



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM BIOQUÍMICA

SÉRGIO ALVES BEZERRA

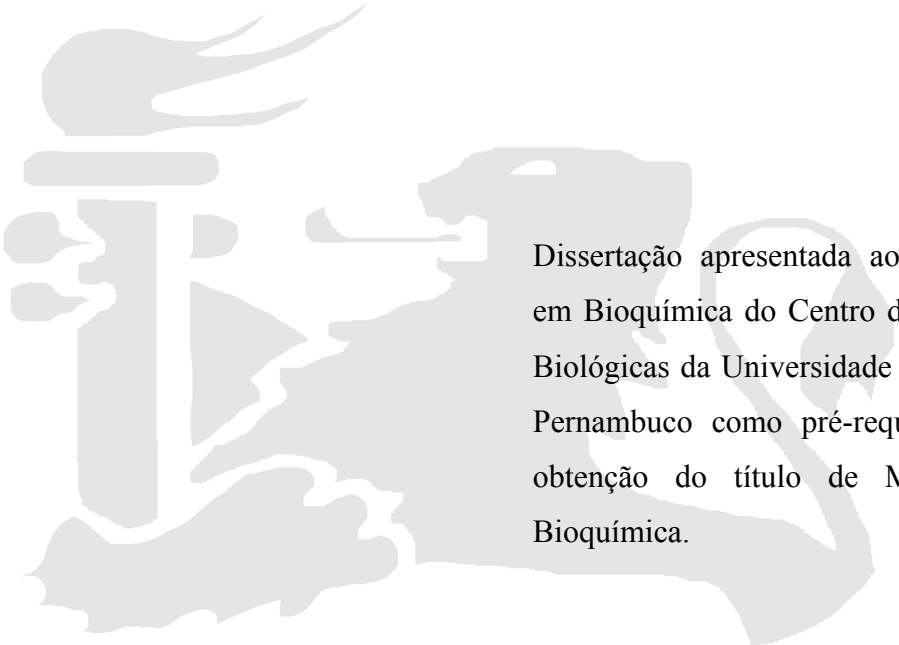
**IMOBILIZAÇÃO COVALENTE DE CONCAVALINA A EM GOMA
DE SEMENTES DE *Parkia pendula* MAGNETIZADA E SUA
APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA**

RECIFE

2006

SÉRGIO ALVES BEZERRA

**IMOBILIZAÇÃO COVALENTE DE CONCAVALINA A EM
GOMA DE SEMENTES DE *Parkia pendula* MAGNETIZADA E SUA
APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA**



Dissertação apresentada ao Mestrado
em Bioquímica do Centro de Ciências
Biológicas da Universidade Federal de
Pernambuco como pré-requisito para
obtenção do título de Mestre em
Bioquímica.

Orientador:

Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão

Co-orientador:

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior

RECIFE

2006

**IMOBILIZAÇÃO COVALENTE DE CONCAVALINA A EM
GOMA DE SEMENTES DE *Parkia pendula* MAGNETIZADA E SUA
APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA**

SÉRGIO ALVES BEZERRA

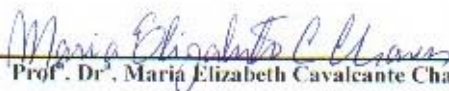
Banca Examinadora:



Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão (Orientador)



Prof.^a. Dr.^a. Maria da Paz Carvalho da Silva



Prof.^a. Dr.^a. Maria Elizabeth Cavalcante Chaves



Prof.^a. Dr.^a. Maria da Graça Carneiro da Cunha

A DEUS, que me ama apesar do meu orgulho, egoísmo e vaidade. A DEUS que está sempre ao meu lado mesmo quando não o enxergo ou não o aceito.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A DEUS por ser o Ser mais presente em toda a minha vida. Separei até hoje pouco tempo da minha vida para dar atenção a Ele, mas, tive em toda a existência sua atenção. Perdão pelos atos descuidados e pelas brigas. É bom ser sincero com Você e saber que Você o é comigo também. Muito obrigado pelo seu amor e perdoe-me se não te amo na mesma intensidade. Obrigado por carregar-me todo esse tempo e por ser meu amigo.

Ao meu pai, Aristóteles Bezerra Silva, e minha mãe, Maria José Alves, pela atenção e carinho empregados todos estes anos. Obrigado por tentar fazer o melhor por mim e por me ajudar da maneira que for a ser feliz. Aos meus familiares, pelo apoio, muito obrigado.

Aos amigos da espiritualidade, Miguel, Luis, Tavis, Rita, Sueli, Ceça, as crianças, Deyse, André, Biga, Mila, entre outros que sempre auxiliam aqueles que necessitam e estão sempre dispostos a consolar em nome de DEUS.

Aos meus amigos de laboratório, Ricardo, Débora, Mariane, Agenor, Mozart, Marcília, Hercília, Cíntia, Ciço, Clarissa, Taciana, Marcela, Milena, Catarina, Márcio, Érika, Diego, Susan, Tiago, Fábio, Ana Helena (oh my god), Talita (talitão), Diego, David, Cyntia, Romero, Fernando (argentino), Chirley, Rafael.

A Givanildo pela grande figura que é. Não só por ser um paizão para todos dando broncas, mas, também, ajudando e orientando sempre. Sendo simples no seu modo de pensar esse menino tem um potencial que nem imagina. Que Deus, Heloísa e toda a sua família possam te confortar em todos os momentos e te ajudar na caminhada. Não esqueça, a vida é feita de alegrias e sofrimentos, mas o que é importante é saber que viver é maravilhoso e que devemos continuar caminhando em frente. Você tem mais um amigo. Não só para agora, mas, para a eternidade. Obrigado e seja muito feliz.

A Ian, o Dexter do laboratório, por ser uma pessoa altamente compreensível e que procura ajudar a todos sempre. Mesmo nos momentos mais inusitados. Conserva o teu saber e usa-o para ajudar aos outros. E obrigado pelos momentos de risos e brincadeiras.

A Verinha (do LIKA) por ser uma pessoa maravilhosa e amiga.

A Miron, Djalma (Bioquímica) por toda ajuda em todos os momentos e pelo companheirismo.

A todo o corpo de professores do Departamento de Bioquímica e funcionários por sempre me tratarem bem.

Aos meus amigos de turma pelo apoio e carinho.

Ao Prof. Eduardo Beltrão por ser uma pessoa de bom coração e sempre disposta a estender a mão para qualquer um que venha ao seu encontro. Por escutar as nossas necessidades e por entendê-las, procurando o melhor para os que estão ao seu redor. Muito obrigado.

Ao Prof. Luis Bezerra por ter me aceitado no Setor de Bioquímica sem me conhecer, mas, acreditando sempre na minha pessoa. Por seu entendimento em situações difíceis e pela ajuda conferida. Muito obrigado.

A Diretoria do LIKA e a todos os seus membros pelo acolhimento e tratamento conferido a minha pessoa.

Ao CNPq pelo suporte empregado durante toda realização do projeto.

LISTA DE FIGURAS

	Págs.
Figura 1: Monômero da Concanavalina A	4
Figura 2: Dextrana magnetizada	6
Figura 3: <i>Parkia pendula</i>	9
Figura 4: Infrared spectrum of the <i>P. pendula</i> seed gum.	22
Figura 5: Infrared spectra of <i>P. pendula</i> gum (a), magnetite (b) and magnetized gum using 0,100 mg/ml (c) and 0,500 mg/ml (d)	23
Figura 6: SDS-PAGE of eluted fetuin from the immobilized Con A on _{mag} PpeG	25

LISTA DE TABELAS

	Págs.
Tabela 01: Element composition of free and magnetized <i>P. pendula</i> seed gum	21
Tabela 02: Infrared absorbance of the <i>P. pendula</i> seed gum derivatives	23
Tabela 03: Immobilization efficiency of Con A on magPpeG	24
Tabela 04: Efficiency of fetuin recognition by the immobilized Con A on _{mag} PpeG	25

SUMÁRIO

	Págs.
LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE TABELAS	VIII
RESUMO	X
ABSTRACT	XI
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 IMOBILIZAÇÃO	1
1.2 IMOBILIZAÇÃO DE LECTINAS	3
1.3 PARTÍCULAS MAGNÉTICAS	5
1.4 POLISSACARÍDEOS	7
2 JUSTIFICATIVA	10
3 OBJETIVOS	11
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	12
5 ARTIGO CIENTÍFICO	17
ABSTRACT	18
INTRODUCTION	19
MATERIALS AND METHODS	19
RESULTS AND DISCUSSION	21
CONCLUSION	26
ACKNOWLEDGEMENT	26
REFERENCES	27
6 CONCLUSÃO	30
ANEXO	31

RESUMO

A imobilização de proteínas em suportes insolúveis em água constitui-se em importante ferramenta biotecnológica. Por outro lado, a magnetização suporte sintetizado aumenta seu potencial de uso pela facilidade de sua remoção do meio de reação, mediante o uso de um campo magnético, permitindo a remoção de contaminantes e sua reutilização. Dentre as classes de proteínas imobilizáveis destacam-se as lectinas, como a Concanavalina A (Con A), com afinidade a resíduos de glucose, manose e derivados. Gomas provenientes de vegetais constituem uma ótima fonte de polissacarídeos. Sementes de *Parkia pendula* são capazes de produzir goma (PpeG). Deste modo, o presente trabalho teve como objetivo magnetizar a PpeG, propor como matriz para a imobilização de lectinas e purificar glicoconjugados. Sementes de *P. pendula* foram hidratadas e o sobrenadante foi submetido à filtração, precipitação, lavagem com etanol e secagem. A goma resultante foi magnetizada pelo método de co-precipitação em solução de cloretos férrico e ferroso, submetida a ativação com NaIO₄, e finalmente, incubada com a ConA. A purificação da glicoproteína fetuína foi utilizada como modelo para investigar o uso do derivado ^{mag}PpeG-ConA como matriz de afinidade. Após a cromatografia e eluição realizada com glucose (300mM), a presença de fetuína foi investigada através de SDS-PAGE. Cerca de 63% de Con A ofertada foi imobilizada no suporte. 14% da amostra de fetuína foi recuperada por eluição competitiva. Depreende-se desses resultados que a goma de *P. pendula* mostrou ser um polissacarídeo com potencial para utilização como suporte para imobilização de proteínas e sua aplicação como suporte em cromatografia de afinidade.

ABSTRACT

Protein immobilization in water insoluble supports is an important tool in biotechnology. Meanwhile, support magnetization increases its potential application since a magnetic field can be used to separate the support from the reaction system and its reuse afterwards. Among the proteins immobilized special attention have been given for lectins, mainly Concanavalin A (Con A) which presents an affinity for residues of glucose, mannose and their derivatives. Natural plant gums are sources of polysaccharides. *Parkia pendula* seeds produce a gum (PpeG) which has been investigated as support for lectin immobilization. The present work aimed to magnetize PpeG and immobilize Con A on it to be used as affinity chromatography matrix in the purification of glycoconjugates. *P. pendula* seeds were hydrated and the gum from the supernatant was precipitated and washed with ethanol being dried at 37°C. The gum was magnetized with the coprecipitation method using solutions of Fe^{+2} and Fe^{+3} . Support activation was accomplished with NaIO_4 for Con A immobilization. MagPpeG-Con A was used as affinity chromatography matrix for the recognition of bovine serum fetuin glycoprotein. Fetuin elution was carried out with a solution of glucose (300mM) and investigated through SDS-PAGE. The efficiency of Con A immobilization was 63%. After elution 14% of fetuin was recovered. These results indicate that PpeG is a promising polysaccharide support for immobilization of lectins and application as affinity chromatography matrix.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Imobilização

A imobilização de proteínas constitui uma importante ferramenta em biotecnologia. A insolubilidade em água, conferida à proteína após a imobilização, torna este material facilmente removível do meio de incubação, o que possibilita a obtenção de produtos isentos de contaminação. Além disso, a biomolécula imobilizada pode reter parte ou a totalidade de suas propriedades biológicas (TWEEDDALE & REDMOND, 1998; KORECKÁ et alii, 2005).

A interação da proteína a ser imobilizada com a respectiva matriz pode acontecer pela formação de redes interpenetradas (enclausuramento), adsorção física, ligação iônica, quelação ou ligação covalente (PINHEIRO, 1995; FALCÃO, 2002) e a ativação do suporte pode ser efetuada, usualmente, através de grupos hidroxil presentes na matriz polimérica pelo brometo de cianogêneo, glutaraldeído, epoxi, carbonil-diimidazol, tosil clorido, entre outros (TANYOLAÇ & ÖZDURAL, 2000).

A mudança do microambiente ao redor das proteínas imobilizadas pode ocasionar mudanças nas suas propriedades, quando as mesmas são comparadas a sua forma nativa (ARAÚJO et alii, 1997; GILL & BALLESTEROS, 2000). Assim, constantemente, novas metodologias são propostas para a imobilização de proteínas, tendo em vista que nenhuma matriz é universal ou perfeita (WEETALL & LEE, 1989; HERMANSON et alii, 1992; BARBOSA et alii, 2000a; BUCUR et alii, 2004).

NADRUZ-Jr e colaboradores (1996) observaram que a xantina oxidase era capaz de reter sua atividade por um tempo maior quando a mesma era co-imobilizada com superóxido dismutase e catalase em suporte de silicone-polianilina. A perda da atividade estaria ligada à produção de radicais livres (O_2^-) e H_2O_2 , que inativariam a enzima, após a sua incubação com hipoxantina (um de seus substratos). Impedimentos estéricos, devido à imobilização, também poderiam limitar a ação da enzima, ocasionando diminuição ou ausência de sua atividade catalítica.

Antígenos provenientes do agente etiológico da peste, *Yersinia pestis*, foram covalentemente imobilizados em suportes formados por uma rede de álcool polivinílico e glutaraldeído (PVA-glutaraldeído) e empregados como fase sólida em ELISA (ARAÚJO et alii, 1996). BARBOSA e colaboradores (2000b) comparando o ELISA tradicional com o ELISA-PVA-glutaraldeído observaram não haver diferenças significativas na determinação de anticorpos IgG contra antígenos de *Yersinia pestis*, concluindo que a plastificação de papéis de filtro com PVA-glutaraldeído possibilitou uma nova forma de suporte aliado ao baixo custo do processo. Utilizando Dacron revestido com polianilina e ativado com glutaraldeído, COELHO e colaboradores (2001) observaram uma maior imobilização deste mesmo antígeno acompanhada de uma eficiência no diagnóstico comparada ao ELISA tradicional.

Com a intenção de construir um biosensor sensível a pesticidas ANDREESCU e colaboradores (2001) modificaram geneticamente a enzima acetilcolinesterase (AChE) de *Drosophila melanogaster*. Esta modificação permitiu a introdução de seis aminoácidos histidina (His) na região glicolipídica, anteriormente responsável pela ancoragem da enzima à membrana citoplasmática. Devido à incorporação da histidina, a enzima pode ser imobilizada de forma dirigida, através da formação do complexo metal-quelato, Ni-NTA-Sílica (níquel-ácido nitriloacético-sílica). Isto foi possível por causa da característica do Ni^{2+} de se ligar a proteínas e peptídeos contendo His. O complexo sílica-NTA-Ni-(His₆)-AChE pôde então reconhecer os pesticidas comerciais “paraoxon”, “dichlorvos” e “chlorpyrifos ethil oxon”.

A construção de biossensores empregando ácidos nucleicos também recebe destaque. HA e colaboradores (2004) demonstraram que a inserção de grupos tiol em oligonucleotídeos (5'-HS(CH₂)₆-oligonucleotídeo-3'), do gene codificador da enzima iduronato-2-sulfato (IDS), responsável pela síndrome de Hunter, permitiu a imobilização dos DNAs de fita simples em microbalanças de cristal de quartzo (QMC).

1.2 Imobilização de Lectinas

Nos últimos tempos, tem-se observado que processos de imobilização por afinidade podem conferir um aumento da atividade catalítica de enzimas, promover estabilidade estrutural de proteínas contra desnaturações e proporcionar o reuso da matriz (MISLOVICOVÁ et alii, 2004). Neste contexto, as lectinas assumem importância significativa (HELMHOLZ et alii, 2003) por participarem de diversos processos biológicos que envolvem a interação proteína-carboidrato, tais como infecções (virais, bacterianas, parasíticas e por micoplasmas); interações células-alvo e componentes solúveis; metástases, crescimento e diferenciação celular (LORIS et alii, 1998).

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas ubíquas de origem não imunológica que interagem reversivelmente com carboidratos de glicoconjugados, aglutinam células e precipitam polissacarídeos (SHARON & LIS, 2004).

As diferentes especificidades para carboidratos distintos têm tornado estas proteínas instrumentos valiosos nas mais diversas áreas de pesquisa (BELTRÃO, 1998). Lectinas, dentre outros exemplos, podem ser empregadas na purificação e análise de glicoproteínas, glicolipídios (HELMHOLZ et alii, 2003) e polissacarídeos (FRANCO-FRAGUAS et alii, 2003). Isto possibilita a purificação destes compostos provenientes de misturas complexas com a preservação de sua integridade estrutural (HELMHOLZ et alii, 2003).

Desse modo, FRANCO-FRAGAS e colaboradores (2003) propuseram que a imobilização da lectina de soja (“soybean agglutinin”, SBA) em Sepharose 4B modificada seria capaz de reconhecer e purificar polissacarídeos capsulares (CPS-14), responsáveis pela resposta imunológica à bactéria *Streptococcus pneumoniae*.

Também, através da imobilização da lectina de gérmen de trigo (“wheat germ agglutinin”, WGA) em Sepharose 4B, células vermelhas sangüíneas puderam ser seletivamente reconhecidas e analisadas quanto à ligação de citocalasina B e o transportador de glicose Glut-1 (GOTTSCHALK et alii, 2003).

Uma lectina extraída das sementes de *Cratylia mollis* foi imobilizada em Sepharose e utilizada para purificação de proteínas plasmáticas humanas (LIMA et alii, 1997). Cerca de 10% das proteínas de plasma foram separadas por cromatografia de afinidade, dentre

elas a lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT, E.C.2.3.1.43), responsável pela esterificação do colesterol plasmático.

Dentre as lectinas, certamente, a mais estudada, é a Concanavalina A (Con A) (Fig. 1), extraída da *Canavalia ensiformis*. Sua estrutura compreende três folhas β e sítios de ligação para cálcio e manganês (LORIS et alii, 1998). Dependendo do pH, Con A apresenta-se como dímero (pH < 5,6), tetrâmero (pH 5,8 a 7,0) e em alto nível organizacional (pH > 7,0); e possui afinidade por resíduos de glicose e ou manose e seus derivados (BUCUR et alii., 2004).

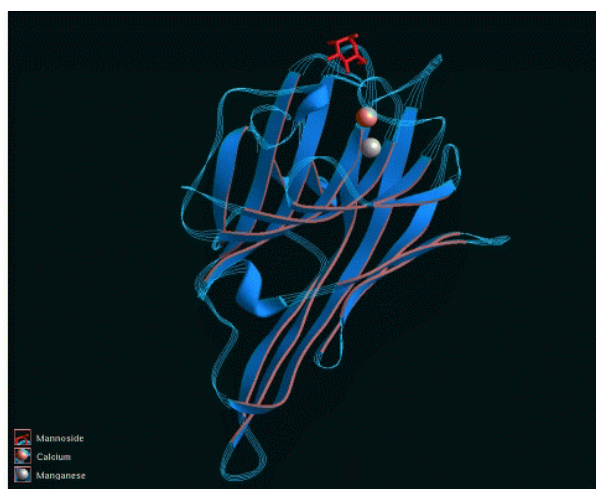


Figura 1: Monômero da Concanavalina A

(http://msdlocal.ebi.ac.uk/docs/Images/GIF/4CNA_concanavalin-A-monomer_1.gif)

MISLOVICOVÁ e colaboradores (2004) observaram que a conjugação de manana a enzima penicilina G acilase (penicilina aminohidrolase, E.C.3.5.1.11), propiciava a sua ligação a Con A. Isto possibilitou a formação de até três camadas sucessivas de manana-penicillina G acilase (MPGA) e Con A, sendo a primeira detentora de maior atividade (73%) em relação a segunda (10,4%).

Estudando um novo método para imobilização da enzima acetilcolinesterase (AChE), BUCUR e colaboradores (2004) demonstraram que as interações existentes entre AChE e Con A poderiam ser úteis na construção de um novo biossensor. Por possuir pelo menos dois sítios de ligação a carboidratos em sua estrutura (dímero), Con A reconheceria o carboidrato α -D-mano-piranosídeo imobilizado no suporte e disponibilizaria ao menos

mais um sítio de ligação que poderia ser usado pela AchE. Deste modo, o biossensor obtido apresentou-se sensível aos inseticidas organofosfóricos.

FRAGUAS e colaboradores (2004) relataram que a purificação da peroxidase (E.C. 1.11.1.7) de extrato bruto de raiz de *Armoracia rusticana*, estaria diretamente ligada a quantidade de Con A ativa imobilizada em Sepharose, o que refletiria o método de imobilização empregado. Com a utilização do agente CDAP (1-ciano-4-(dimetilamino)-piridino-tetrafluoroborato) os autores obtiveram uma alta atividade enzimática para a peroxidase imobilizada devido à formação de estruturas homogêneas na matriz de éster de cianato.

Em cromatografia de afinidade, Con A imobilizada foi utilizada por FONTANIELLA e colaboradores (2004) no reconhecimento de ligantes presentes na parede celular das algas *Evernia prunastri* e *Xanthoria parietina* oriundas de líquens. Tal interação demonstrou não somente que este ligante é uma proteína glicosilada, contendo manose, bem como indicou que a mesma poderia ser um receptor para sinais extracelulares.

MASÁROVÁ e colaboradores 2004 propuseram uma nova metodologia para a imobilização da Con A. Através das interações hidrofóbicas existentes entre o decapeptídeo polymyxin B, PMB, obtido a partir do *Bacillus polymyxa*, imobilizado no Chip C1 (SPR – surface plasmon resonance), e Con A, foi possível reconhecer os carboidratos manana originários da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Entretanto, apesar da afinidade da Con A pela manana ser observada, a imobilização da mesma em PMB foi reduzida quando comparada a sua imobilização ao Chip C1. O método ainda apresentou qualidades apreciáveis quanto ao seu reuso, visto que, tanto a manana como a Con A podem ser removidas e reimmobilizadas.

1.3 Partículas Magnéticas

Atualmente, a utilização de partículas magnéticas em áreas da biologia e medicina vem facilitando não somente a imobilização de proteínas, mas também, a purificação de DNA e RNA, separação e purificação celular, transporte de drogas contra o câncer e a ressonância magnética por imagem, RMI (PAN et alii, 2005).

Misturas contendo partículas magnéticas possuem vantagens em relação aos métodos convencionais, pois reduzem o tempo de processamento e o uso de agentes químicos, facilitam a separação e possibilitam uma automação adequada. A interação entre a magnetita e as espécies biológicas (células, ácidos nucleicos e proteínas) aconteceria por intermediários de camadas orgânicas ou poliméricas (PAN et alii, 2005).

Estudos de ressonância magnética nuclear (RMN), microscopia eletrônica, difração de raio-X e das propriedades magnéticas mostraram indícios de que o complexo dextrana-magnetita (DM) seria formado por um núcleo de magnetita revestido com dextrana (Fig. 2). A interação se daria entre o grupo carbonila da dextrana (exposto por aquecimento em solução de NaOH) e o ferro. Em meio aquoso, estas partículas contendo dextrana de diferentes pesos moleculares, formam complexos de moléculas totalmente estendidas ou contorcidas ao acaso (KAWAGUSHI & HASEGAWA, 2000).

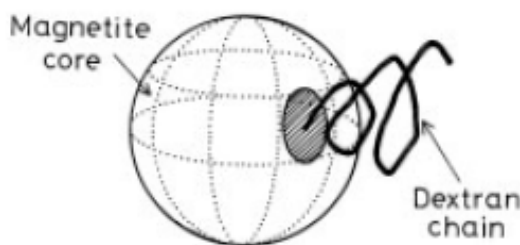


Fig. 2. Dextrana magnetizada
(KAWAGUSHI & HASEGAWA, 2000)

A construção de microesferas magnéticas, envoltas em nitrocelulose, foi aplicada na imobilização da enzima glicosamilase (E.C.3.2.1.3) com retenção de aproximadamente 94,7% da atividade enzimática da enzima solúvel (TANYOLAÇ & ÖZDURAL, 2000).

Apoiando-se na metodologia de magnetização, PAN e colaboradores (2005) imobilizaram a albumina de soro bovino (“bovine serum albumine”, BSA) em nanoesferas modificadas com dendrímeros de poliamidoamina (PAMAM). A adição de grupos $-NH_2$ pela PAMAM proporcionou um aumento da taxa de imobilização de BSA em torno de 3,9 a 7,7 vezes quando comparado ao processo de imobilização com amino-silano.

SAFARIKOVA e SAFARIK (2000) utilizaram quitosana magnetizada para a purificação da lectina de tubérculos de *Solanum tuberosum*. Rica em hidroxiprolina, esta

proteína possui afinidade por carboidratos do tipo N-acetilglicosamina, os quais podem ser encontrados na quitosana. Cerca de 50% da atividade da lectina pôde ser recuperada após a separação da mesma do extrato bruto. Isto representou um aumento de 13 vezes na atividade específica desta lectina.

KORECKÁ e colaboradores (2005) demonstraram que a imobilização de glicoproteínas (tripsina, quimiotripsina, papaína e neuraminidase) poderia ser realizadas em partículas magnéticas e a atividade enzimática poderia variar dependendo do tipo de tampão empregado e da presença de surfactante.

Estudando a imobilização do anticorpo IgG contra peroxidase (“horseradish peroxidase”, HRP) em agarose ativada com diferentes grupos reativos (MANAE = monoamino-N-aminoetil-agarose, glutaraldeído, quelato-epóxidos e brometo de cianogêneo), FUENTES e colaboradores (2005) observaram que suportes oxidados do tipo MANAE apresentavam os melhores resultados, tendo em vista a não inibição do processo antígeno-anticorpo. Além disto, a utilização de nanopartículas magnéticas contendo MANAE e revestidas com um heteropolímero (poli-aspártico e dextrana-aldeído) impediram a inativação do próprio anticorpo e a interação iônica com proteínas inespecíficas no momento da purificação da HRP.

1.4 Polissacarídeos

Carboidratos e seus derivados têm sido investigados para serem utilizados como suporte para imobilização de proteínas (SAFARIKOVA & SAFARIK, 2000; FRANCO-FRAGUAS et alii, 2003; FRAGUAS et alii, 2004; MISLOVICOVÁ et alii, 2004). E sua magnetização apresenta vantagens, pois, o revestimento da magnetita com o polímero oferece a possibilidade de funcionalidade da superfície e subsequente imobilização da biomolécula, além de proteger a mesma do contato com o metal oxidado, o ferro (KORECKÁ et alii, 2005).

Gomas naturais constituem uma ótima fonte de carboidratos. O termo goma pode denotar um grupo de polissacarídeos (glicanas) ou derivados que se hidratam em água quente ou fria para formar soluções viscosas ou dispersões em baixas concentrações. Podem ser classificadas como gomas naturais ou modificadas. As naturais compõem

extratos de algas (como por exemplo, os alginatos), ou exudados de plantas (como a goma arábica), sementes e raízes (amido da batata) e fermentação microbiana (xantana). Celulose e derivados do amido (éter ou ésteres de celulose) constituem as gomas modificadas (ZOHURIAAN & SHOKROLAHI, 2004). Sua importância deve-se ao emprego na indústria de papel, tintas, alimentícia, fármacos e cosméticos (MILLER, 1987).

Descrições de polisacarídeos podem ser encontradas na literatura. SIMAS e colaboradores (2004) isolaram a goma do exudado da palma *Scheelea phalerata* e observaram que a mesma era insolúvel em água e composta por unidades de fucosil, arabinose, xilose e ácido urônico nas concentrações molares 5:34:54:7 respectivamente. Entretanto, de PINTO e colaboradores (1998) na análise da goma dos exudados de *Laguncularia racemosa* (“mangue blanco” encontrado na Venezuela) demonstraram a presença de um complexo pentassacarídeo composto por ácido urônico, galactose, raminose, além de resíduos de arabinosil (piranosil e furanosil), galactosil, ácido glicurônico e ácido 4-o-metil- α -D-glicurônico.

LU e YOSHIDA (2003) relatam que os polisacarídeos da árvore “lacquer” (chinesa) possuem atividade antitumoral e promotora da coagulação. Caso sejam sulfatados, os mesmos adquirem atividade anti-HIV e anticoagulante. Os autores descrevem na sua composição os açúcares D-galactose, 4-o-metil- α -D-glicurônico, ácido D-glicurônico, L-arabinose e raminose, contudo, comparações realizadas com diferentes variedades da Ásia demonstraram diferenças quanto à concentração e composição dos mesmos.

Raízes de *Vernonia kotschyana* são utilizadas por habitantes de Mali no tratamento de gastrites, úlceras gastroduodenais, no auxílio a digestão e como remédio cicatrizante contra ferimentos, dentre outros. Observando estes aspectos etnofarmacológicos, NERGARD e colaboradores (2004) isolaram e caracterizaram parcialmente seus polisacarídeos, além de analisarem sua atividade imunomoduladora. Tais sacarídeos consistiam de frutose, arabinose, raminose, galactose, glucose e ácido galactourônico. A proliferação de células B, estimulação de macrófagos e a fixação do complemento resultantes da atividade da porção acídica do polissacarídeo denotam e apóiam o uso terapêutico desta planta.

A *Parkia pendula* (Fig 03.) é uma espécie arbórea leguminosa pertencente à família das Fabaceae com distribuição pantropical, encontrada na Zona da Mata dos Estados de Pernambuco, Alagoas e norte do Espírito Santo.



Fig 3. *Parkia pendula*

Também fazendo parte da flora da Floresta Amazônica. A árvore é considerada um indicativo de Mata Atlântica remanescente, sendo popularmente conhecida como visgueiro devido ao exudado obtido de suas vagens maduras e de seu tronco. A árvore pertence à subtribo Mimosoideae, sendo também denominada de *Inga pendula* Wild ou *Mimosa pendula* Poir (FILHO, 2003).

Sementes de *Parkia pendula* produzem uma goma composta pelos carboidratos: galactose (30%), arabinose (62%), ácido glicurônico (3,5%) e ácido 4-*O*-metilglicurônico (4,5%). Apesar da sua descrição na literatura, não foi observada uma aplicabilidade para esta goma (ANDERSON & PINTO, 1985).

2 JUSTIFICATIVA

Tendo em vista a importância de se explorar e aplicar o potencial de recursos renováveis botânicos da região Nordeste e do Brasil, com impacto positivo na sociedade, a goma de sementes de *Parkia pendula*, uma leguminosa encontrada na Zona da Mata de Pernambuco, Alagoas e Espírito Santo e Floresta Amazônica, foi escolhida como matéria prima para o desenvolvimento de um suporte para imobilização de proteínas.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

O presente trabalho tem como objetivo magnetizar e propor a goma das sementes de *P. pendula* como suporte para imobilização da lectina de *Canavalia ensiformis*, Concanavalina A, Con A, com fins à purificação de glicoconjugados através de cromatografia de afinidade sob campo magnético.

3.2 ESPECÍFICOS

- Purificar a goma das sementes de *P. pendula*;
- Magnetizar a goma de *P. pendula*;
- Imobilizar Con A na goma de *P. pendula*;
- Verificar a atividade da Con A imobilizada quanto a sua eficiência na purificação de fetuína (glicoconjugado).

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, D. M. W. & de PINTO, G. L. Gum polysaccharides from three *Parkia* species. **Phytochemistry**. v. 24, n. 1. p. 77-79. 1985.

ANDREESCU, S.; MAGEARU, V.; LOUGARRE, A.; FOURNIER, D.; MARTY, J.-L. Immobilization of enzymes on screen-printed sensors via an histidine tail. Application to the detection of pesticides using modified cholinesterase. **Analytical letters**. v. 34, n. 4. p. 529-540. 2001.

ARAÚJO, A. M.; NEVES, Jr. M.T.; AZEVEDO, W. M.; OLIVEIRA, G. G.; FERREIRA, D. L.; COELHO, R. A. L.; FIGUEIREDO, E. A. P.; CARVALHO, Jr. L. B. Polyvinyl alcohol-glutaraldehyde network as support for protein immobilisation. **Biotechnology Techniques**. v. 11, p. 67-72. 1997.

ARAUJO, A. M.; PETRIBU, A. T.; BARBOSA, G. H. T. S.; DINIZ, J. R. P.; ALMEIDA, A. M. P.; AZEVEDO, W. M.; CARVALHO, Jr. L. B. The use of polyvinyl alcohol glutaraldehyde as solid-phase in ELISA for plague. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 91, n. 2. p. 195-198. Mar/Apr. 1996.

BARBOSA, A.D.; BARROS, F. S. M.; CALLOU, E. Q.; ALMEIDA, A. M. P.; ARAUJO, A. M.; AZEVEDO, W. M.; CARVALHO, Jr. L. B. Cellulose acetate as solid phase in ELISA for plague. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 95, n. 1. p. 95-96 jan./feb. 2000a.

BARBOSA, G. H. T. S.; SANTANA, E. M.; ALMEIDA, A. M. P.; ARAUJO, A. M.; FATIBELLO-FILHO, O.; CARVALHO, Jr. L. B. The use of filter paper plasticized with polyvinyl alcohol-glutaraldehyde in ELISA. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 33. p. 823-827. 2000b.

BELTRÃO, E.I.C.; CORREIA, M.T.S.; FIGUEREDO-SILVA, J.; COELHO, L.C.B.B. Binding Evaluation of isoform 1 from *Cratylia mollis* Lectin to Human Mammary Tissue. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 74, n. 3, p. 125-134, 1998.

BUCUR, B.; DANET, A. F.; MARTY, J. M. Versatile method of cholinesterase immobilization via affinity bonds using Concanavalin A applied to the construction of a screen-printed biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 20. p. 217-225. 2004.

COÊLHO, R. A. L.; SANTOS, G. M. P.; AZEVEDO, P. H. S.; JAQUES, G. A.; AZEVEDO, W. M.; CARVALHO, Jr. L. B. Polyaniline-dacron composite as solid phase in enzyme linked immunosorbent assay for *Yersinia pestis* antibody detection. **Journal of Materials and Research**. v. 56, n. 2. p. 257-260. 2001.

FALCÃO, D, A. Emprego de pérolas de polisiloxano-álcool polivinílico e discos de papel de filtro plastificados com álcool polivinílico-glutaraldeído em imunoensaios. Recife-PE: Universidade Federal de Pernambuco, 2002. **Dissertação de Mestrado**. 55p.

FILHO, G, A. N. Imobilização de goma de sementes de *Parkia pendula* em pva-glutaraldeído para purificação de glicoconjugados. Recife-PE: Universidade de Pernambuco, 2003. **Monografia**. 36p.

FONTANIELLA, B.; MILLANES, A.-N.; VICENTE, C.; LEGAZ, M.-E. Concanavalin A binds to a mannose-containing ligand in the cell wall of some lichen phycobionts. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 42. p. 773-779. 2004.

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

FRANCO-FRAGUAS, L.; PLÁ, A.; FERREIRA, F.; MASSALDI, H.; SUÁREZ, N.; BATISTA-VIEIRA, F. Preparation of soybean agglutinin by affinity chromatography and its immobilization for polysaccharide isolation. **Journal of Chromatography B**. v. 790. p. 365-372. 2003.

FUENTES, M.; MATEO, C.; GUISÁN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Preparation of inert magnetic nano-particles for the directed immobilization of antibodies. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 20. p. 1380-1387. 2005.

GILL, I. & BALLESTEROS, A. Bioencapsulation within synthetic polymers (part 1): sol-gel encapsulated biologicals. **Trends in Biotechnology**. v. 18. p. 282-296. 2000.

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

HA, T. H.; KIM, S.; LIM, G.; KIM, K. Influence of liquid medium and surface morphology on the response of QCM during immobilization and hybridization of short oligonucleotides. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 20. p. 378-389. 2004.

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.

HERMANSON, G. T.; MALLIA, A. K.; SMITH, P. K. Immobilized affinity ligand techniques. New York: Academic Press, Inc. 1992

KAWAGUSHI, T. & HASEGAWA, M. Structure of dextran-magnetite complex: relation between conformation of dextran chains covering core and its molecular weight. **Journal of Materials in Medicine**. v. 11. p. 31-35. 2000.

KORECKÁ, L.; JEZOVÁ, J.; BÍLKOVÁ, Z.; BENES, M.; HORÁK, D.; HRADCOVÁ, O.; SLOVÁKOVÁ, M.; VIORY, J. L. Magnetic enzyme reactors for isolation and study of heterogeneous glycoproteins. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**. v. 293. p. 349-357. 2005.

LIMA, V. L. M.; CORREIA, M. T. S.; CECINEL, Y. M. N.; SAMPAIO, C. A. M.; OWEN, J. S.; COÊLHO, C. B. 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.

LORIS, R.; HAMELRYCK, T.; BOUCKAERT, J.; WYNS, L. Legume lectin structure. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1383. p. 9-36. 1998.

LU, R & YOSHIDA, T. Structure and molecular weight of Asian lacquer polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**. v. 54. p. 419-424. 2003.

MASÁROVÁ, J.; DEY, E. S.; 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.

MILLER, J. N., B. E. Industrial gums. Encyclopedia of polymer science and engineering. John Wiley & Sons. 7. 1987. 589p.

MISLOVICOVÁ, D.; MASÁROVÁ, J.; VIKARTOVSKÁ, A.; GEMEINER, P.; MICHALKOVÁ, E. Biospecific immobilization of mannan-penicillin G acylase neoglycoenzyme on Concanavalin A-bead cellulose. **Journal of Biotechnology**. v. 110. p. 11-19. 2004.

NADRUZ, Jr, W.; MARQUES, E. T. A.; AZEVEDO, W. M.; LIMA-FILHO, J. L.; CARVALHO, Jr. L. B. Immobilization of xanthine oxidase on a polyaniline silicone support. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 29. p. 347-350. 1996.

NERGARD, C. S; DIALLO, D.; MICHAELSEN, T. E.; MALTERUD, K. E.; KIYOHARA, H.; MATSUMOTO, T.; YAMADA, H.; PAULSEN, B. S. Isolation, partial characterization and immunomodulating activities of polysaccharides from *Vernonia kotschyana* Sch. Bip. Ex Walp. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 91. p. 141-152. 2004.

PAN, B.-F.; GAO, F.; GU, H.-C. Dendrimer modified magnetite nanoparticles for protein immobilization. **Journal of Colloid and Interface Science**. v. 284. p. 1-6. 2005.

PINHEIRO, S, M, B. Dacron magnetizado: um suporte sólido para imunoensaios quimioluminescentes. Recife-PE: Universidade Federal de Pernambuco, 1995. **Dissertação de Mestrado**. 78p.

de PINTO, G. L; GOTERA, O. G.; MARTÍNEZ, M.; OSCANDO, E.; RIVAS, C. The molecular characterization of the polysaccharide gum from *Laguncularia racemosa*. **Carbohydrate Polymers**. v. 35. p. 205-213. 1998.

SAFARIKOVÁ, M. & SAFARIK, I. One-step partial purification of *Solanum tuberosum* tuber lectin using magnetic chitosan particles. **Biotechnology Letters**. v. 22. p. 941-945. 2000.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**. v. 14, n. 11. p. 53R-62R. 2004.

SIMAS, F. F.; GORIN, P. A. J.; GUERRINI, M.; NAGGI, A.; SASSAKI, G. L.; DELGOBO, C. L.; IACOMINI, M. Structure of heteroxylan of gum exudate of the palm *Scheelea phalerata* (uricuri). **Phytochemistry**. Article in press. 2004.

TANYOLAÇ, D & ÖZDURAL, A, R. Preparation of low-cost magnetic nitrocellulose microbeads. **Reactive & Functional Polymers**. v. 45. p. 235-242. 2000.

TWEEDDALE, H. J & REDMOND, J. W. Binding of carbohydrates to solid supports Part 3: Reaction of sugar hydrazones with polystyrene substituted with aromatic aldehydes. **Glycoconjugates Journal**. v. 15. p. 847-854. 1998.

WEETALL, H, H.; LEE, M, J. Antibodies immobilized on inorganic supports. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 22. p. 311-330. 1989.

ZOHURIAAN, M. & SHOKROLAHI, F. Thermal studies on natural and modified gums. **Polymer Testing**. v. 23. p. 575-579. 2004.

5 ARTIGO

**COVALENTE IMMOBILIZATION OF CONCAVALIN A ON MAGNETIC
Parkia pendula SEED GUM AND ITS APPLICATION AS AFFINITY
CHROMATOGRAPHY SUPPORT**

Sérgio Alves Bezerra, Luiz Bezerra de Carvalho Júnior, Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão*

Departamento de Bioquímica, CCB/UFPE and Laboratório de Imunopatologia Keizo
Asami LIKA/UFPE.

Correspondence to:

Dr. Eduardo I. C. Beltrão.

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, s/n. Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brazil. 50670-901. Telephone: + 55 81 21012504, Fax: + 55 81 32718484. E-mail: ebeltrao@hotmail.com

Keywords: immobilization, magnetization, *Parkia pendula* seed gum, Con A.

ABSTRACT

Protein immobilization in water insoluble supports is an important tool in biotechnology. Meanwhile, support magnetization increases its potential application since a magnetic field can be used to separate the support from the reaction system and its reuse afterwards. Among the proteins immobilized special attention have been given for lectins, mainly Concanavalin A (Con A) which presents an affinity for residues of glucose, mannose and their derivatives. Natural plant gums are sources of polysaccharides. *Parkia pendula* seeds produce a gum (PpeG) which has been investigated as support for lectin immobilization. The present work aimed to magnetize PpeG and immobilize Con A on it to be used as affinity chromatography matrix in the purification of glycoconjugates. *P. pendula* seeds were hydrated and the gum from the supernatant was precipitated and washed with ethanol being dried at 37°C. The gum was magnetized with the co-precipitation method using solutions of Fe^{+2} and Fe^{+3} . Support activation was accomplished with NaIO_4 for Con A immobilization. MagPpeG-Con A was used as affinity chromatography matrix for the recognition of bovine serum fetuin glycoprotein. Fetuin elution was carried out with a solution of glucose (300mM) and investigated through SDS-PAGE. The efficiency of Con A immobilization was 63%. After elution 14% of fetuin was recovered. These results indicates that PpeG is a promising polysaccharide support for immobilization of lectins and application as affinity chromatography matrix.

INTRODUCTION

Sugar-specific and cell-agglutinating proteins of non-immune origin are named lectins. This class of protein functions as recognition molecules in cell-molecule and cell-cell interactions in a variety of biological systems (Sharon & Lis 2004).

Many biomolecules have been isolated using separation techniques based on the interaction of biospecific molecules. Thus immobilized lectins have found applications in the purification and analysis of glycoconjugates (Helmholz et al. 2003), polysaccharides (Franco-Fraguas et al. 2003) and cells (Gottschalk et al. 2003). For instance, the lectin extracted from *Canavalia ensiformis*, named Concanavalin A, briefly Con A, has been extensively used in the isolation, fractioning and structural characterization of glycoproteins (Mislovicová et al. 1995, Bucur et al. 2004) and others important glycoconjugates bearing glucose and or mannose residues (Fraguas et al. 2004).

Among the supports used in protein immobilization carbohydrates have become the focus of intense interest in biotechnology (Safarikova & Safarik 2000, Kawagushi & Hasegawa 2000, Franco-Fraguas et al. 2003, Fraguas et al. 2004, Mislovicová et al. 2004). Furthermore, to increase their performance supports have been magnetized to decrease the processing time of samples, the utilization of chemicals as well as to facilitate separation and process automation (Pan et al. 2005).

Natural plant gums are a source of carbohydrates. *Parkia pendula* (Fabaceae) is a plant with pan tropical distribution (Anderson & de Pinto 1985) found in the Atlantic Forest in the Northeast of Brazil and in the Brazilian Rain Forest. Its seeds produce a gum, when hydrated with water. This work aimed to magnetize the *P. pendula* seed gum (PpeG) and to use as a support for Con A immobilization for affinity chromatography of glycoconjugates

MATERIALS AND METHODS

Gum purification: PpeG purification was carried out according to Rodrigues et al. (1993). Seeds of *P. pendula* were hydrated with distilled water for 24 h. The supernatant (75 ml) was diluted in 300 ml of distilled water, filtered through cheese-cloth and the gum

precipitated with 750 ml of ethanol for 24 h at 4°C. Afterwards the precipitate was filtered through cheese-cloth, washed twice with 150 ml of ethanol at 4°C and dried at 36°C overnight.

Gum Magnetization: Dried PpeG (500 mg) was added to 50 mL of 1% acetic acid solution and stirred for 4 h. Solution (10 ml) containing 1.1M FeCl₃.6H₂O and 0.6M FeCl₂.4H₂O (1:1) was added to the mixture, the pH was adjusted to 11 with a 28%/Liter solution of NH₄OH and heated in water-bath for 30min at 80°C. Finally, the magnetic particles were collected by centrifugation and washed with distilled water until the supernatant reach pH 7.0. PpeG magnetized (_{mag}PpeG) was then dried at 25°C, grounded and sieved (particle size 250 µm).

Support activation and Con A Immobilization: 1 ml of sodium meta-periodate solution (100 mg/ml in 0.01M sodium phosphate buffer, pH 7.4) was added to 50 mg of _{mag}PpeG. Activation reaction was developed in the dark, under stirring for 4 h at 25°C. The support was washed 10 times with 0.01M sodium phosphate buffer, pH 7.4 (from now on called buffer) and incubated with 1 ml of a solution of Con A (400 µg/ml in buffer) under stirring for 20 h at 4°C. Afterwards _{mag}PpeG-Con A was washed with buffer (5 times) and incubated with 1 ml of a solution of 0.03M sodium borohydride for 2 h at 4°C. The support was washed 10 times with the buffer and kept at 4°C until use. Efficiency of Con A immobilization onto _{mag}PpeG was determined by the difference between the protein content of Con A offered and the one in the supernatant after immobilization process using Lowry et al. (1951). All experiments were carried out in quintuplicates.

Affinity Chromatography with _{mag}PpeG-Con A: 1mL of a solution of fetuin (400 µg/ml in buffer) was incubated with _{mag}PpeG-Con A (50mg) for 1 h under stirring at 25°C. Afterwards the magnetic particles were collected by a magnetic field (6,000 Oe) and further washed twice with the buffer. Protein determination was established for the supernatants according to Lowry et al. (1951). The washed magnetic particles were incubated with 0.3M glucose (1 ml) for 1 h at 25°C in order to disrupt the Con A-fetuin complex. Efficiency of fetuin recognition by Con A immobilized on the _{mag}PpeG was determined by the difference

between the protein content of fetuin offered and the one in the supernatant. All experiments were carried out in quintuplicates.

SDS-PAGE: samples were dialyzed, lyophilized and resuspended in distilled water prior to the gel running. SDS-PAGE (12.5%) was carried out according to Laemmli (1970) and visualized with silver staining (Keshoven & Dernick, 1985). Protein pattern contained bovine serum albumin (66 kDa), fetuin (64 kDa) egg-albumin (46 kDa), gliceraldehyde-3-P enzyme (36 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa), trypsinogen (24 kDa) e Con A (32 kDa).

Physical-chemical partial characterization: PpeG and $_{\text{mag}}$ PpeG were analyzed for elemental content and infrared spectrometry in the Analytical Laboratory of the Departamento de Química Fundamental of the Universidade Federal de Pernambuco.

RESULTS AND DISCUSSION

Physico-chemical partial characterization

The element's composition of the free and magnetized *P. pendula* seed gum (Table 1) showed the presence of carbon and hydrogen only. They increased with higher amounts of gum used to magnetize. Although Anderson & Pinto (1985) suggested the presence of a protein component, by the nitrogen and sulfur detections in the *P. pendula* seed gum these elements were not detected in our preparation (Table 1). Furthermore, no amine and amide characteristic bands were visualized in the gum infrared analysis (Figure 4).

Table 01. Element composition of free and magnetized *P. pendula* seed gum.

Sample	%			
	Nitrogen	Carbon	Hydrogen	Sulfur
PpeG* (0,500 mg/ml)	0	35,83	5,29	0
$_{\text{mag}}$ PpeG* (0,100 mg/ml)	0	3,58	1,42	0
$_{\text{mag}}$ PpeG* (0,500 mg/ml)	0	9,24	1,98	0

* - PpeG and $_{\text{mag}}$ PpeG stands for free and magnetized *P. pendula* seed gum, respectively.

Infrared Spectrum

Corti et al. (2004) observed that 1656, 1631 e 1558 cm^{-1} infrared bands corresponded to axial deformation of carbonyl in amida (in our case related to carbonyl of peptide bonds), N-H angular deformation of amina and N-H angular deformation of amida. Similar bands were observed by Pan et al. (2005). Absence of these bands in the spectro of PpeG confirms, together with the element analysis that no proteins were found in its structure.

The PpeG infrared spectrum is typical for polysaccharide (Fig. 4) as those reported for cellulose (Corti et al. 2004) and the cashew gum (Silva et al. 2004). The C=O axial deformation at the wavenumber 1736 cm^{-1} typical of glucuronic acid is present for the PpeG. On the other hand, Fig. 5 presents the infrared spectra of the free PpeG and magnetized PpeG at different concentrations (0.100 mg/ml and 0.500 mg/ml) as well as the magnetite. The Fe-O group can be seen at the 570 cm^{-1} wavenumber (Pan et al. 2005). Other groups present in the spectra are shown in Table 2.

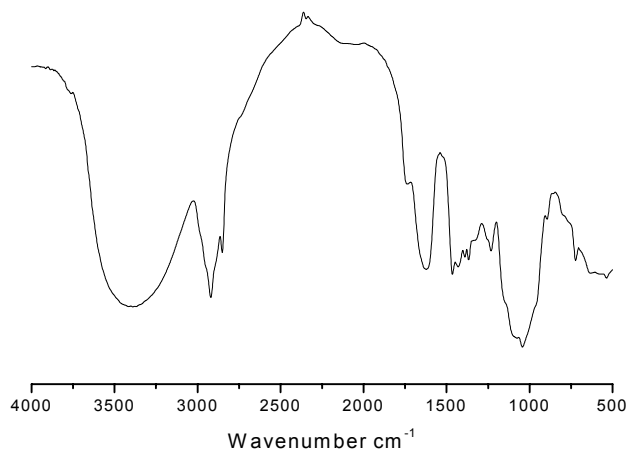


Figure 4: Infrared spectrum of the *P. pendula* seed gum.

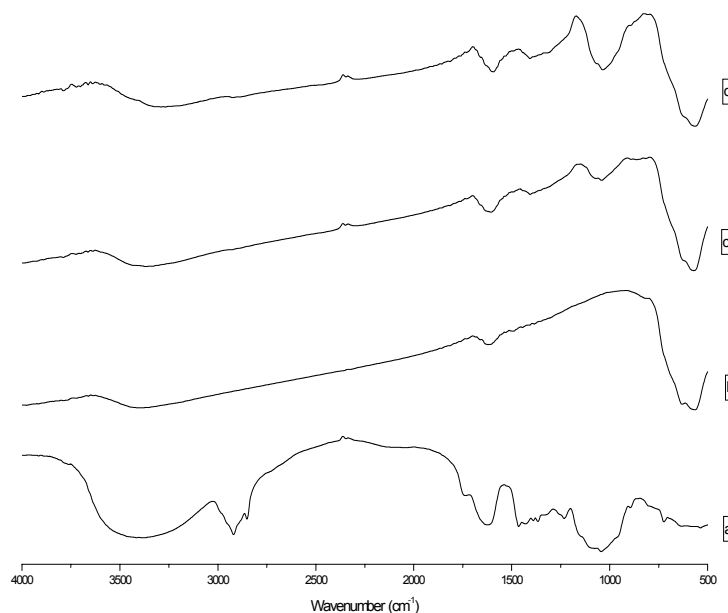


Figure 5: Infrared spectra of *P. pendula* gum (a), magnetite (b) and magnetized gum using 0,100 mg/ml (c) and 0,500 mg/ml (d)

Table 2. Infrared absorbance of the *P. pendula* seed gum derivatives.

Wavenumber (cm ⁻¹)	Chemical group	Deformation type
565, 564, 570	Fe-O	-
1038, 1040, 1042	C-OH	Axial
1231	C-O	Axial
1406, 1430	O-H	Angular
1591, 1605, 1622, 1736	C=O	Axial
2851	C-H	Axial asymmetry
2919, 2923, 2929	C-H	Axial symmetry
3269, 3370, 3400, 3391	O-H	Axial

Immobilization and Activity of Con A

The partial oxidation of the gum by NaIO₄ aimed to introduce aldehydes groups in the vicinal hydroxyls of the carbohydrates (Martinez-Barragão & Angel. 2001) randomly (Hong et al. 2004). These aldehydes groups then react to amino group from amino acids

such as lysine, sulfhydryl group from cysteine, imidazole group from histidine (Fraguas et al. 2004).

The immobilization of Con A on the PpeG retained about 62% of the offered protein (Table 03). Kobayashi & Ichishima (1991) reported 40% of retention immobilizing bovine serum albumin on cellulose. It is worthwhile to notice that not all carbohydrate moieties are oxidized by the NaIO₄ (Hong et al. 2004). Furthermore, the PpeG structure is not completely identified yet and its linear and branched chains are not established.

Table 03. Immobilization efficiency of Con A on magPpeG.

Sample	Offered (µg/mL)	Supernatant (µg/mL)	Immobilized* (µg)	Efficiency* (%)
1	400	137	263	65
2	400	137	263	65
3	400	149	251	62
4	400	154	246	61
5	400	158	242	60

* - Mean ± SD 253.0 µg ± 9,7 µg and 62.6% ± 2.30%

The aim of this contribution was to use the immobilized Con A on the magPpeG as affinity support for the glyconjugate purification. The fetuin, composed of one polypeptide chain (Spiro 1963) containing 3 oligossacharides N-linked (Green et al. 1988) and 3 O-linked (Spiro & Bhoyroo 1974), was used as a model. Table 04 summarizes the results of this purification and shows that about 14% of fetuin was complexed to about 63% of Con A. This relationship accounts for about 01 mole of fetuin per 08 mole of Con A considering that the molecular weight are respectively 64 kDa (Johnson & Heath, 1986a) and 32 kDa (Fontaniella et al. 2004). The ratio of 1:1 mole: mole of fetuin and Con A was probably not accomplished due to steric hindrance caused by the immobilization procedure.

Beside that, even the higher quantity of oligossacharides present in fetuin and its recognition by soluble Con A (Johnson & Heath 1986b), Green et al. (1988) observed that among the 23 N-types of oligossacharides, that could be found in fetuin (di- or tri-branched), only the di-branched ones would be recognized, that is, 17%.

Table 4. Efficiency of fetuin recognition by the immobilized Con A on magPpeG .

Sample	Offered ($\mu\text{g/mL}$)	Supernatant ($\mu\text{g/mL}$)	Retained fetuin* (μg)	Efficiency* (%)
1	400	332	68	17
2	400	344	56	14
3	400	338	62	15
4	400	362	38	9
5	400	343	57	14

* - Mean $\pm$ SD of $56,2 \mu\text{g} \pm 11,23 \mu\text{g}$ and $13.8\% \pm 2.95\%$

Figure 6 shows the SDS-PAGE three bands (64, 58 e 55 kDa) for the fetuin (Lane B) whereas only two bands (64 e 58 kDa) for the purified fetuin (Lane C) by affinity binding to the immobilized Con A on magPpeG . The Con A band (Lane D) is not present in the Lane C, which demonstrates that this lectin was covalently linked to the magPpeG and was not detached during the washings.

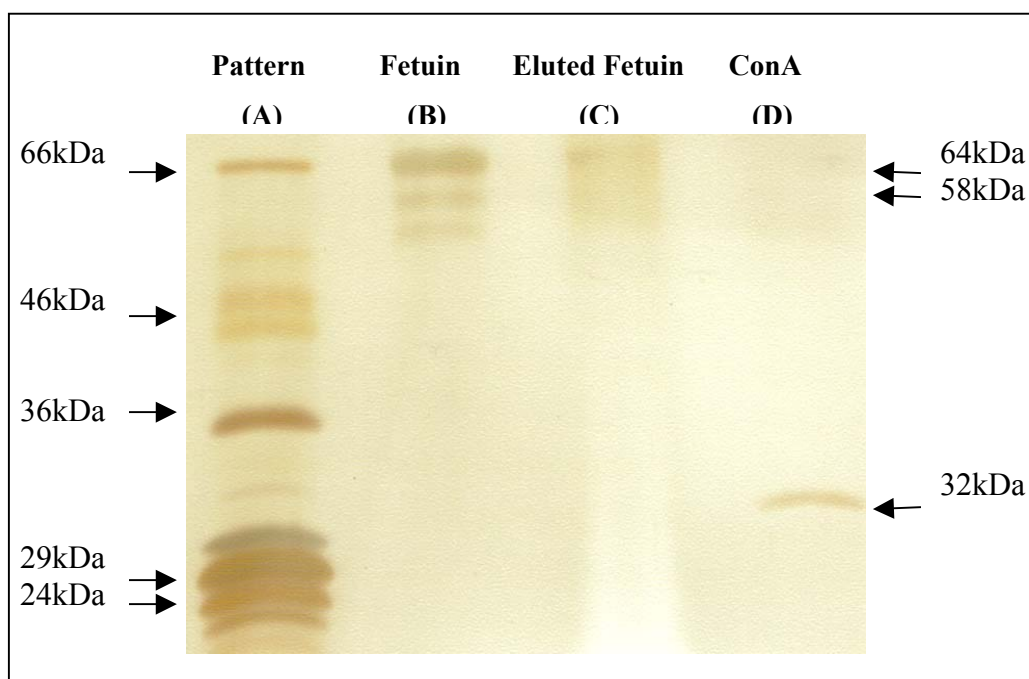


Figure 6: SDS-PAGE (Laemmli 1970) of eluted fetuin from the immobilized Con A on magPpeG . Pattern (A), Fetuin (B), Eluted Fetuin (C), ConA(D).

Because of its carbohydrate moiety fetuin presents an irregular run in SDS-PAGE. Johnson & Heath (1986a) observed that in SDS-PAGE native fetuin, pre-fetuin and glycosylated one (found in the rough endoplasmatic reticulum) present molecular weight of 64, 49 e 58 kDa, respectively. The 58kDa band would be a fetuin with two N-type glycosylation.

According to Green et al. (1988) the recognition of Con A for di-branched fetuin justifies the absence of the 55kDa band in the lane C of the SDS-PAGE (Fig. 05). Authors observed that L-PHA (Leukoagglutinating Phytohemagglutinin) and RCA-I (*Ricinus Communis* Agglutinin) interact with carbohydrates depending on the type of the bound between the saccharide residue and its position in the oligossacharide chain. L-PHA possess strong interaction if the neuraminic acid, present in fetuin, has one terminal α -2,3 bound linked to the mannose's branching α -1-6. Otherwise, if the bound is α -2,6 on the same branching (α -1-6) the recognition of the sugar by L-PHA cannot be made. Furthermore, no significant interference, in recognition, was observed if the sugar was located on another branching.

So, the spatial changes caused by certain saccharides bearing N-type glycosylation in fetuin, would, possibly, impose a more or less stable interaction between Con A and fetuin.

CONCLUSION

Ppeg was efficiently magnetized and used as support for Con A immobilization. magPpeG-Con A was used as an affinity chromatography matrix for purification of fetuin under a magnetic field showing to be a promising support for biotechnology application.

ACKNOWLEDGEMENT

The Brazilian National Research Council (CNPq) supported this work.

REFERENCES

- Anderson D M W, & de Pinto G L (1985) Gum polysaccharides from three *Parkia* species. *Phytochemistry*. 24(1): 77-79.
- Bucur B, Danet A F, Marty J M (2004) Versatile method of cholinesterase immobilization via affinity bonds using Concanavalin A applied to the construction of a screen-printed biosensor. *Biosens Bioelect*. 20: 217-225.
- Corti G S, Botaro V R, Gil L F, Gil R P F (2004) Estudo da capacidade de complexação de íons Cu^{2+} em solução aquosa usando celulose modificada com anidrido succínico e com poliaminas. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*. 14(5): 313-317.
- Fontaniella B, Millanes A-N, Vicente C, Legaz M-E (2004) Concanavalin A binds to a mannose-containing ligand in the cell wall of some lichen phycobionts. *Plant Physiol Biochem*. 42: 773-779. 2004.
- Fraguas L F, Batista-Vieira F, Carlsson J (2004) Preparation of high-density Concanavalin A adsorbent and its use for rapid, high-yield purification of peroxidase from horseradish roots. *J Chromat B*. 803: 237-241.
- Franco-Fraguas L, Plá A, Ferreira F, Massaldi H, Suárez N, Batista-Vieira F (2003) Preparation of soybean agglutinin by affinity chromatography and its immobilization for polysaccharide isolation. *J Chromat B*. 790: 365-372.
- Gottschalk I, Gustavsson P-E, Ersson B, Lundahl P (2003) Improved lectin-mediated immobilization of human red blood cells in superporous agarose. *J Chromat B*. 784: 203-208.
- Green E D, Aldelt G, Baenziger J U (1998) The asparagine-linked oligosaccharides on bovine fetuin. *J Biol Chem*. 263(34): 18253-18268.
- Helmholz H, Cartellieri S, He L, Thiesen P, Niemeyer B (2003) Process development in affinity separation of glycoconjugates with lectins as ligands. *J Chromat A*. 1006: 127-135.
- Hong X, Guo W, Yuan H, Li J, Liu Y, Ma L, Bai Y, Li T (2004) Periodate oxidation of nanoscaled magnetic dextran composites. *J Magnet Magnetic Materials*. 269: 95-100.
- Kawagushi T & Hasegawa M (2000) Structure of dextran-magnetite complex: relation between conformation of dextran chains covering core and its molecular weight. *J Materials Med*. 11: 31-35.
- Keshoven H J & Dernick R (1985) Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis*. 6: 103-12.

Kobayashi M & Ichishima E (1991) Application of periodate oxidized glucans to biochemical reactions. *J Carbohy Chem.* 10(4): 635-644.

Johnson W V & Heath E (1986a) Structural features of bovine fetuin revealed from analysis of the primary translation product: anomalous behaviour on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis is due largely to peptide and not solely to carbohydrate. *Arch Biochem Biophys.* 251(2): 732-737.

Johnson W V & Heath E (1986b) Evidence for Posttranslational *O*-glycosylation of fetuin. *Biochemistry.* 25: 5518-5525.

Laemmli U K (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-68.

Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, Randall R J (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193(1): 265-275.

Martinez-Barragão J J & del Angel R M (2001) Identification of putative coreceptor on Vero cells that participates in Dengue 4 virus infection. *J Virol.* 75(17): 7818-7827.

Mislovicova D, Chudinova M, Gemeiner P, Docolomansky P (1995) Affinity chromatography of invertase on Concanavalin A-bead cellulose matrix: the case of an extraordinary strong binding glycoenzyme. *J Chromat B.* 664: 145-153.

Mislovicová D, Masárová J, Vikartovská A, Gemeiner P, Michalková E (2004) Biospecific immobilization of mannan-penicillin G acylase neoglycoenzyme on Concanavalin A-bead cellulose. *J Biotech.* 110: 11-19.

Pan B-F, Gao F, Gu H-C (2005) Dendrimer modified magnetite nanoparticles for protein immobilization. *J Colloid Interf Scien.* 284: 1-6.

Rodrigues J F, de Paula R C, Costa S M O (1993) Métodos de Isolamento de Gomas Naturais: comparação através da goma do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.). *Polímeros: Ciência e Tecnologia.* 31-36. Jan./Mar.

Safarikova M & Safarik I (2000) One-step partial purification of *Solanum tuberosum* tuber lectin using magnetic chitosan particles. *Biotech Letters.* 22: 941-945.

Sharon N, Lis H (2004) History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology.* 14(11): 53R-62R.

Silva D C, de Paula R C M, Feitosa J P A, de Brito A C F, Maciel J S, Paula H C B (2004) Carboxymethylation of cashew tree exudate polysaccharide. *Carbohy Polym.* 58: 163-171.

Spiro R G (1963) Demonstration of a single peptide chain in the glycoprotein fetuin: terminal amino acid analyses and studies of the oxidized and reduced alkylated preparations. *J Biol Chem.* 238(2): 644-649.

Spiro R S & Bhoyroo V (1974) Structure of the *O*-glycosidically linked carbohydrate units of fetuin. *J Biol Chem.* 249(18): 5704-5717.

CONCLUSÕES

Ppeg foi:

- eficientemente magnetizada e usada como suporte para a imobilização da Con A;
- $_{mag}PpeG$ -Con A foi utilizada como matrix de afinidade cromatográfica para a purificação da fetuina sobre campo magnético;
- $_{mag}PpeG$ -Con A demonstrando ser um suporte promissor em aplicações biotecnológicas.

ANEXO

Instruções para Autores

Biotechnology Letters

Manuscript Submission

Kluwer Academic Publishers prefer papers submitted in word processing packages such as MS Word or WordPerfect, running under operating systems MS DOS or Windows.

For the purpose of reviewing, articles for publication can be submitted either as hard-copy printout (2-fold) with 2 diskettes to:

Mrs E.J. Sparke

Editorial Assistant for *Biotechnology Letters*

Department of Biological Sciences

University of Hull

Hull HU6 7RX

U.K.

or as an e-mail attachment in Word or Wordperfect (not in Mac). Figures can be submitted as TIFF, EPS (Canvas) files. Papers submitted electronically should be sent to the Editorial Secretary: Mrs E.J. Sparke at: E.J.Sparke@hull.ac.uk

In each case, a covering letter indicating the novelty, urgency or timeliness of your communication should be enclosed. Please also include copies of any papers referred to as 'in press'.

Reviewing Procedure

In addition to the two copies sent to the Editorial Assistant, a further copy of the manuscript should be sent either electronically or by hard copy to the most appropriate member of the Editorial Board who will then make the arrangements for refereeing (see list of Editorial Board members either on this website or in the current print issue of *Biotechnology Letters* for areas of interest and addresses but please note some Board Members do NOT list their e-mail address). Reviewing is normally completed within four weeks. Inform the Editor to whom the paper has been sent for review.

Manuscript Presentation

The journal's language is English. British English or American English spelling and terminology may be used, but either one should be followed consistently throughout the article. Manuscripts should not exceed 6 pages of text (including references, tables and figures). Manuscripts should be printed or typewritten on A4 or US Letter bond paper, one side only, leaving adequate margins on all sides to allow reviewers' remarks. Please double-space all material, including tables, legends to figures, notes and references. Quotations of more than 40 words should be set off clearly, either by indenting the left-hand margin or by using a smaller typeface. Use double quotation marks for direct quotations and single quotation marks for quotations within quotations and for words or phrases used in a special sense.

Number the pages consecutively with the first page containing:

- title
- author(s)
- affiliation(s)
- full address for correspondence, including fax number and e-mail address but NOT telephone number
- key words
- then leave a space of 4 cm for insertion (by Editor) of handling dates

Title

This must be informative and give key details of the work described. Do not use phrases such as 'The effect of...' or 'Study of ...'. Please give an explicit clear title and include mention of the biological system being used.

Key Words

Please provide up to 5 key words or short phrases in alphabetical order.

Abstract

Please provide a short abstract of not more than 5 printed lines in the final paper. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references. Imprecise or qualitative statements should be avoided as should redundant words and phrases. Quantitative values of key data should be provided whenever possible.

Symbols and Units

Mathematical units should be set out economically but unambiguously. A solidus can be used for simple fractions or units - for example ml/h - but the double solidus is to be avoided - for example kg/m³h is correct but g/l/h is not. Units can also be given as g l⁻¹ etc. but the style must be consistent. Terms such as ppm are not encouraged; use mg l⁻¹ etc. as appropriate. Concentrations should be given, for example, as g ethanol l⁻¹ not g l⁻¹ ethanol. Uncommon units, symbols and all non-standard abbreviations must be defined at their first appearance but a minimum number of abbreviations is preferred. A list of abbreviations, if needed, should be provided before the Introduction.

Figures and Tables

Submission of electronic figures

In addition to hard-copy printouts of figures, authors are encouraged to supply the electronic versions of figures in either Encapsulated PostScript (EPS) or TIFF format. Many other formats, e.g. Microsoft Postscript, PiCT (Macintosh) and WMF (Windows), cannot be used and the hard copy will be scanned instead.

Figures should be saved in separate files without their captions, which should be included with the text of the article. Files should be named according to DOS conventions, e.g., 'figure1.eps'. For vector graphics, EPS is the preferred format. Lines should not be thinner than 0.25 pts and in-fill patterns and screens should have a density of at least 10%. Font-related problems can be avoided by using standard fonts such as Times Roman and Helvetica. For bitmapped graphics, TIFF is the preferred format but EPS is also acceptable. The following resolutions are optimal: black-and-white line figures - 600 - 1200 dpi; line figures with some grey or coloured lines - 600 dpi; photographs - 300 dpi; screen dumps - leave as is. Higher resolutions will not improve output quality but will only increase file size, which may cause problems with printing; lower resolutions may compromise output quality. Please try to provide artwork that approximately fits within the typeset area of the journal. Especially screened originals, i.e. originals with grey areas, may suffer badly from reduction by more than 10-15%.

Submission of hard-copy figures

If no electronic versions of figures are available, submit only high-quality artwork that can be reproduced as is, i.e. without any part having to be redrawn or re-typeset. The letter size

of any text in the figures must be large enough to allow for reduction. Photographs should be in black-and-white on glossy paper. If a figure contains colour, make absolutely clear whether it should be printed in black-and-white or in colour. Figures that are to be printed in black-and-white should not be submitted in colour. Figures that are in colour and are considered by the Editor to be an essential feature of the paper may be included without cost to the authors. Authors who wish to have figures printed in colour and for which colour is not regarded as essential will be charged for this service. The decision will be taken by the Editor and the authors advised accordingly.

Each figure and table should be numbered and mentioned in the text. The approximate position of figures and tables should be indicated in the margin of the manuscript. On the reverse side of each figure, the name of the (first) author and the figure number should be written in pencil; the top of the figure should be clearly indicated. Figures and tables should be placed at the end of the manuscript following the Reference section. Each figure and table should be accompanied by an explanatory legend or footnotes to make their content self-evident without resource to the text. Relevant procedures may be placed in the legends rather than in the text under Methods and materials. The figure legends should be grouped and placed on a separate page. Figures are not returned to the author unless specifically requested.

In tables, footnotes are preferable to long explanatory material in either the heading or body of the table. Such explanatory footnotes, identified by superscript letters, should be placed immediately below the table. Titles and footnotes to tables accompany the table itself.

Section Headings

First-, second-, third-, and fourth-order headings should be clearly distinguishable but not numbered.

Appendices

Supplementary material should be collected in an Appendix and placed before the Reference section.

Notes

Please use footnotes rather than endnotes. Notes should be indicated by consecutive superscript numbers in the text. A source reference note should be indicated by means of an asterisk after the title. This note should be placed at the bottom of the first page.

Cross-Referencing

In the text, a reference identified by means of an author's name should be followed by the date of the reference in parentheses and page number(s) where appropriate. When there are more than two authors, only the first author's name should be mentioned, followed by 'et al.'. In the event that an author cited has had two or more works published during the same year, the reference, both in the text and in the reference list, should be identified by a lower case letter like 'a' and 'b' after the date to distinguish the works.

Examples:

(Winograd 1986a,b)

(Winograd 1986, Flores et al. 1988)

(Bullen & Bennett 1990)

Acknowledgements

Acknowledgements of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the References.

References

References to books, journal articles, articles in collections and conference or workshop proceedings, and technical reports should be listed at the end of the article in **alphabetical** order. Articles in preparation or articles submitted for publication, unpublished observations, personal communications, etc. should not be included in the reference list but should only be mentioned in the article text (e.g., T. Moore, personal communication).

References to books should include the author's name; year of publication; title; page numbers where appropriate; publisher; place of publication, in the order given in the example below.

Smith JE (1996) *Biotechnology*, 4th edn. London: Arnold.

References to articles in an edited collection should include the author's name; year of publication; article title; editor's name; title of collection; first and last page numbers; publisher; place of publication, in the order given in the example below.

Smith K, Wesson U (2001) Rotary discharge system. In: Cobley UT, Pierce T, eds. *Bioengineering Reports*, Vol. 17. Nevada: Boot Hill Press, pp. 69-96.

References to articles in conference proceedings should include the author's name; year of publication; article title; editor's name (if any); title of proceedings; first and last page numbers; place and date of conference; publisher and/or organization from which the proceedings can be obtained; place of publication, in the order given in the example below. These **must** be within the public domain and the corresponding ISSN or ISBN should be given.

Shin SH, Chi HJ (2001) Studies of tissue culture of some medicinal plants. In: Proc. 3rd Int. Symp. on New Drug Development from Natural Products, May 2-3, Seoul, pp. 79-95. ISSN 0 521 77074.

References to articles in periodicals should include the author's name; year of publication; article title; abbreviated title of periodical; volume number (issue number where appropriate); first and last page numbers, in the order given in the example below. The correct abbreviations of journals should be given according to *Chemical Abstracts* or *J.Biol. Chem.*

Selmi B, Gontier E, Ergan F, Thomas D (1997) Enzymatic synthesis of tricapyrylin in a solvent-free system: lipase regio-specificity as controlled by glycerol adsorption on silica gel. *Biotechnol. Tech.* 11: 543-547.

References to technical reports or doctoral dissertations which also must be within the public domain, should include the author's name; year of publication; title of report or dissertation; institution; location of institution, in the order given in the example below.

Koziarz J (2001) Adhesion and immobilization of bacteria on hydrophobic cloths. *MSc Thesis*. Ottawa, Canada: Carleton University.

Proofs

Proofs will be sent to the Publisher who will arrange the proofreading. No proofs are issued to authors. It is therefore imperative that the text of a submitted paper be thoroughly checked before submission.

Offprints

Fifty offprints of each article will be provided free of charge. An order form for additional offprints will be sent to the corresponding author. The corresponding author receives a copy of the issue containing her/his article free of charge.

Page Charges and Colour Figures

No page charges are levied on authors or their institutions. Colour figures can be published without charge if the Editor agrees that the use of colour is essential. Otherwise the cost of colour printing has to be passed on to the author.

Copyright

Authors will be asked, upon acceptance of an article, to transfer copyright of the article to the Publisher. This will ensure the widest possible dissemination of information under copyright laws.

Permissions

It is the responsibility of the author to obtain written permission for a quotation from unpublished material, or for all quotations in excess of 250 words in one extract or 500 words in total from any work still in copyright, and for the reprinting of figures, tables or poems from unpublished or copyrighted material.

Additional Information

Additional information can be obtained from:

Kluwer Academic Publishers

Van Godewijckstraat 30

P.O. Box 17

3300 AA Dordrecht

The Netherlands

Fax: +31-78-6576 254

Kluwer Academic Publishers Online. Visit our website at <http://www.wkap.nl>

Bezerra, Sérgio Alves

Imobilização covalente de concanavalina a em goma de sementes de *Parkia Pendula* magnetizada e sua Aplicação biotecnológica / Sérgio Alves Bezerra. – Recife: O Autor, 2006.

37 folhas : il., fig., tab.

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

**1. Biotecnologia 2. Proteínas - imobilização 3. Parkia pendula I.
Título.**

577.112

CDU (2.ed.)

UFPE

572.6

CDD (22.ed.)

CCB – 2006 -007