. J. Lectin binding properties of human breast cancer cell lines and human milk with particular reference to *Helix pomatia* agglutinin. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **1995**, 43 (3), 275-281.
- (14) 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. 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* **2005**, 1724, 137-145.
- (15) Paiva, P. M.; Souza, A. F.; Oliva, M L.; Kennedy, J. F.; Cavalcanti, M. S. M.; Coelho, L. C.; Sampaio, C. A. Isolation of trypsin inhibitor from *Echinodorus paniculatus* seeds by affinity chromatography on immobilized *Cratylia mollis* isolectins. *Bioresource Technology* **2003**, 88 (1), 75-79.
- (16) Ratanapo, S.; Ngamjunyaporn, W.; Chulavatnatol, M. Interaction of a leaf lectin with a phytopathogenic bacterium, *P. syringae pv mori*. *Plant Science* **2001**, 160, 739-744.
- (17) Pepato, M.T.; Keller, E. H.; Baviera, A. M.; Kettelhut, I. C.; Vendramini, R.C.; Brunetti, I. L. Anti-diabetic activity of *Bauhinia forficata* decoction in streptozotocin-diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* **2002**, 81, 191-197.
- (18) Macedo, M. L. R.; Freire, M. G. M.; Da Silva, M. B. R.; Coelho, L. C. B. B. Insecticidal action of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotes subfasciatus* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Comparative Biochemistry and Physiology* **2006**, In Press.

-
- (19) Masarova, J.; Dey, E. S.; Carlsson, J.; Danielsson, B. Novel peptide surface for reversible immobilization of concanavalin A. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **2004**, 60, 163–170.
- (20) Rothmund, D. L.; Thomas, T. M.; Rylatt, D. B. Purification of the basic protein avidin using Gradiflow technology. *Protein Expression and Purification* **2002**, 26, 149–152.
- (21) Marttila, A. T.; Laitinen, O. H.; Airenne, K. J.; Kulik, T.; Bayer, E. A.; Wilchek, M.; Kulomaa, M. S. Recombinant NeutraLite Avidin: a non-glycosylated, acidic mutant of chicken avidin that exhibits high affinity for biotin and low non-specific binding properties. *FEBS Letters* **2000**, 467, 31-36.
- (22) Pacini, F. & Pinchera, A. Serum and tissue thyroglobulin measurement: Clinical applications in thyroid disease. *Biochimie* **1999**, 81, 463-467.
- (23) Giraud, A.; Dicristofaro, J.; De Micco, C.; Lejeune, P. J.; Barbaria, J.; Mallet, B. A plasminogen-like protein, present in the apical extracellular environment of thyroid epithelial cells, degrades thyroglobulin in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2005**, 338, 1000–1004.
- (24) Bing, D. H.; Weyand, J. G. M.; Stavinsky, A. B. Haemagglutination with aldehyde – fixed erythrocytes for assay of antigens and antibodies. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **1967**, 124, 1166-1170.
- (25) Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D.; Fujimoto, E. K.; Goeke, N. M.; Olson, B. J.; Klenk, D. C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* **1985**, 150 (1), 76-85.
- (26) Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**, 227, 680-685.
- (27) Reisfeld, R. A.; Lewis, U. J.; Williams, D. E. Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. *Nature* **1962**, 195, 281-283.
- (28) Davis, B. J. Disc electrophoresis II: method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1964**, 121, 404-427.

- (29) Coelho, L.C. B. B.; Silva, M. B. R. Simple method to purify milligram quantities of the galactose-specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*. *Phytochemical Analysis* **2000**, 11, 295-300.
- (30) Pinto-da-Silva, L. H.; Camurate, M.; Costa, K. A.; Oliveira, S.M.P.; Da Cunha-e-Silva, N. L.; Saraiva, B. E. M. *Leishmania (Viannia) braziliensis* metacyclic promastigotes purified using *Bauhinia purpurea* lectin are complement resistant and highly infective for macrophages in vitro and hamsters in vivo. *International Journal of Parasitology* **2002**, 32 (11), 1371-1377.
- (31) Paiva, P. M. G & Coelho, L. C. B. B. Purification and Partial Characterization of two lectins isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu Bean). *Applied Biochemistry and Biotechnology* **1992**, 36, 113-118.
- (32) Cavada, B. S.; Santos, C. F.; Grangeiro, T. B.; Nunes, E. P.; Sales, P. V. P.; Ramos, R. L.; De Sousa, F. A. M.; Crisostomo, C. V.; Calvete, J. J. Purification and characterization of a lectin from seeds of *Vatairea macrocarpa* Duke. *Phytochemistry* **1998**, 49 (3), 675-680.
- (33) Machuka, J. S.; Okeola, O. G.; Els, J. M. V. D.; Chrispeels, M. J.; Leuven, F. V.; Peumans, W. J. Isolation and partial characterization of galactose-specific lectins from African yam beans, *Sphenostyles stenocarpa* Harms. *Phytochemistry* **1999**, 51, 721-728.
- (34) Sampaio, A. H.; Rogers, D. J.; Barwell, C. J. A. A galactose specific lectin from the red marine alga *Ptilota silicina*. *Cytochemistry* **1998**, 8 (5), 765-769.
- (35) Weis, W. I.; Drickamer, K. Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. *Annu. Rev. Biochem.* **1999**, 65, 441-473.
- (36) Brooks, S. A.; Wilkinson, D. Validation of a simple avidin-biotin detection method for *Helix pomatia* lectin (HPA) binding as a prognostic marker in cancer. *Acta Histochemica* **2003**, 105 (3), 205-212.
- (37) Djemli, A.; Fillion, M.; Belgoudi, J.; Lambert, R.; Delvin, E. E.; Schneider, W.; Vliet, G. V. Twenty years later: a reevaluation of the contribution of plasma thyroglobulin to the diagnosis of thyroid dysgenesis in infants with congenital hypothyroidism. *Clinical Biochemistry* **2004**, 37, 818- 822.

Table 1. Summary of BmeLL purification.

Preparation	Total protein (mg)	Total HA	S HA	Purification (fold)	Yield (%)
Crude extract	2,275	266,240	117	1	100
Fraction 0-80 %	304	65,536	216	1.8	25
BmeLL preparation	7.4	4,096	556	4.7	50

Hemagglutinating activity (HA) was made with 2.5 % (v/v) suspension of glutaraldehyde treated rabbit erythrocytes. SHA, Specific HA: titer⁻¹/protein. Yield was expressed as percentage of total HA isolated.

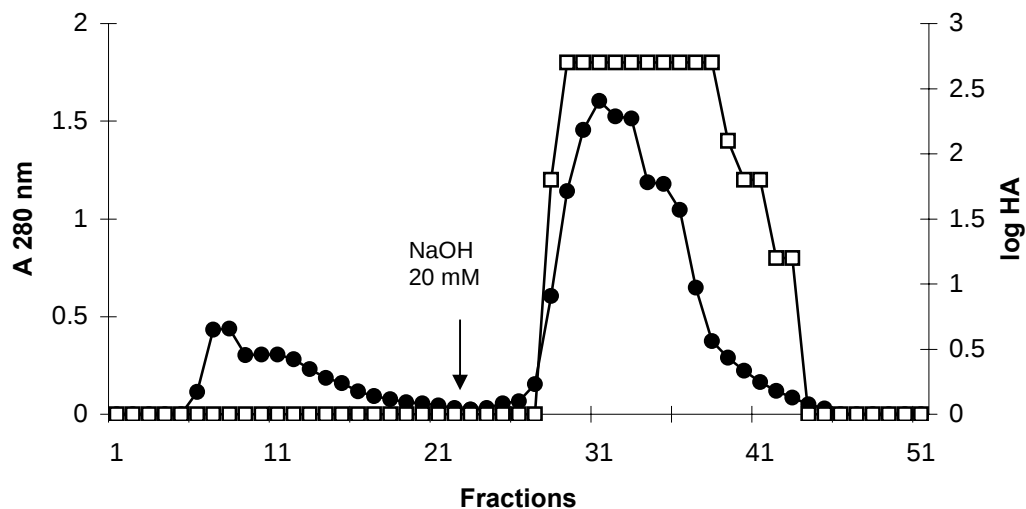


Figure 1. Chromatogram (● absorbance at 280 nm; □ log HA) of *Bauhinia membranacea* leaf lectin on a guar gel column.

Fraction 0-80 % (37.55 mg protein) was applied to a 10 mL column, and samples (2 mL) were collected at 20 mL/h. The column was washed with 0.15 M sodium chloride and subsequently eluted with 0.02 M sodium hidroxide solution, pH 11. The active fractions with protein were pooled.

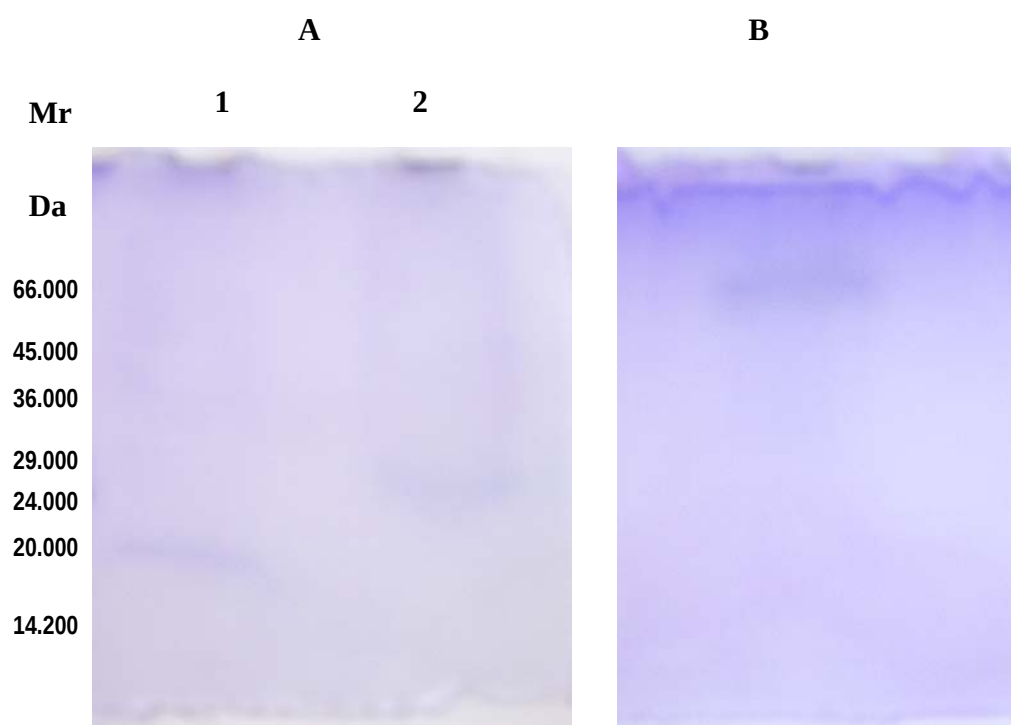


Figure 2. Electrophoretic patterns of BmeLL.

BmeLL (230 μ g) in the presence (1) and absence (2) of β -mercaptoethanol. SDS-polyacrylamide gel (A); Native-polyacrylamide gel for acidic protein (B). The molecular weight markers were: bovine serum albumin, 66,000, ovalbumin, 45,000 Da, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, 36,000 Da, carbonic anhydrase, 29,000 Da, trypsinogen, 24,000 Da, trypsin inhibitor, 20,000 Da and α -lactalbumin, 14,200 Da.

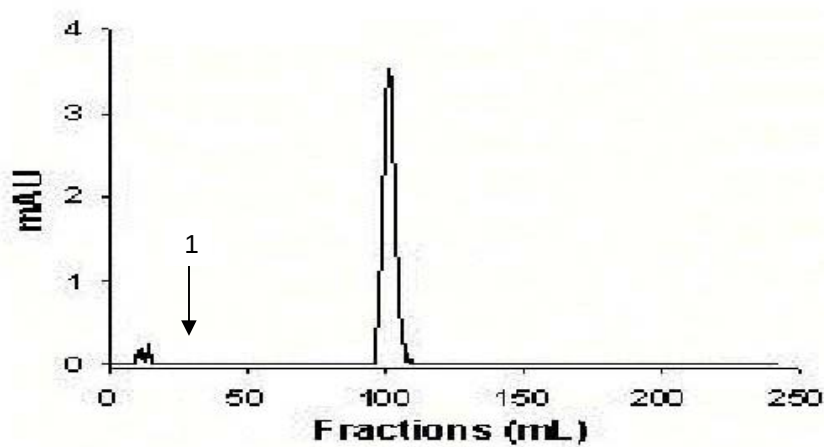


Figure 3. BmeLL Gel Filtration Chromatography.

The lectin was applied on a Sephacryl S-300 column and a main protein peak was obtained; elution was performed with 0.5 M NaCl (1).

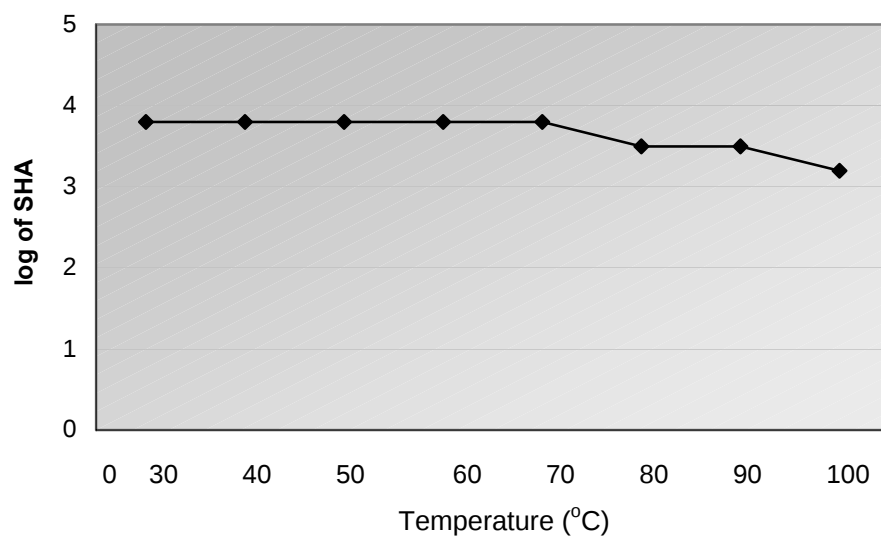


Figure 4. Specific hemagglutinating activity of BmeLL at different temperatures. SHA (Specific hemagglutinating activity): $\text{titer}^{-1}/\text{protein (mg/mL)}$.

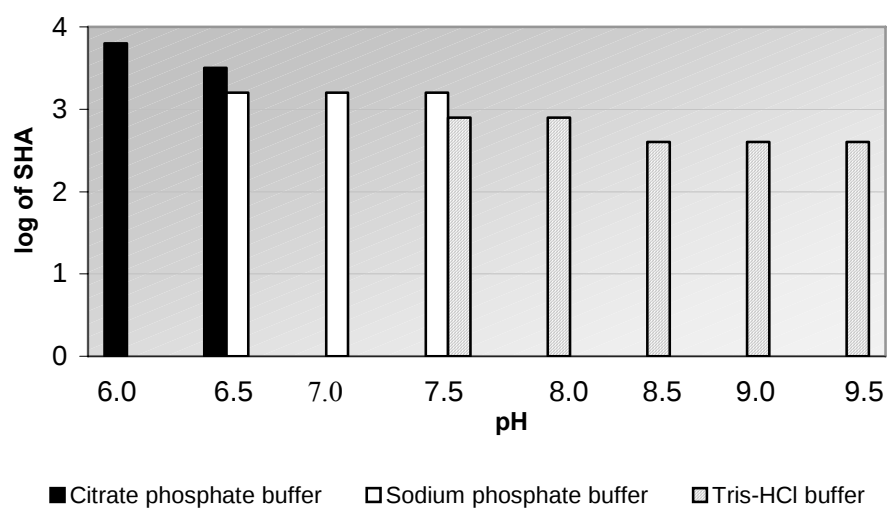


Figure 5. Effect of pH on the specific hemagglutinating activity of BmeLL.
Log of SHA (specific hemagglutinating activity) of BmeLL in 0.15 M sodium chloride:
3.8.

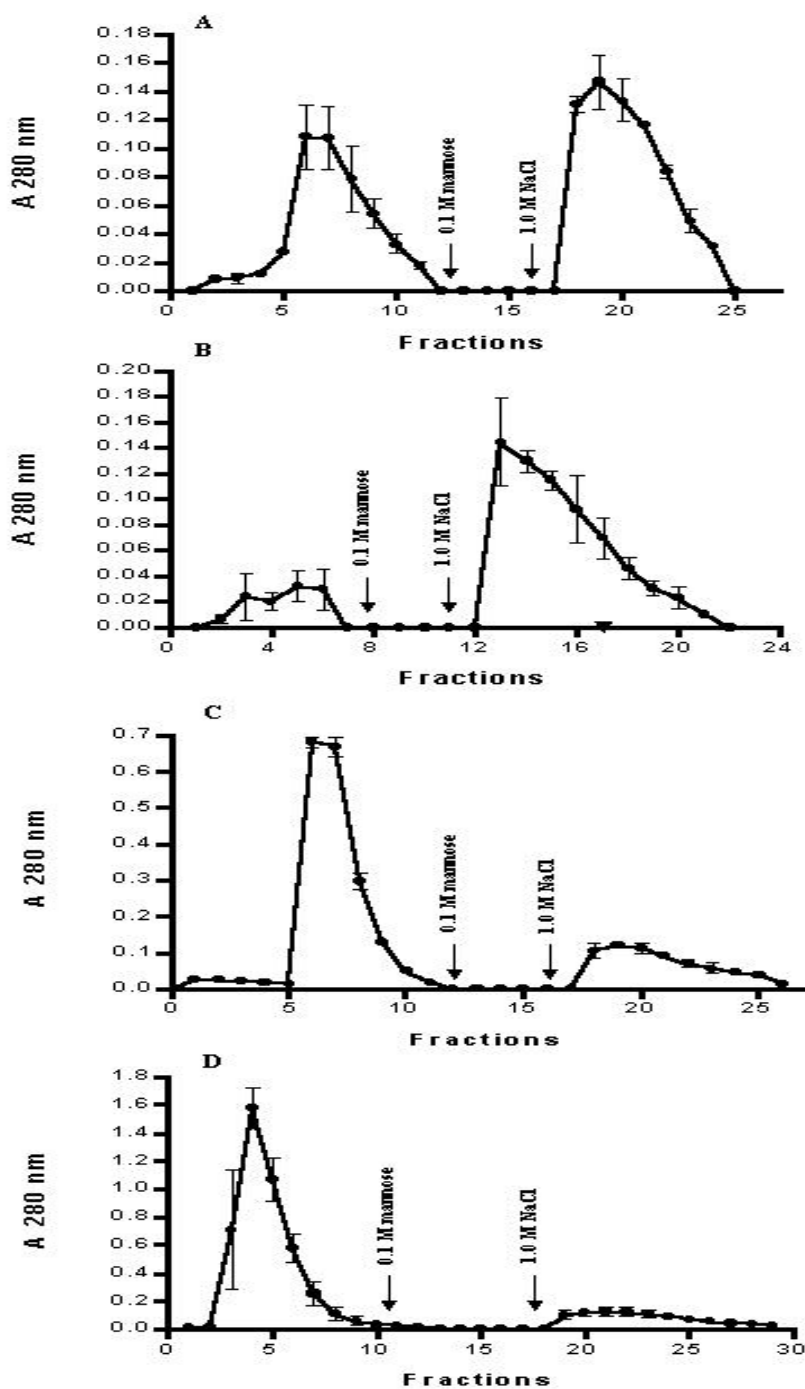


Figure 6. Cromatography on BmeLL-Sepharose CL-4B.

Sample (500 μ g) of avidin (A), thyroglobulin (B) and crude extracts (500 μ L) from egg white (C) and hog thyroid (D) were applied to the column; arrows demonstrate eluent added. Fractions of 1.0 ml were collected. Each bar represents the mean $\pm$ S.D. of three experiments.



Figure 7. Electrophoretic patterns of commercial thyroglobulin (1) and glycoprotein from hog thyroid crude homogenate (2) desorbed from BmeLL-Sepharose CL -4B column. SDS-polyacrylamide gel (10 %, w/v) with β -mercaptoethanol.

5 CONCLUSÕES

- Ensaios de hemaglutinação com eritrócitos de coelho revelaram que tampão citrato fosfato 0,01 M, pH 6,5, contendo NaCl 0,15 M (tampão selecionado) foi a melhor solução para extração da lectina.
- A fração (0-80 %) contendo maior AHE foi o material de escolha para purificação da proteína.
- Cromatografia em coluna de gel de guar foi eficiente na purificação de BmeLL.
- Cromatografia de filtração a gel de BmeLL apresentou um pico protéico de 29.000 Da.
- BmeLL não teve sua atividade hemaglutinante aumentada em presença de íons Ca^{++} e Mg^{++} (0,02 M).
- Aquecimento da proteína demonstrou que BmeLL é uma lectina termoestável mantendo atividade mesmo após aquecimento a 100 °C.
- A lectina apresentou maior atividade com tampão citrato fosfato 0,01 M, pH 6,0, contendo NaCl 0,15 M, como também apresentou atividade hemaglutinante em pH fisiológico.
- A lectina apresentou elevada AHE com eritrócitos de coelho e humanos (A, B, AB e O).
- BmeLL apresentou inibição total da AH em presença de asialofetuína, azocaseína, caseína, fetuína e tiroglobulina (125, 250 e 500 µg).
- BmeLL imobilizada em Sepharose CL-4B foi capaz de ligar glicoproteínas puras comerciais como avidina e tiroglobulina, como também foi capaz de reconhecer glicoproteínas presentes em preparações obtidas da clara do ovo e da tireóide de porco.
- Eletroforese em gel de poliacrilamida revelou que BmeLL imobilizada em Sepharose CL-4B foi capaz de purificar tiroglobulina, uma glicoproteína de interesse médico utilizada no tratamento de pacientes com hipotireoidismo, a partir de homogeneizado bruto da tireóide de porco.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, C. Z. G. P. *Isolamento, caracterização parcial e imobilização da lectina de pericarpo de Punica granatum L. em dacron magnetizado*. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2002.

BAKALOVA, R.; OHBA, H. Purification of normal lymphocytes from leukemic T-cells by lectin-affinity adsorbents – correlation with lectin-cell binding. *Cancer Letters*, v.192, p. 59-65, 2003.

BEZERRA, S. F.; VIEIRA, V. L. A.; CARVALHO JR, L. B. Proteases no trato digestivo de peixes. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, v. 22, p. 46-29, 2001.

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

BOYD, W. C., SHAPLEIGH, E. Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). *Science*, Washington, v.119, p. 419, 1954.

BRAZIL, V., ENTLICHER, G. Complexity of lectins from the hard roe of perch (*Perca fluviatilis* L.). *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 31, p. 431-442, 1999.

CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G., ROCHA, J. M. S., CABRAL, J. M. S., GIL, M. H., GARCIA, F. A. P. Covalent immobilization of lipase on different supports. *Latin American Applied Research*, v. 32, p. 69 – 72, 2002.

CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G., ROCHA, J. M. S., GARCIA, F. A. P., GIL, M. H. Lipase immobilization on to polymeric membranes. *Biotechnology Techniques*, 13, 403 – 409, 1999.

CAVADA, B. S.; SANTOS, C. F.; GRANGEIRO, T. B.; NUNES, E. P.; SALES, P. V. P.; RAMOS, R. L.; DE SOUSA, A. M.; CRISOSTOMO, C. V.; CALVETE, J. J. Purification and characterization of a lectin from seeds of *Vaitarea macrocarpa* Duke. *Phytochemistry*, v. 49, p. 675-680, 1998.

CHAGAS, G. S. Twenty-five of immobilized metal ion affinity chromatography: past, present and future. *Journal of Biochemistry and Biophysic Methods*, v. 49, p. 313 – 334., 2001.

CHUNG, J. J.; RATNAPALA, L. A.; COOKE, I. M.; YANAGIHARA, A. A. Partial purification and characterization of a hemolysin (CAH1) from Hawaiian box jellyfish (*Carybdea alata*) venom. *Toxicon*, v. 39, p. 981-990, 2001.

COELHO, L. C. B. B., SILVA, M. B. R. Simple method to purify milligram quantities of the galactose-specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*. *Phytochemical Analysis*, v. 11, p. 295-300, 2000.

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

DJEMLI, A., FILLION, M., BELGOUDI, J., LAMBERT, R., DELVIN, E. E., SCHNEIDER, W., VLIET, G. V. Twenty years later: a reevaluation of the contribution of plasma thyroglobulin to the diagnosis of thyroid dysgenesis in infants with congenital hypothyroidism. *Clinical Biochemistry*, v. 37, p. 818– 822, 2004.

GABOR, F.; KLAUSEGGER, U.; WIRTH, M. The interaction between wheat germ agglutinin and other plant lectins with prostate cancer cells Du-145. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 221, p. 35-47, 2001.

FRAGUAS, L. F.; BATISTA-VIERA, F.; CARLSSON, J. Preparation of high-density Concanavalina A adsorbent and its use for rapid, high-yield purification of peroxidase from roots. *Journal of Chromatography B*, 803, 237-241, 2004.

GOLDSTEIN, I. J.; HUGHES, R. C.; MONSIGNY, M.; OSAWA, T.; SHARON, N. What should be called a lectin? *Nature*, v. 255, p. 66, 1980.

GHOSH, S.; MAJUMDER, M.; MAJUMDER, S.; GANGULY, N. K.; CHATTERJEE, B. P. Saracin: a lectin from *Saraca indica* seed integument induces apoptosis in human T-lymphocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 371, p. 163-168, 1999.

GIRAUD, A.; DICRISTOFARO, J.; DE MICCO, C.; LEJEUNE, P. J.; BARBARIA, J.; MALLET, B. A plasminogen-like protein, present in the apical extracellular environment of thyroid epithelial cells, degrades thyroglobulin in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 338, p. 1000-1004, 2005.

GOTTSCHALK, I.; GUSTAVSSON, P. E.; ERSSON, B.; LUNDAHL, P. Improved lectin-mediated immobilization of human red blood cells in superporous agarose beads. *Journal of Chromatography B*, v. 784, p. 203-208, 2003.

GUO, WEI; RUCKENSTEIN, E. Separation and purification of horseradish peroxidase by membrane affinity chromatography. *Journal of Membrane Science*, v. 211, p. 101-11, 2003.

HASHIM, O. H.; GENDEH, G. S.; CHEONG, C. N.; JAFFAR, M. I. N. Effect of *Artocarpus integrifolia* lectin functional activity of guinea-pig complement. *Immunological Investigation*, v. 23, p. 153-60, 1994.

HELMHOLZ, H.; CARTELLIERI, S.; HE, L.; THIESEN, P.; NIEMEYER, B. Process development in affinity separation of glycoconjugates with lectins as ligands. *Journal of Chromatography A*, v. 1006, p. 127-135, 2003.

HIRSCH, A. M. Role of lectins (and rhizobial exopolysaccharides) in legume nodulation. *Current Opinion in Plant Biology*, v.2, p. 320-326, 1999.

ITO, Y. Occurrence of lectins in leaves and flowers of *Sophora japonica*. *Plant Science*, v. 47, p. 77-82, 1986.

KABIR, S. Jacalin: a jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seed-derived lectin of versatile applications in immunobiological research. *Journal of Immunological Methods*, v. 212, p. 193-211, 1998.

KARASAKI, Y.; TSUKAMOTO, S.; MIZUSAKI, K.; SUGIURA, T.; GOTOH, S. A garlic lectin exerted an antitumor activity and induced apoptosis in human tumor cells. *Food Research International*, v. 34, p. 7-13, 2001.

KAWAGISHI, H.; TAKAGI, J.; TAIRA, T.; MURATA, T.; USUI, T. Purification and characterization of a lectin from the mushroom *Mycoleptodonoides aitchisonii*. *Phytochemistry*, v. 56, p. 53-58, 2001.

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

KENNEDY, J. F. WHITE, C. A. Principles of immobilization of enzymes. In: Wiseman, A. *Handbook of Enzyme Biotechnology*, 2ª Edição., New York: Alan Wiserman, p. 147-201, 1985.

KENNEDY, J. F., PAIVA, P. M. G., CORREIA, M. T. S., CAVALCANTI, M. S. M., COELHO, L. C. B. B. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. *Carbohydrate Polymers*, v. 26, p. 219-30, 1995.

KHANG, N. Q., JEAN-LEUE, G., JOHAN, H. A blood group A specific lectin from the seeds of *Crotalaria striata*. *Biochemistry and Biophysical Acta*, v. 1033, n. 2, p. 210-3, 1990.

KONOZY, E. H. E., MULAY, R., FACA, M., WARD, R. J., GREENE, L. J., ROQUE-BARRIERA M. C., SABHARWAL, S., BHIDE, S. V. Purification, some properties of a D-galactose-binding leaf lectin from *Erythrina indica* and further characterization of seed lectin. *Biochimie*, v. 84, p. 1035-1043, 2002.

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

LEHNINGER, A. L. *Princípios de Bioquímica*, 3ª Edição, Sarvier, 2002. p. 237-241.

LEITE V., SILVA V. L., AZEVEDO W. M., MELO E. H. M. e LIMA FILHO J. L. Increasing glucose determination range by flow injection analysis (FIA) using glucose oxidase immobilised on polyaniline. *Biotechnology Techniques*, v. 87(2), p. 133-136, 1994.

LEMUS, I., GARCIA, R., DELVILLAR, E., KNOP, G. Hypoglycaemic activity of four used in Chilean popular medicine. *Phytotherapy Research*, v. 12, n. 2, p. 91-94, 1999.

LEWIS, G. P. Legumes of Bahia. *Kew Botanic Gardens*, 369, 1987.

LIMA, V. L. M., CORREIA, M. T. S., CECHINEL, Y. M. N., SAMPAIO, C. A. M., OWEN, J. S.; COELHO, L. C. B. Immobilized *Cratylia mollis* lectin as a potential matrix to isolate plasma glycoproteins, including lecithin-cholesterol acyltransferase. *Carbohydrate Polymers*, v. 33, p. 27-32, 1997.

LIS, H.; SHARON, N. Lectins in higher plants. In: MARCUS, A. *The Biochemistry of Plants, a Comprehensive Treatise*, v. 6, p. 371-447, 1981.

MACEDO, M. L. R.; FREIRE, M. G. M.; DA SILVA, M. B. R.; COELHO, L. C. B. B. Insecticidal action of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotes subfasciatus* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Comparative Biochemistry and Physiology*, In Press, 2006.

MACHUKA, J. S.; OKEOLA, O. G.; ELS, J. M. V. D.; CHRISPEELS, M. J.; LEUVEN, F. V.; PEUMANS, W. J. Isolation and partial characterization of galactose-specific lectins from African yam beans, *Sphenostyles stenocarpa* Harms. *Phytochemistry*, v. 51, p. 721-728, 1999.

MASÁROVÁ, J., DEY, E. S., JENNY CARLSSON, J., DANIELSSON, B. Novel peptide surface for reversible immobilization of concanavalin A. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, v. 60, p. 163–170, 2004.

MIRANDA, M. V.; MAGRI, M L.; NAVARRO DEL CAÑIZO, A. A.; CASCONI, O. Study of variables involved in horseradish and soybean peroxidase purification by affinity chromatography on concanavalin A-agarose. *Process Biochemistry*, v. 38, p. 537-543, 2002.

MIRANDA-SANTOS, I. K. F. Activation of T and B cells by a crude extract of *Artocarpus integrifolia* is mediated by a lectin distinct from jacalin. *Journal Immunologic Methods*, v. 140, p. 197-203, 1991 b.

MO, H., VAN DAMME, E. J. M., PEUMANS, W.J. & GOLDSTEIN, J. J. Isolation and Characterization of an N-acetyl-D-galactosamine-binding lectin from Dutch iris bulbs Which recognizes the blood group A disaccharide (GalNAc α 1-3Gal). *Journal of Biological Chemistry*, v. 269, p. 7666-73, 1994.

MOREIRA, R. A., CASTELO-BRANCO, C. C., MONTEIRO, A. C. O., TAVARES, R. O. & BELTRAMINI, L. M. Isolation and partial characterization of a lectin from *Artocarpus incisa* L. Seeds. *Phytochemistry*, v. 47, p. 1183-88, 1998.

MOURE, A.; SINEIRO, J.; DOMÍNGUEZ, H. Extraction and functionality of membrane-concentrated protein from defatted *Rosa rubiginosa* seeds. *Food Chemistry*, v. 74, p. 327-339, 2001.

NADRUZ JR., W.; MARQUES, E. T. A.; AZWVEDO, W. M.; LIMA FILHO, J. L. e CARVALHO JR., L. B. Immobilization of xantine oxidase on a polyaniline silicone support. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 29, p. 347-350, 1996.

NG, T. B., YU, Y. L. Isolation of novel heterodimeric agglutinin from rhizomes of *Smilax glabra*, the Chinese medicinal material tufuling. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 33, p. 269-277, 2001.

NG, T. B., AU, T. K., LAM, T. L., YE, X. Y.; WAN, D. C. C. Inhibitory effects of antifungal proteins on human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase, protease and integrase. *Life Sciences*, v. 70, p. 927-935, 2002.

NOMURA, K., ASHIDA, H., UEMURA, N., KUSHIBE, S., OZAKI, T., YOSHIDA, M. Purification and characterization of a mannose/glucose-specific lectin from *Castanea crenata*. *Phytochemistry*, v. 49, n. 3, p. 667-673, 1998.

OSHIKAWA, K.; AOKI, K.; TERATA, S. Purification and characterization of a basic amino acid-specific peptidase from seeds of Jack bean (*Canavalia ensiformis*). *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, v. 64, p. 2186-2192, 2000.

OZEKI, Y., MATSUI, T., NITTA, K., KAWAUCHI, H., TAKAYANAG, TITANI, K. Purification and characterization of β -galactoside binding lectin from frog (*Rana*

catesbiana) eggs. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, New York, v. 178, p. 407-13, 1991.

PACINI, F. & PINCHERA, A. Serum and tissue thyroglobulin measurement: Clinical applications in thyroid disease. *Biochimie*, v. 81, p. 463-467, 1999.

PAIVA, P. M. G. & COELHO, L. C. B. B. Purification and Partial Characterization of two lectins isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu Bean). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 36, p. 113-118, 1992.

PAIVA, P. M.; SOUZA, A. F.; OLIVA, M. L.; KENNEDY, J. F.; CAVALCANTI, M. S. M.; COELHO, L. C.; SAMPAIO, C. A. Isolation of trypsin inhibitor from *Echinodorus paniculatus* seeds by affinity chromatography on immobilized *Cratylia mollis* isolectins. *Bioresource Technology*, v.88, n. 1, p.75-79, 2003.

PEPATO, M. T., KELLER, E. H., BAVIERA, A. M., KETTELHUT, I. C., VENDRAMINI, R. C., BRUNETTI, I. L. Anti-diabetic activity of *Bauhinia forficata* decoction in streptozotocin-diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 81, p. 191-97, 2002.

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

PEUMANS, W. J. & VAN DAMME, E. J. M. Plant lectins: specific tools for the identification, isolation, and characterization of O-linked glycans. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, v. 33, n. 3, p. 209-258, 1998 a.

PEUMANS, W. J. & VAN DAMME, E. J. M. Plant lectins: Versatile Proteins with important perspectives in biotechnology. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, v. 15, p. 199-228, 1998.

PEUMANS, W. J., VAN DAMME, E. J. M., BARRE, A. & ROUGÉ, P. Classification of plant lectins in families of structural and evolutionary related proteins. In: *The molecular Immunology of Complex Carbohydrates-2*, (Wu A. M. ed.), p. 27-54. Kluwer Academic, 2001.

PIAZZA, R. M. F., SCHOTTELIUS, J., GABIUS, H. J., STOLF, A. M. S. *Trypanossoma cruzi*, role of lectin receptors in parasite host cell interactions. *European Journal of Cell Biology*, v. 69, p. 451, 1996.

POWELL, L. W. Immobilized biocatalyst technology. In: Fogart W. M., Kelly C.T. (eds). *Microbial Enzyme and Biotechnology*. London: Elsevier Science Publishers, 2 ed, p. 369-394, 1990.

RAHMAN, M. A., KARSANI, S. A., OTHMAN, I., RAHMAN, P. S. A., HASHIM, O. H. Galactose-binding lectin from the seeds of champedak (*Artocarpus integer*): sequences of its subunits and interactions with human serum O-glycosylated glycoproteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 295, p.1007–1013, 2002.

RATANAPO, S., NGAMJUNYAPORN, W., CHULAVATNATOL, M. Sialic acid binding lectins from leaf of mulberry (*Morus alba*). *Plant Science*, v.139, p. 141-148, 1998.

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

REGO, E. J. L.; CARVALHO, D. D.; MAGANRONI, S.; OLIVEIRA, B.; NOVELLO, J. C. Lectins from seeds of *Crotalaria pallida* (Smooth rattlebox). *Phytochemistry*, v. 60, p. 441-447, 2002.

REMANI, P., PILLAI, K. R., HASEENABEEVI, V. M., ANKATHIL, R. Lectin cytochemistry in the exfoliative cytology of uterine cervix. *Neoplasma*, Índia, v. 41, n.1, p. 39-42, 1994.

ROMAN-RAMOS, R., ALARCÓN-AGUILAR, F., LARA-LEMUS, A., FLORES-SAENZ, J. L. Hypoglycaemic effect of plants used in Mexico as anti-diabetics. *Archives of Medical Research*, v. 23, n. 1, p. 59-64, 1992.

ROTHEMUND, D. L., THOMAS, T. M., RYLATT, D. B. Purification of the basic protein avidin using Gradiflow technology. *Protein Expression and Purification*, v. 26, p. 149–152, 2002.

SAITO, K.; KOMAE, A.; KAKUTA, M.; VAN DAMME, E. J. M.; PEUMANS, W. J.; GOLDSTEIN, I. J. E.; MISAKI, A. The α -mannosyl-binding lectin from leaves of the orchid twayblade (*Listera ovata*). Application to separation of α -D-mannans from α -D-glucans. *European Journal of Biochemistry*, v. 217, p. 677-681, 1993.

SAMPIETRO, A. R., ISLA, M. A., QUIROGA, E. N., VATTUONE, M. A. An N-acetylglucosamine oligomer binding agglutinin (lectin) from ripe *Cyphomandra betacea* Sendt. Fruits. *Plant Science*, v. 160, p. 659-657, 2001.

SARKAR, M., MAJUMDER, G. C. E CHATTERJEE, T. Goat sperm membrane lectin binding sites of sperm surface and lectin affinity-chromatography of the mature sperm membrane antigens. *Biochemistry and Biophysical Acta*, v. 1070, n. 1, p. 196-204, 1991.

SCHUMACHER, U., ADAM, E., BROOKS, S. A., E LEATHEM, A. J. Lectin binding properties of human breast cancer cell lines and human milk with particular reference to *Helix pomatia* agglutinin. *Journal of Histochemistry and Histochemistry*, v. 43, n. 3, p. 275-81, 1995.

SENGUPTA, S.; SINGH, S.; SENGUPTA, L. K.; BISEN, P. S. Phytolectins: Natural molecules with immense biotechnological potential. *Indian Journal of Experimental Biology*, v. 35, 103-110, 1997.

SHARON, N. A centenary of lectins: impact on immunology. In: *Cellular Basis of Immune Modulation*, p. 609-619, 1989.

SHARON, N., LIS, H. A century of lectin research (1888-1988). *Trends in Biochemical Sciences*, v. 12, p. 488-491, 1987.

SHARON, N., LIS, H. Legumes lectins – a large family of homologous proteins. *Federation American Societies Experimental Journal*, v. 4, p. 3198-3208, 1990.

SHARON, N., LIS, H. The structural basis for carbohydrate recognition by lectins. In: *The molecular immunology of complex carbohydrates-2*. (Wu A. M. Ed.), p. 1-15. Kluwer Academic, 2001.

SILVA, F. R. M. B., SZPOGANICZ, B., PIZZOLATTI, M. G., WILLRICH, M. A. V., SOUSA, E. Acute effect of *Bauhinia forficata* on serum glucose levels in normal and alloxan-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 83, p. 33-7, 2002 b.

STRYER, L. *Bioquímica*. 5ª Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Kooga, 2004.

SULTAN, N. A. M.; SWAMY, M. J. Fluorescence quenching and time-resolved fluorescence studies on *Trichosanthes dioica* seed lectin. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 80, p. 93–100, 2005.

THEOPOLD, U.; DORIAN, C.; SCHMIDT, O. Changes in glycosylation during *Drosophila* development. The influence of ecdysone on hemomucin isoform. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 31, p. 189-197, 2001.

ZHONG, S. R., JIN, Y., WU, J. B., CHEN, R. Q., JIA, Y. H., WANG, W. Y., XIONG, Y. L., ZHANG, Y. Characterization and molecular cloning of dabocetin, a potent antiplatelet C-type lectin-like protein from *Daboia russellii siamensis* venom. *Toxicon*, v. 47, p.104–112, 2006.

WITITSUWANNAKUL, R., WITITSUWANNAKUL, D., SAKULBORIRUG, C. A lectin from the bark of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Phytochemistry*, v. 47, p. 183-187, 1998.

WROBLEWSKI, S., BERENSON, M., KOPECKOVA, P., KOPECEK, J. Potential of lectin-N- (2-hydroxypropyl) methacrylamide copolymerdrug conjugates for the treatment of pre-cancerous conditions. *Journal of Controlled Release*, v. 74, p. 283-293, 2001.

WU, A. M., WU, J. H., TSAI, M. S. & HERP, A. Carbohydrate specificity of an agglutinin isolated from the root of *Trichosantes kirilowii*. *Life Sciences*, v. 66, n. 26, p. 2571-2581, 2000.

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. 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*, v. 1724, p. 137-145, 2005.

YE, X. Y.; NG, T. B. Isolation of a new cyclophilin-like protein from chickpeas with mitogenic, antifungal and anti-HIV-1 reverse transcriptase activities. *Life Sciences*, v. 70, p. 1129-1138, 2002.

ANEXO

Preparation and Submission of Manuscripts

(Revised January 2006)

Transfer of Copyright Agreement

A properly completed Transfer of Copyright Agreement must be provided for each submitted manuscript. The form is available from the Web site and is printed in the first issue of each year. The completed, signed, and dated form should be faxed to the Editor's office.

Cover Letter

A cover letter must accompany each submitted manuscript and may be created electronically on the Web submission site. The letter should provide the corresponding author's name, postal and e-mail addresses, and telephone and fax numbers. Unless different instructions are furnished in the cover letter, all Editorial correspondence concerning receipt, status, review, revision, and publication of manuscripts will be sent **only** to one person who has been assigned as the "corresponding author" during the evaluation period. The corresponding author is responsible for communicating the manuscript status to all coauthors of the paper. The letter should address the significance of the manuscript, provide a list of at least six (6) keywords, and list any graphics for which color is requested. Authors are also urged to provide the names and email addresses of recommended reviewers. The letter should also indicate the author's preference for Web or hardcopy page proofs, and this selection should also be made via the submission form.

Manuscript Submission

Complete instructions and an overview of the electronic (Web) submission process are available through the secure ACS Web site at <http://pubs.acs.org/BP>; select "submit manuscript". Authors electing to submit via the Web will also submit the final revised versions of manuscripts via the Web.

When preparing manuscripts, it is essential that only the fonts specified in the ACS manuscript templates be used. If an author chooses not to use an ACS template to prepare a submission, Times and Symbol fonts should be used. Use of other fonts may cause problems during peer review and journal production.

When creating the PDF files for submission, it is essential that all fonts be embedded within the PDF file. For best results, please download the ACS Job Options file for Adobe Distiller. This file will set the Distiller Options to be the same as those used on the ACS PDF conversion servers. Instructions on use of the ACS Job Options file can be found on the Web site (<http://pubs.acs.org/BP>; select "submit manuscript", then "Read Author Information").

Preparation of Manuscripts

Artwork and tables should be inserted within the text of the document showing actual placement. This insertion of graphics will provide for ease in review. All pages of the manuscript must be numbered consecutively, and all files must be saved and printed in U.S. Letter size format. Authors should consult recent issues of the journal and *The ACS Style Guide*, 2nd ed.; American Chemical Society: Washington, DC, 1997 for further format guidance. (*The ACS Style Guide* is available from Oxford University Press, <http://www.oup-usa.org>, ISBN 0-8412-3462-0).

Any author who is not fully fluent in idiomatic English is urged to obtain assistance with manuscript preparation from a fluent colleague. Manuscripts with grammar or vocabulary deficiencies are handicapped during the scientific review process

and may be returned to the author before peer review and/or before acceptance for rewriting in idiomatic English.

Title. The title should accurately, clearly, and concisely reflect the emphasis and content of the paper. The title must be brief and grammatically correct.

Author List. Include in the byline all those who have made substantial contributions to the work. Use first names, initials, and surnames (e.g., John R. Smith). Do not use only initials with surnames (e.g., J. R. Smith) because this causes indexing and retrieval difficulties and interferes with unique identification of an author. Do not include professional or official titles or academic degrees. At least one author must be designated with an asterisk as the author to whom correspondence (regarding the published manuscript) should be addressed, and appropriate phone, fax, and email information should be provided.

Address. The affiliation(s) listed should be the institution(s) where the work was conducted. If the present address of an author differs from that at which the work was done, the current address should be given in a footnote.

Abstract. All manuscripts must contain a **short** abstract, which should **briefly** state the reason for the work, the significant results, and the conclusions.

Text. The first paragraphs should explain what the motivation and import of the work is, where it fits in the development of the field, and perhaps why it should be of interest to researchers in other areas. It should be possible to do this without excessively increasing the length of the paper. Thoughtful use of schemes and diagrams (with well-composed captions) is recommended, so that even casual browsers can discern the nature of the work. Well-known procedures should be designated by name or literature references to them should be given. Experimental results are of lasting value and should be clearly and logically presented in separate sections. The addition of a Conclusion section at the end of the paper, which briefly summarizes the principal conclusions of the work, is recommended. If desired for clarification, section headings may be given Arabic numbers and subsections numbered in decimals (example, subsection 2.1 and subsection 2.2).

Acknowledgment. Dedications and notes acknowledging financial assistance to the conduct of research, citing theses, or indicating presentation at a meeting should be brief and placed in the Acknowledgment section.

Supporting Information Statement. A brief statement in nonsentence format, listing the contents of material placed in Supporting Information, should be included at the end of the manuscript (after the Acknowledgment and before the References). For instructions on what material should be provided as Supporting Information and on preparing it for publication, see the Supporting Information section below.

Figures. All figures must be mentioned in the text in consecutive order and be numbered with Arabic numerals. A caption giving the figure number and a brief description, preferably only one or two sentences, must be included with each figure. The caption should be understandable without reference to the text. It is preferable to place the keys to symbols used in the artwork itself, not in the caption. Ensure that any symbols and abbreviations used in the text agree with those in the artwork.

Schemes. Sequences of reactions are called schemes. Schemes may have brief titles describing their contents. Schemes should be numbered with Arabic numerals.

Charts. Groups of structures that do not show reactions are called charts and should be numbered consecutively with Arabic numerals. Charts may have brief titles describing their contents.

Tables. Tables should be numbered consecutively with Arabic numerals. Each table must have a brief (one phrase or sentence) title that describes its contents. The title should be understandable without reference to the text. Details should be put in footnotes, not in the title. Tables should be used when the data cannot be presented clearly as narrative, when many precise numbers must be presented, or when more meaningful interrelationships can be conveyed by the tabular format. Tables should supplement, not duplicate, information presented in the text and figures. Tables should be simple and concise. Footnotes in tables should be given letter designations and be cited in the table by italic superscript letters. The sequence of letters should proceed by line rather than by column.

In setting up tables, authors should keep in mind the type area of the *Biotechnology Progress* page (17.8 × 25.0 cm) and the column width (8.5 cm) and should make tables conform to the limitations of these dimensions.

References and Notes. References and explanatory notes should be listed on a separate sheet in numerical order according to the order in which they appear. Authors are responsible for checking the accuracy and completeness (including all authors) of all references. Because subscribers to the Web edition of the journal are now able to click on the "CAS" tag following each reference to retrieve the corresponding CAS abstract, reference accuracy is critical. References should be cited in the text as italic numbers enclosed in parentheses, e.g. (1). Use *Chemical Abstracts Service Source Index* journal abbreviations and refer to *The ACS Style Guide* (1997) for style. Include the titles of journal articles as well as those for books. Typical citations are illustrated below:

- (1) Wang, X.; Da Silva, N. A. Estimation of the Rate of Cloned Gene Integration via Retrotransposition. *Biotechnol. Prog.* 1997, 13, 123–131.
- (2) Dordick, J. S. Principles and Applications of Nonaqueous Enzymology. In *Applied Biocatalysis*; Blanch, H. W., Clark, D. S., Eds.; Marcel Dekker: New York, 1991; Vol. 1, pp 1–52.

Artwork

All graphics (illustrations) should be inserted at their appropriate locations in the word-processor file within the manuscript text. Follow the Web instructions for manuscript preparation: <http://pubs.acs.org/BP>; select "submit manuscripts".

The quality of the graphics in the journal depends on the quality of the originals provided by the author. Figures cannot be modified or enhanced by the journal production staff. Whenever possible, the graphics files furnished by authors with Web submission are used in production of the journal.

Illustrations must fit a one- or two-column format on the journal page. **For efficient use of journal space, single column illustrations are preferred.**

	Single (preferred)	Double
Width		
minimum		10.5 cm (4.13 in.)
maximum	8.25 cm (3.25 in.)	17.78 cm (7 in.)
Maximum depth	24 cm (9.5 in.)	24 cm (9.5 in.)

For best results, submit illustrations in the actual size at which they should appear in *Biotechnology Progress*. Original illustrations which do not need to be reduced to fit a single or double column will yield the best quality. Lettering should be no smaller than 4.5 points. (Helvetica or Arial type works well for lettering.) Lines should be no thinner than 0.5 point. Lettering and lines should be of uniform density and the lines unbroken.

If the submitted artwork must be reduced, larger lettering and thicker lines should be used so that, when reduced, the artwork meets the above-mentioned criteria.

Avoid using complex textures and shading to achieve a three-dimensional effect. To show a pattern, choose parallel lines or a simple crosshatch design.

Photographs. High-contrast prints with a smooth or glossy finish work best. Send photographs that are single or double column width so that they will not have to be reduced. Do not submit negatives, slides, or overhead transparencies. Avoid photographs produced on a laser printer and prints cut from a printed publication; these do not give good results. Do not write on the front or back of the image area of the photograph. These marks may show through when the photograph is scanned.

Color. Color reproduction, if approved by the Editor, will be provided at no cost to the author. Color illustrations should be submitted only if essential for clarity of communication, and all other artwork should be submitted as black and white originals or files. Graphics intended to appear in black and white or grayscale should not be submitted in color.

Resolution. Graphics submitted digitally should have the following minimum resolution requirements.

Black and white line art	1200 dpi
Grayscale art	600 dpi
Color art	300 dpi

Supporting Information

General Considerations. Material that is not needed for reading the paper but which should be available to document the experiments or calculations for future researchers should be put into the Supporting Information. This material may include tables, illustrations, derivations, experimental procedures, analytical and spectral characterization data, modeling coordinates and programs, and crystallographic information files. This section may also include additional material or discussion that is primarily of interest to specialized readers. Authors are encouraged to make use of Supporting Information in the interest of shorter Articles, not only to save space but also to create more focused presentations.

Supporting Information should be submitted at the same time as the original manuscript. Refer to the Supporting Information in the text where appropriate and include a paragraph at the end of the paper indicating the nature of the Supporting Information, using the following format: "Supporting Information Available: [description of material] This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>."

Material deposited as Supporting Information is considered to be part of the publication and should not be submitted for republication as part of a future paper.

These instructions and a Transfer of Copyright Agreement are printed in the first issue of each volume. When submitting manuscripts, please conform to these detailed instructions, which are also available via the Web at <http://pubs.acs.org/BP> (select "info for authors").