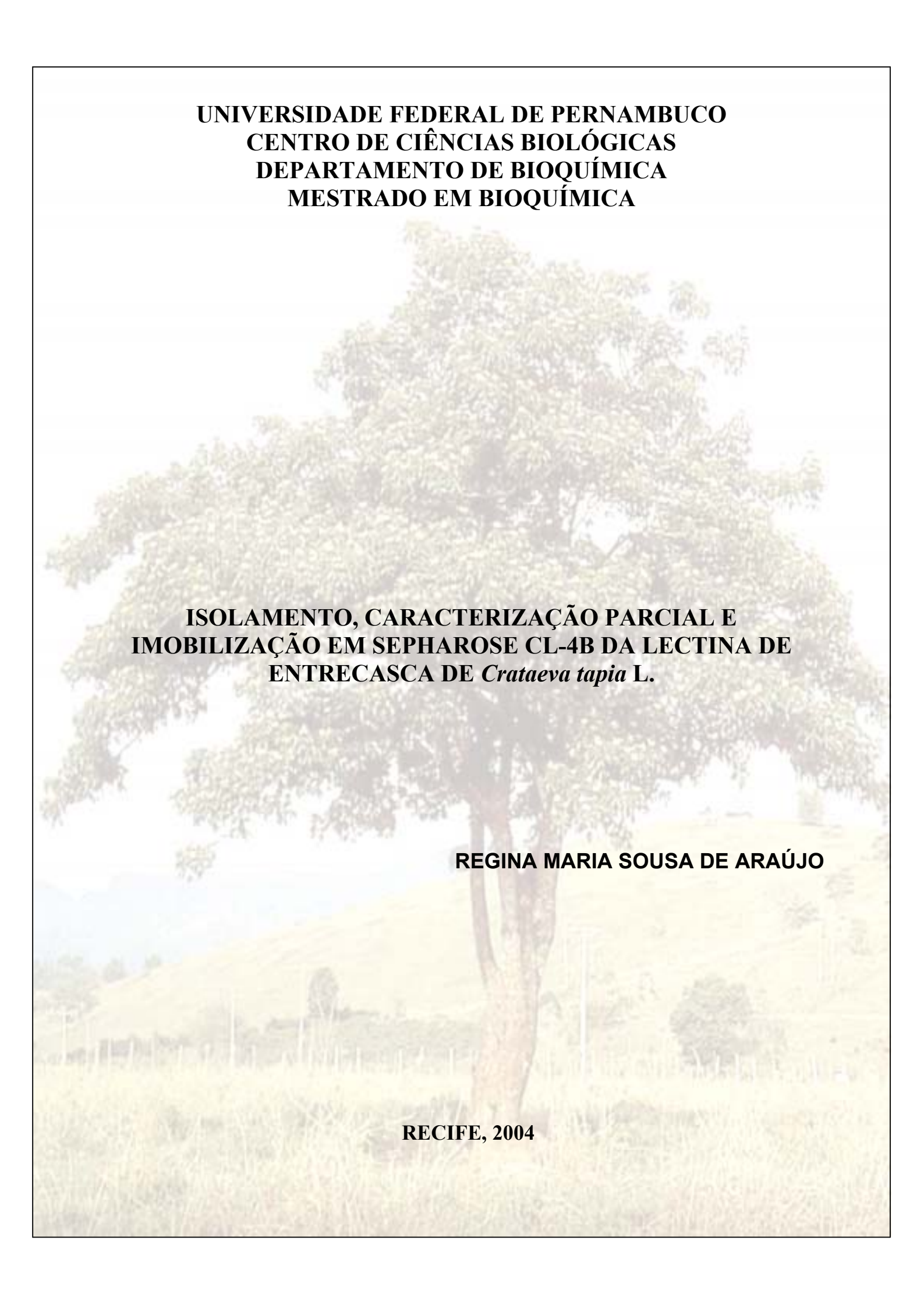


A large, leafy tree stands in a grassy field under a bright sky. The tree has a thick trunk and a wide, spreading canopy. The field is filled with tall, dry grass, and there are some distant hills or structures visible in the background.

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

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO PARCIAL E
IMOBILIZAÇÃO EM SEPHAROSE CL-4B DA LECTINA DE
ENTRECASCA DE *Crataeva tapia* L.**

REGINA MARIA SOUSA DE ARAÚJO

RECIFE, 2004

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

REGINA MARIA SOUSA DE ARAUJO

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO PARCIAL E
IMOBILIZAÇÃO EM SEPHAROSE CL-4B DA LECTINA DE
ENTRECASCA DE *Crataeva tapia* L.**

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

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva
Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia

**RECIFE
FEV/2004**

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

REGINA MARIA SOUSA DE ARAUJO

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO PARCIAL E IMOBILIZAÇÃO EM
SEPHAROSE CL-4B DA LECTINA DE ENTRECASCA DE *Crataeva tapia* L.**

Orientadora: _____
Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva

Co-orientadora: _____
Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso

Profa. Dra. Maria das Graças Carneiro da Cunha

Profa. Dra. Maria Inês Sucupira Maciel

Suplentes:

Profa. Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima

Profa. Dra. Maria do Socorro Mendonça Cavalcanti

RECIFE, FEV/2004

Deus quer, o homem sonha, a obra nasce.
Fernando Pessoa

À minha mãe, que será sempre presença viva em minha vida, pela força que me deu mesmo no silêncio, mesmo na ausência... A minha gratidão, silenciosa e eterna, pelo teu amor e pelo teu sorriso que sempre de algum lugar me encoraja e me dá forças para prosseguir.

AGRADECIMENTOS

A Deus, razão de tudo. “Meu coração é para ti, Senhor, porque tu me destes a vida, o existir, o carinho e o amor”.

A Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva pela forma carinhosa que me acolheu, pela orientação científica maravilhosa, pelo apoio, atenção, confiança, incentivos e oportunidades constantes. Enfim, mais que uma orientadora, foi verdadeira amiga.

A Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia pela co-orientação, pela tranquilidade, confiança, apoio e amizade.

A Maria Barbosa Reis, pela dedicação, ensinamentos e por ter me oferecido a entrecasca com a qual pude desenvolver e obter os resultados deste trabalho.

Aos amigos que encontrei no Mestrado e no Laboratório de Glicoproteínas que fizeram a distância de casa e a rotina tornar-se menos árdua e mais alegre, pela amizade, companheirismo e apoio. Eu amo vocês!

Aos professores e funcionários do Departamento de Bioquímica pela dedicação, amizade ou pelo simples convívio que se fez presente nesta conquista. Em especial a Miron, Neide e João Vírginio.

Palavras não traduzem meu eterno e sincero agradecimento ao meu pai pelo amor, carinho, educação, respeito, compreensão e apoio em todos os momentos da minha vida. Hoje estou aqui devido à sua força e seu incentivo. Pai, nós vencemos!

A Luciano pelo seu amor, amizade, cumplicidade, carinho, compreensão, respeito e estímulo constantes. Encontro na minha conquista a sua presença.

Ao meu irmão, Henrique, e à minha família, em especial à Tia Ana Alice, que sempre me incentivaram a seguir em frente.

Aos meus amigos que mesmo distantes sempre me ajudaram e apoiaram.

A Érika e Líbia, companheiras maravilhosas que conviveram dia-a-dia comigo toda esta trajetória.

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

LISTA DE ABREVIATURAS

AH	Atividade hemaglutinante
AHE	Atividade hemaglutinante específica
CM	Carboximetil
CNBr	Brometo de cianogênio
Con A	Concanavalina A (lectina de <i>Canavalia ensiformis</i>)
CrataBL	Lectina da entrecasca de <i>Crataeva tapia</i>
DEAE	Dietilaminoetil
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
IgA	Imunoglobulina A
LCH	Aglutinina de <i>Lens culinaris</i>
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PEG 8000	Polietilenoglicol
PHA	Hemaglutinina de <i>Phaseolus vulgaris</i>
PNA	Aglutinina de amendoim
RIP-2	Proteína que inativa ribossomo tipo 2
SBA	Aglutinina de soja
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecilsulfato de sódio
WGA	Aglutinina de germen de trigo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Representação Esquemática de Aglutinação por Lectinas	2
Figura 2:	Visão Geral de <i>Crataeva tapia</i>	11

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	V
LISTA DE ABREVIATURAS	VI
LISTA DE FIGURAS	VII
SUMÁRIO	VIII
RESUMO	IX
ABSTRACT	X
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Lectinas	1
1.1.1. Generalidades	1
1.1.2. Purificação e Caracterização	4
1.1.3. Propriedades Biológicas e Aplicações Biotecnológicas	8
1.2. <i>Crataeva tapia</i> L.	11
2. RELEVÂNCIA DO TRABALHO	12
3. OBJETIVOS	13
3.1 Objetivo Geral	13
3.2 Objetivos Específicos	13
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	14
5. ARTIGO “Purification in milligram quantities of <i>Crataeva tapia</i> bark lectin and its use as biospecific adsorbent for glycoprotein isolation”	24
6. CONCLUSÕES	49

RESUMO

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas de origem não imune cuja ligação reversível e específica a carboidratos resulta em aglutinação celular. Estas proteínas, presentes em plantas, bactérias, invertebrados ou vertebrados, são detectadas por ensaio de hemaglutinação. *Crataeva tapia* L. pertence à família Capparaceae. Uma lectina de entrecasca de *C. tapia*, CrataBL, foi purificada à homogeneidade através de fracionamento com sulfato de amônio (Fração 30-60%), seguida por cromatografia de afinidade (gel de guar) ou troca iônica (CM-Celulose). CrataBL foi ativa com eritrócitos de humanos, galinha e coelho (atividade hemaglutinante específica, AHE, 102) e principalmente inibida por glicoproteínas. CrataBL foi termoestável e tratamento com EDTA não afetou a atividade hemaglutinante (AH); atividade não foi alterada após adição de Ca^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} . CrataBL migrou como uma única banda após eletroforese para proteínas nativas básicas e duas bandas polipeptídicas de massa molecular 21 e 40.000 Da após SDS-PAGE com ou sem agente redutor; os polipeptídeos foram também detectados sob o gel usando reagente para glicoproteína. A natureza glicoprotéica de CrataBL foi também revelada por sua interação com lectina glicose/manose sob gel de agarose. A massa molecular da lectina por cromatografia de gel filtração foi de 52.000 Da. CrataBL imobilizada em Sepharose CL-4B adsorveu bioseletivamente e purificou caseína, fetuína e ovoalbumina.

ABSTRACT

Lectins are proteins or glycoproteins of non immune origin which reversible and specific carbohydrate binding results in cellular agglutination. These proteins are present in plants, bacteria, invertebrates or vertebrates and are detected by hemagglutinating assay. *Crataeva tapia* belongs to the Capparaceae family. A lectin from *C. tapia* bark, CrataBL, was purified to electrophoretic homogeneity by ammonium sulphate fractionation (30-60% fraction) and affinity (gum guar) or ion exchange chromatography (CM-Cellulose). CrataBL activity was obtained with human, chicken and rabbit erythrocytes (specific hemagglutinating activity, SHA = 102), which was mainly inhibited by glycoproteins. CrataBL was thermostable and EDTA treatment did not affect the HA; activity did not change after Ca^{2+} , Mg^{2+} and Mn^{2+} addition. CrataBL migrated as a single band after electrophoresis to native basic proteins and two polypeptide bands of molecular mass 21,000 Da and 40,000 Da after SDS-PAGE with or without reducing agent; the polypeptides were also detected on gel using glycoprotein reagent. Glycoprotein nature of CrataBL was also revealed by its interaction with glucose/mannose lectin upon agarose gel. The lectin molecular mass by gel filtration chromatography was 52,000 Da. CrataBL immobilized on Sepharose 4B bioselectively adsorbed and purified casein, fetuin and ovalbumin.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Lectinas

1.1.1. Generalidades

As proteínas estão entre as macromoléculas biológicas mais abundantes sendo extremamente versáteis em suas funções. Elas participam da atividade celular, por exemplo, como enzimas, inibidores de enzimas, hormônios, proteínas de transporte, proteínas de reserva, proteínas contráteis e proteínas estruturais.

As lectinas são proteínas amplamente distribuídas entre plantas, animais e microorganismos (Rojo *et al.*, 2003; Banerjee *et al.*, 2004; Böckelmann *et al.*, 2004). Estas macromoléculas são conhecidas por sua capacidade de aglutinar células, especialmente eritrócitos de diferentes espécies animais (Paiva e Coelho, 1992; Correia e Coelho, 1995; Reynoso-Camacho *et al.*, 2003).

O termo lectina (originado do latim “*lectus*”) foi introduzido por Boyd e Shapleigh no ano de 1954, em virtude da habilidade de ligarem-se especificamente a carboidratos de uma forma não-covalente (Hong *et al.*, 2001). O termo aglutinina é usado como um sinônimo para lectina, porque se refere à habilidade de aglutinar eritrócitos ou outras células (Peumans e van Damme, 1995). Goldstein *et al.* (1980) definiram lectinas como proteínas ou glicoproteínas de origem não imunológica que se ligam a carboidratos através de pelo menos dois sítios de ligação, aglutinam células vegetais e/ou animais e precipitam polissacarídeos, glicoproteínas e glicolipídeos. Porém, o exato delineamento de proteínas capazes de se ligarem a carboidratos, que são comumente referidas como lectinas ou aglutininas, tem sido alvo de controvérsias. Avanços recentes na análise estrutural e molecular das lectinas têm redefinido o termo lectina. De acordo com a nova definição, são consideradas lectinas as proteínas ou glicoproteínas que possuem pelo menos um sítio que se liga

reversivelmente a mono ou oligossacarídeos específicos, sem apresentar função catalítica ou características imunológicas (Peumans e van Damme, 1995). Esta nova definição é mais abrangente pois inclui uma série de proteínas com diferentes propriedades de aglutinação e/ou precipitação de glicoconjugados. A figura 1 mostra uma representação esquemática de aglutinação por lectina.

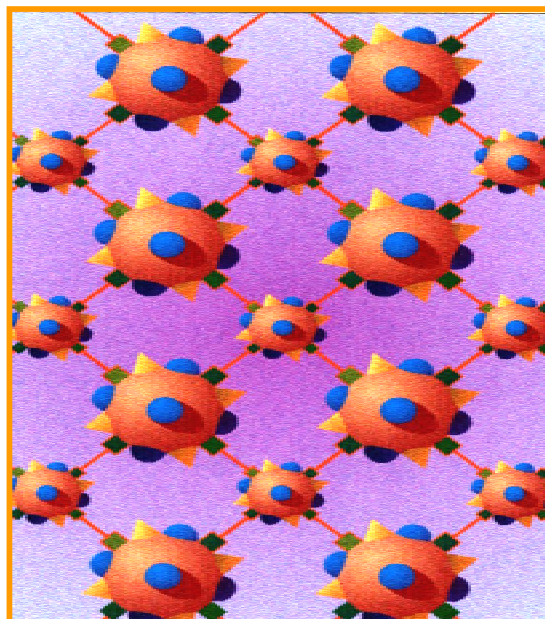


Figura 1 – Representação esquemática de aglutinação por lectinas
(■ = carboidrato; —□ = lectina).

Baseada na estrutura global, lectinas de plantas são também classificadas em merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas (Peumans e van Damme, 1998). Merolectinas são pequenas e simples; devido à sua natureza monovalente são incapazes de precipitar glicoconjugados ou aglutinar células, sendo um exemplo deste grupo a proteína que se liga a quitina obtida do látex da seringueira (*Hevea brasiliensis*). Hololectinas contêm dois ou mais sítios de ligação para carboidratos, idênticos ou muito homólogos; devido à sua natureza di ou multivalente aglutinam células e/ou precipitam glicoconjugados. A maioria das lectinas de plantas pertence ao grupo das hololectinas. Quimerolectinas são proteínas que possuem um ou mais sítios de ligação para carboidratos e outro sítio com atividade catalítica (ou outra atividade biológica) que funciona

independentemente daquele de ligação para carboidratos. Dependendo do número de sítios de ligação para carboidratos, quimerolectinas agem como merolectinas ou hololectinas. Exemplos de quimerolectinas são proteínas que inativam ribossomos tipo 2 (RIP-2). Superlectinas consistem de pelo menos dois sítios de ligação para carboidratos diferentes e podem ser consideradas como um grupo especial de hololectinas.

Em lectinas, os sítios de ligação para carboidratos tendem a ser na superfície da molécula (Sharon e Lis, 1990; Cominetti *et al.*, 2002) e a seletividade da ligação é obtida através de pontes de hidrogênio e interações de van der Waals entre o açúcar e a proteína (Surolija *et al.*, 1996; Weis e Drickamer, 1996). A especificidade da lectina é definida em função do monossacarídeo que mais eficazmente inibe a atividade (Kennedy *et al.*, 1995).

O reconhecimento entre proteínas e carboidratos é de suma importância em muitos processos biológicos tais como infecção viral, bacteriana e parasítica; fertilização e metástase, bem como em crescimento e diferenciação do câncer (Loris *et al.*, 1998). As lectinas de plantas são escolhidas para estudar a base molecular destes eventos de reconhecimento porque são facilmente obtidas na forma purificada e porque exibem uma larga variedade de especificidade a carboidratos (Loris *et al.*, 1998; Sharon e Lis, 2002).

As plantas constituem ricas fontes de lectinas e sua estocagem orgânica ocorre principalmente nas raízes, folhas, flores, frutos, sementes, tubérculos, bulbos, rizomas e entrecascas (Rudiger, 1998). As lectinas são particularmente abundantes em sementes de leguminosas (Konozy *et al.*, 2003), chegando a constituir até 10 % da proteína total (Sharon e Lis, 1990; Spilatro *et al.*, 1996). Porém tem crescido o interesse por lectinas presentes em tecidos como folhas (Coelho e Silva, 2000; Moriyama *et al.*, 2003), tubérculo (Suseelan *et al.*, 2002; van Damme *et al.*, 2004), entrecasca (van Damme *et al.*, 1997a,b; Wititsuwannakul *et al.*, 1998; Eloff *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2002; Rojo *et al.*, 2003), raízes (Naeem *et al.*, 2001), rizomas (Tateno *et al.*, 2003), flores (Liu *et al.*, 2002) e cotilédones (Oliveira *et al.*, 2002; Nakamura *et al.*, 2002).

Várias evidências enfatizam uma forte semelhança entre as clássicas proteínas de reserva em sementes e suas homólogas funcionais em tecidos de entrecasca. Primeiro, as proteínas de reserva de entrecasca, que são definidas como proteínas presentes no tecido em grande quantidade durante o inverno e ausente durante o verão, estão sujeitas a um rigoroso controle evolucionário. Segundo, todas as proteínas de reserva de entrecasca estudadas acumulam-se em células parenquimais depositadas em organelas similares aos corpos protéicos das sementes. Terceiro, a composição de aminoácidos destas proteínas se assemelha fortemente à das proteínas de reserva das sementes (van Damme *et al.*, 1995).

Os papéis fisiológicos de lectinas de plantas não estão claramente definidos. Têm sido sugeridas diferentes funções, incluindo transporte de carboidratos, empacotamento e/ou mobilização de proteínas e carboidratos de reserva, alongamento da parede celular, interação entre plantas e microorganismos e defesa contra o ataque de fungos, vírus, pestes e insetos (Peuman e van Damme, 1995; Rudiger, 1998).

As lectinas de entrecasca têm papel importante no metabolismo do nitrogênio de árvores da região temperada (van Damme *et al.*, 1995) e tem sido sugerida sua participação no mecanismo de defesa da planta (Rojo *et al.*, 1997). Outras funções propostas para estas proteínas incluem a participação no metabolismo dos carboidratos e estocagem de proteínas de reserva (Spilatro *et al.*, 1996; van Damme *et al.*, 2002).

1.1.2. Purificação e Caracterização

O crescente interesse na purificação e caracterização de lectinas deve-se à sua potencial utilização em diversas áreas da medicina clínica, bem como em pesquisa química e biológica (van Damme *et al.*, 1996; Spilatro *et al.*, 1996; Banerjee *et al.*, 2004).

Lectinas de plantas têm sido isoladas e extensivamente investigadas em relação às suas propriedades química, físico-química, estrutural e biológica (Konozy *et al.*, 2003). Um grande número de lectinas tem sido clonadas e homologias em suas seqüências de aminoácidos e similaridades em suas estruturas moleculares, estabelecidas (Goldstein, 2002).

Métodos comuns utilizados na purificação de proteínas são aplicados para purificar as lectinas. Extratos podem ser feitos a partir de uma solução salina como no caso do isolamento da lectina das sementes de *Erythrina speciosa* (Konozy *et al.*, 2003) ou usando tampões como na obtenção das lectinas de cotilédones de *Luetzelburgia auriculata* (Oliveira *et al.*, 2002), dos tubérculos de *Helianthus tuberosus* L. (Suseelan *et al.*, 2002) e de entrecasca de *Hevea brasiliensis* (Wititsuwannakul *et al.*, 1998), *Sambucus racemosa* (Rojo *et al.*, 2003) e *Morus nigra* (Rougé *et al.*, 2003). Extratos apresentando atividade hemaglutinante (AH) podem ter suas lectinas purificadas parcialmente através de fracionamento salino com sulfato de amônio e diálise exaustiva (Keneddy *et al.*, 1995; Kabir, 1998; Coelho e Silva, 2000) ou pela utilização de polietilenoglicol (PEG 8000) que remove compostos polifenólicos, como os presentes na entrecasca de *H. brasiliensis* (Wititsuwannakul *et al.*, 1998).

As lectinas podem ser purificadas à homogeneidade através de cromatografia de afinidade (Tateno *et al.*, 2003), cromatografia de troca iônica (Zhao *et al.*, 2003) ou cromatografia de gel filtração (Rojo *et al.*, 2003). O que varia, principalmente, são as matrizes que são utilizadas nestas cromatografias cuja escolha depende da especificidade a carboidratos (cromatografia de afinidade), carga líquida (cromatografia de troca iônica) e tamanho molecular da lectina (cromatografia de gel filtração).

A cromatografia de afinidade, técnica mais amplamente utilizada, tem como princípio de separação a habilidade das lectinas se ligarem especificamente a suportes polissacarídicos através de ligações não covalentes. A proteína desejada é obtida com alto grau de pureza (Ye e Ng, 2002), alterando-se as condições de pH (Datta *et al.*, 2001), força iônica (Freire *et al.*, 2002) ou pela eluição com uma solução contendo um competidor (Oliveira *et al.*, 2002).

Na cromatografia de troca iônica a ligação da proteína ocorre com os grupos de carga de sinal contrário imobilizados na matriz. A coluna é lavada com solução tampão e as proteínas com nenhuma ou pouca interação com o trocador de íons são excluídas. As proteínas adsorvidas à matriz podem ser eluídas pelo aumento da força iônica ou alteração do valor de pH do meio (Datta *et al.*, 2001). Uma das matrizes mais utilizadas neste tipo de cromatografia é a celulose. Como exemplo temos a carboximetil (CM) celulose, um trocador catiônico carregado negativamente, e a dietilaminoetil (DEAE) celulose, um trocador aniônico.

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

Em geral, um protocolo de purificação de lectinas envolve um ou mais métodos cromatográficos. A lectina de tubérculos de *H. tuberosus* (Suseelan *et al.*, 2002) foi obtida a partir de uma cromatografia de troca iônica, utilizando coluna de DEAE-Sephacel, de uma cromatografia de gel filtração em coluna de Ultrogel e uma cromatografia de afinidade em coluna de manose-agarose.

Vale ressaltar que a purificação utilizando matrizes comerciais é cara, e portanto a busca por matrizes alternativas com capacidade de ligar lectinas de diferentes especificidades e de baixo custo tem crescido. Um exemplo é o método desenvolvido para imobilizar proteínas da clara do ovo de galinha para obter uma matriz com ampla especificidade para diferentes lectinas (Zoccatelli *et al.*, 2003). A partir de 12 ovos foram obtidas 35 a 40 g de resina seca que foi utilizada para a purificação de lectinas pertencentes a 4 classes de especificidade: hemaglutinina de *Phaseolus vulgaris* (PHA, liga sacarídeos complexos), aglutinina de *Lens culinaris* (LCH, liga manose e glicose), aglutinina de gérmen de trigo (WGA, liga

ácido siálico, N-acetil-glicosamina e seus polímeros) e aglutinina de amendoim (PNA, liga galactose N-terminal). A matriz foi estável por pelo menos 2 meses e eficiente para a purificação de PHA, LCH e WGA; a pureza das preparações foi comparada com as lectinas disponíveis comercialmente. PNA ligou-se muito fracamente à matriz de ovo (Zoccatelli *et al.*, 2003).

Para a caracterização de lectinas diversas propriedades físico-químicas são avaliadas. A eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) pode ser realizada usando um gel contendo dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE), que sob condições redutoras revela o grau de pureza, a composição de subunidades e a massa molecular (Reynoso-Camacho *et al.*, 2003). A eletroforese em condições nativas caracteriza a proteína em relação à sua carga líquida. Proteínas ácidas, como a de *E. speciosa* (Konozy *et al.*, 2003), e proteínas básicas, como a de *H. tuberosus* (Suseelan *et al.*, 2002), são reveladas. Os géis de poliacrilamida podem ser corados com azul de Coomassie ou negro de amido que revelam bandas polipeptídicas, ou com colorações específicas para glicoproteínas (Konozy *et al.*, 2003).

Avaliação da AH de lectinas em diferentes valores de pH e temperatura é importante para a determinação da estabilidade das moléculas quanto à sua propriedade de ligação a carboidratos e glicoconjugados. O pH tem efeito variado sobre as lectinas; em alguns casos não afeta a atividade (Wititsuwannakul *et al.*, 1998) e em outros a lectina perde sua atividade em determinada faixa de pH, como é o caso da lectina de *E. speciosa* (Konozy *et al.*, 2003). Quanto ao efeito da temperatura, algumas lectinas permanecem estáveis até 55-65° C e a partir de então, com a elevação da temperatura, a atividade hemaglutinante decai até ser abolida, como no caso das lectinas de *Luetzelburgia auriculata* e *E. speciosa* (Oliveira *et al.*, 2002; Konozy *et al.*, 2003). Lectina ativa após aquecimento a 95° C também foi isolada (Suseelan *et al.*, 2002).

Muitas lectinas contêm metais e, em alguns casos, existe evidência da necessidade de íons para sua atividade (Sharon e Lis, 1990). A lectina de *E. speciosa*, por exemplo, é uma metaloproteína que contém Ca^{2+} e Mn^{2+} , quando tratada com EDTA sua AH é totalmente abolida sendo a mesma restaurada após a

adição de Ca^{2+} e Mn^{2+} (Konozy *et al.*, 2003). Por outro lado, a lectina de *H. tuberosus* (Suseelan *et al.*, 2002) não teve sua atividade abolida quando tratada com EDTA e não necessitou de íons metálicos tais como Ca^{2+} , Mn^{2+} e Mg^{2+} para a mesma.

Testes de inibição da AH, fazendo uso de monossacarídeos simples ou carboidratos complexos, também são freqüentes na caracterização de lectinas, desde que a especificidade é um critério para classificar lectinas de plantas em 6 grupos: grupo fucose, grupo galactose/N-acetilgalactosamina, grupo N-acetilglicosamina, grupo manose, grupo ácido siálico e grupo glicanos complexos (Peumans e van Damme, 1998). Duas lectinas com diferentes propriedades de ligação a carboidratos foram isoladas da entrecasca de *Morus nigra* (Rougé *et al.*, 2003); morniga M e morniga G foram específicas para manose e galactose, respectivamente. Lectinas de entrecasca também têm sido inibidas com glicoproteínas, como é o caso da isolada de *H. brasiliensis* (Wititsuwannakul *et al.*, 1998) que foi inibida com fetuína. A interação de lectinas com glicopeptídeos (Zeng *et al.*, 2000) e glicoproteínas (Lima *et al.*, 1997) tem sido também identificada através de ensaio de difusão dupla em gel de agarose.

Outras maneiras de caracterizar as lectinas são pela determinação do ponto isoelétrico, eletroforese bidimensional, análise da composição de aminoácido, determinação do N-terminal, estudos de fluorescência, dicroísmo circular, avaliação de atividade mitogênica e estudos toxicológicos, dentre outros.

1.1.3. Propriedades Biológicas e Aplicações Biotecnológicas

A ligação de lectinas às células pode resultar em uma variedade de propriedades biológicas. Várias lectinas são tóxicas para células de mamíferos *in vitro* e *in vivo*; inibem o crescimento quando incorporadas na dieta e são tóxicas quando injetadas em animais. Por outro lado, devido apresentarem citotoxicidade (Reynoso-Camacho *et al.*, 2003), tem sido sugerido o uso de lectinas como uma alternativa no tratamento do câncer.

Outras propriedades biológicas detectadas foram: antifúngica, nas lectinas isoladas da orquídea *Gastrodia elata* (Liu *et al.*, 2002) e das sementes de *Talisia esculenta* (Freire *et al.*, 2002), antitumoral da lectina do cogumelo *Agrocybe aegerita* (Zhao *et al.*, 2003) e atividade mitogênica do gastrópodo *Belamyia bengalensis* (Banerjee *et al.*, 2004). Podemos encontrar, ainda, lectina com atividade aglutinante contra bactéria patogênica, como a encontrada em *Anguilla japonica* (Tasumia *et al.*, 2004).

Várias espécies de plantas têm sido descritas como tendo propriedade hipoglicêmica. Kavalali *et al.* (2003) determinaram que a lectina de sementes de *Urtica pilulifera* foi o princípio ativo responsável por atividade hipoglicemiante em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina. Preparações de folhas (Silva *et al.*, 2002; Yadav *et al.*, 2002; Seetharam *et al.*, 2002) e entrecascas (Rao *et al.*, 2001; Vats *et al.*, 2002) também têm sido avaliadas quanto aos seus efeitos hipoglicemiantes em ratos.

As lectinas são muito estáveis e constituem ferramentas poderosas em estudos citoquímicos e histoquímicos (Danguy *et al.*, 1998), fracionamento de células (Ohba *et al.*, 2002), como moléculas bioadesivas na entrega de drogas (Gabor *et al.*, 2001) e no estudo de oligossacarídeos e glicoconjugados (Matsui *et al.*, 2001; Helmholz *et al.*, 2003; Banerjee *et al.*, 2004).

Técnicas de separação por afinidade baseadas nas interações moleculares bioespecíficas de lectinas são utilizadas para o isolamento de valiosas macromoléculas biológicas (Helmholz *et al.*, 2003). Além disso, podem ser empregadas para analisar mudanças estruturais que ocorrem em oligossacarídeos presentes em glicoproteínas e glicolipídeos.

O desenvolvimento de um suporte de afinidade contendo lectina imobilizada é um pré-requisito crucial para o sucesso do isolamento do glicoconjugado (Helmholz *et al.*, 2003). Fazendo uso da habilidade das lectinas se ligarem especificamente a estruturas oligossacarídicas de glicoproteínas, a cromatografia de afinidade com lectinas imobilizadas facilita o isolamento específico de compostos alvos de uma mistura complexa; a vantagem desta técnica não é

apenas separar a proteína desejada, mas também preservar o padrão natural de glicosilação (Cartellieri *et al.*, 2002; Helmholz *et al.*, 2003).

A eficiência de um adsorvente de afinidade é dependente da densidade do ligante, a qual é, por sua vez, uma função do método e condições escolhidas para o processo de ativação e imobilização (Franco-Fraguas *et al.*, 2003). O adsorvente preparado é caracterizado de acordo com a sua especificidade, estabilidade e capacidade (Helmholz *et al.*, 2003). Condições cromatográficas tais como tamanho da amostra, velocidade do fluxo e comprimento da coluna são definidas visando o isolamento do glicoconjugado (Santori e Hubble, 2003).

As proteínas possuem um grande número de grupos reativos e podem ser imobilizadas sem a destruição de sua estrutura ou função. Dentre os suportes mais amplamente utilizados para imobilização de lectina está a Sepharose (Yoshida *et al.*, 1997), sendo os grupos amina das lectinas usados para sua imobilização. No método mais amplamente empregado, a imobilização de proteínas é feita por reação entre o grupo amina da lectina e o resíduo imidocarbonato da Sepharose ativada com brometo de cianogênio (CNBr).

A cromatografia de afinidade em colunas contendo lectinas imobilizadas tem sido amplamente utilizada no estudo de glicoproteínas humanas e de outras espécies animais. IgA de microorganismos tem sido purificada utilizando jacalina imobilizada em Sepharose (Fassina *et al.*, 2001). As glicoproteínas fetuina, de soro fetal bovino, e peroxidase, de rabanete, foram isoladas por cromatografia em colunas contendo WGA e Con A, respectivamente (Helmholz *et al.*, 2003). A lectina do cogumelo *Marasmeus oreades* imobilizada em Sepharose 4B ligou laminina de rato e tireoglobulina bovina, glicoproteínas que contêm o epítipo responsável por rejeição de transplantes em humanos (Loganathan *et al.*, 2003). A lectina de soja imobilizada (SBA-Sepharose) foi capaz de isolar o polissacarídeo de *Streptococcus pneumoniae* (Franco-Fraguas *et al.*, 2003).

1.2. *Crataeva tapia* L.

Crataeva tapia L. é uma planta da família Capparaceae, conhecida vulgarmente como trapiá (Figura 2). É encontrada de Pernambuco até São Paulo e Minas Gerais (Zona da Mata), na mata pluvial Atlântica e no Pantanal Matogrossense (Lorenzi, 1998). Em Pernambuco foi encontrada no litoral, na zona da mata e em vegetação de caatinga (Tabarelli *et al.*, 2002). É uma planta de 5-12 m de altura, dotada de copa arredondada e densa. Tronco geralmente tortuoso e mais ou menos cilíndrico, com casca rugosa, de 20-40 cm de diâmetro. Folhas compostas trifolioladas, folíolos membranáceos, glabros em ambas as faces. Flores apícolas e frutos com polpa carnosa, contendo muitas sementes. A madeira é empregada para obras internas em construção civil, para forros, caixotarias e construção de canoas. Os frutos, cascas e folhas são considerados de valor medicinal (Lorenzi, 1998). Vale ressaltar que a entrecasca do caule vem sendo amplamente utilizada pela população para diminuir o nível de glicose no sangue, ou seja, tem sido utilizada como hipoglicemiante.

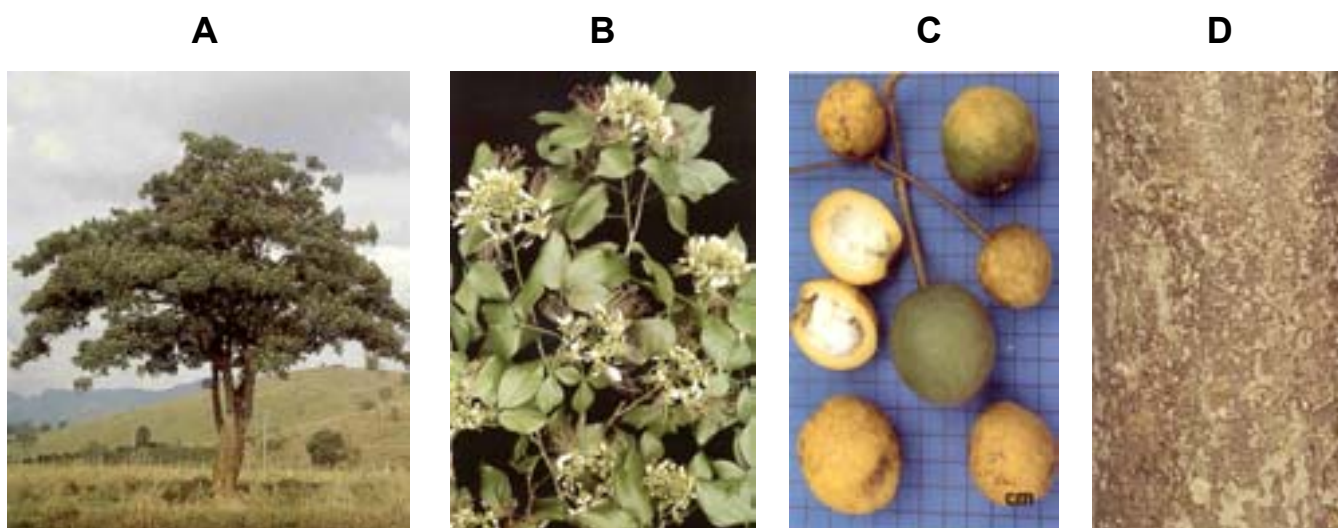


Figura 2 – Visão geral de *Crataeva tapia*: árvore (A), folhas e flores (B), frutos (C) e entrecasca (D).

2. RELEVÂNCIA DO TRABALHO

O Laboratório de Glicoproteínas do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco tem como propósito, desde 1983, a obtenção de um painel de lectinas puras e a investigação do potencial biotecnológico das proteínas obtidas.

A entrecasca do caule de *Crataeva tapia* L. vem sendo utilizada na medicina popular no tratamento de diabetes. Diante do uso contínuo pela população é de vital importância a investigação de constituintes protéicos com atividades biológicas, dentre eles, lectinas de entrecasca. Atividade hipoglicemiante já foi detectada em lectina (Kavalali *et al.*, 2003). O isolamento da lectina de entrecasca de *Crataeva* possibilita uma avaliação posterior da atividade hipoglicemiante.

Matrizes contendo lectinas imobilizadas são disponibilizadas comercialmente a elevados custos. A imobilização de lectina de *C. tapia* visando a purificação de glicoproteínas constitui uma avaliação do potencial biotecnológico da matriz lectina de *C. tapia* – Sepharose.

3.OBJETIVOS

3.1. Geral

Isolar, caracterizar parcialmente e imobilizar em Sepharose CL-4B a lectina de entrecasca de *Crataeva tapia* L..

3.2. Específicos

- Isolar a lectina de entrecasca de *C. tapia*;
- Determinar a atividade hemaglutinante com diferentes eritrócitos em preparações de entrecasca de *C. tapia*;
- Definir a especificidade de ligação da lectina;
- Avaliar o efeito da temperatura e íons na atividade hemaglutinante;
- Determinar as subunidades e a natureza da carga líquida da molécula;
- Determinar a massa molecular por gel filtração;
- Avaliar a natureza glicoprotéica da lectina através de eletroforese em gel de poliacrilamida e difusão em gel de agarose;
- Imobilizar lectina de *C. tapia* em Sepharose CL-4B;
- Purificar glicoproteínas usando imobilizado lectina *C. tapia* – Sepharose.

4.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BANERJEE, S.; CHAKI, S.; BHOWAL, J.; CHATTERJEE, B. P. Mucin binding mitogenic lectin from freshwater Indian gastropod *Belamya bengalensis*: purification and molecular characterization. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 421, p. 125-134, 2004.

BÖCKELMANN, U.; SZEWZYK, U.; GROHMANN, E. A new enzymatic method for the detachment of particle associated soil bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 55, p. 201-211, 2003.

CARTELLIERI, S.; HAMER, O.; HELMHOLZ, H.; NIEMEYER, B. One-step affinity purification of fetuin from fetal bovine serum. **Biotechnology Appl. Biochemistry**, v. 35, p. 83-89, 2002.

COELHO, L. C. B. B. & DA 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. 1-6, 2000.

COMINETTI, M. R.; MARQUES, M. R. F.; LORENZINI, D. .M.; LOFGREN, S. E.; DAFFRE, S.; BARRACCO, M. A. Characterization and partial purification of a lectin from the hemolymph of the white shrimp *Litopenaeus schmitti*. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 26, p. 715-721, 2002.

CORREIA, M. T. S. & COELHO, L. C. B. B. Purification of a glucose/mannose specific lectin isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart (Camaratu bean). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 55, p. 261-273, 1995.

DANGUY, A.; DECAESTECKER, C.; GENTEN, F.; SALMON, I.; KISS, R. Applications of lectins and neoglycoconjugates in histology and pathology. **Acta Anatomica**, v. 161, p. 206-218, 1998.

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

ELOFF, J. N. Antibacterial activity of Marula (*Sclerocarya birrea* (A. Rich.) Hochst. Subsp. Caffra (Sond.) Kokwaro) (Anacardiaceae) bark and leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, n. 3, p. 305-308, 2001.

FASSINA, G.; RUVO, M.; PALOMBO, G.; VERDOLIVA, A.; MARINO, M. Novel ligands for affinity-chromatografic purification of antibodies. **Journal Biochemical and Biophysical Methods**, v. 49, p. 481-490, 2001.

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

FREIRE, M. G. M.; GOMES, V. M.; CORSINI, R. E.; MACHADO, O. L. T.; DE SIMONE, S. G.; NOVELLO, J. C.; MARANGONI, S.; MACEDO, M. L. R. Isolation and partial characterization of a novel lectin from *Talisia esculenta* seeds that interferes with fungal growth. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, p. 61-68, 2002.

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.

GOLDSTEIN, I. J.; HUGHES, R. C.; MONSIGNY, M.; OSAWA, T.; SHARON, N. What should be called a lectin? **Nature**, v. 285, p.66, 1980.

GOLDSTEIN, J. I. Lectin Structure-Activity: The Story is Never Over. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 6583-6585, 2002.

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.

HONG, M.; CASSELY, A.; MECHREF, Y.; NOVOTNY, M. V. Sugar-lectin interactions investigated through affinity capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography B**, v. 752, p. 207-216, 2001.

HUANG, R. H.; XIANG, Y.; LIU, X. Z.; ZHANG, Y.; HU, Z.; WANG, D. C. Two novel antifungal peptides distinct with a five-disulfide motif from the bark of *Eucommia ulmoides* Oliv. **FEBS Letters**, v. 521, p. 87-90, 2002.

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.

KAVALALI, G.; TUNCEL, H.; GÖKSEL, S.; HATEMI, H. H. Hypoglycemic activity of *Urtica pilulifera* in streptozotocin-diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 84, p. 241-245, 2003.

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

KENNEDY, J. F., PAIVA, P. M. G.; CORREIA, M. T. S.; CAVALCANTI, M. S. A.; COELHO, L. C. B. B. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 26, p. 219-230, 1995.

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

LIMA, V. L. M.; CORREIA, M. T. S.; CECHINEL, Y. M. N.; SAMPAIO, C. A. M.; OWEN, J. S.; COELHO, L. C. B. B. Immobilized *Cratylia mollis* lectin as a potential matrix to isolate plasma glycoproteins, including lecithin-cholesterol acyltransferase. **Carbohydrate polymers**, v. 31, n. 892, p. 27-32, 1997.

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

LOGANATHAN D.; WINTER H. C.; JUDD W. J.; PETRYNIAK J.; GOLDSTEIN I. J. Immobilized *Marasmius oreades* agglutinin: use for binding and isolation of glycoproteins containing the xenotransplantation or human type B epitopes. **Glycobiology**, v. 13, p.955-960, 2003.

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

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

MATSUI, T.; HAMAKO, J.; OZEKI, Y.; TITANI, K. Comparative study of blood group-recognizing lectins toward ABO blood group antigens on neoglycoproteins, glycoproteins and complex-type oligossaccharides. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1525, p. 50-57, 2001.

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

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

NAKAMURA S.; IKEGAMI A.; MATSUMURA Y.; NAKANISHI T.; NOMURA K. molecular cloning and expression of the mannose/glucose specific lectin from *Castanea crenata* cotyledons. **Journal Biochemistry**, v. 131, p. 241-246, 2002.

OHBA, H.; BAKALOVA, R.; MORIWAKI, S.; NAKAMURA, O. Fractionation of normal and leukemic T-cells by lectin-affinity column chromatography. **Cancers Letters**, v. 184, p. 207-214, 2002.

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

PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. B. B. Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* Mart (camaratu bean). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 36, p. 113-118, 1992.

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

PEUMANS, W. J.; ROY, S.; BARRE, A.; ROUGÉ, P.; VAN LEUVEN, F. & VAN DAMME, E. J. M. Elderberry (*Sambucus nigra*) contains truncated Neu5Ac(α -2,6)-Gal/GalNAc-binding type-2 ribosome-inactivating proteins. **FEBS Letters**, v. 425, p. 35-39, 1998.

RAO, B. K.; GIRI, R.; KESAVULU, M. M.; CHT. APPARAO. Effect of oral administration of bark extracts of *Pterocarpus santanilus* L. On blood glucose level in experimental animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74, p. 69-74, 2001.

REYNOSO-CAMACHO, R.; DE MEJIA, G. E.; LOARCA-PINA, G. Purification and acute toxicity of a lectin extracted from tepary bean (*Phaseolus acutifolius*). **Food and Chemical Toxicity**, v. 41, p. 21-27, 2003.

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

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

ROUGÉ, P.; PEIMANS, W. J.; BARRE, A.; VAN DAMME, E. J. M. A structural basis for the difference in specificity between the two jacalin-related lectins from mulberry (*Morus nigra*) bark. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 304, p. 91-97, 2003.

RUDIGER, H. Plant lectins-more than just tools for glycoscientists occurrence, structure, and possible functions of plant lectins. **Acta Anatomica (Basel)**, v. 161, p. 130-152, 1998.

SANTORI F.; HUBBLE J. Isocratic separation of monosacharides using immobilized Concanavalin A. **Journal Chromatography A**, v. 1003, p. 123-126, 2003.

SEETHARAM, Y. N.; CHALAGERI, G.; SETTY, S. R.; BHEEMACHAR. Hypoglycemic activity of *Abutilon indicum* leaf extracts in rats. **Fitoterapia**, v. 73, p. 156-159, 2002.

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

SHARON, N.; LIS, H. How Proteins Bind Carbohydrates: Lessons from Legume Lectins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 6586-6591, 2002.

SILVA, F.R.; SZPOGANICZ, B.; PIZZOLATTI, M. G.; WILLRICH, M. A.; DE SOUSA, E. Acute effect of *Bauhinia forficata* on serum glucose levels in normal and alloxan-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 83, p. 33-37, 2002.

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

SUROLIA, A.; SHARON, N.; SCHWARZ, F. P. Thermodynamics of monosacharide and disacharide binding to *Erythrina corallodendron* lectin. **Journal Biological Chemistry**, v.271, p. 17697-17703, 1996.

SUSEELAN, K. N.; MITRA, R.; PANDEY, R.; SAINIS, K. B.; KRISHNA, T. G. Purification and characterization of a lectin from wild sunflower (*Helianthus tuberosus* L.) tubers. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 407, p. 241-247, 2002.

TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. (orgs.) Diagnóstico da Biodiversidade de Pernambuco. Apresentação Cláudio Marinho. **Recife: Secretaria de Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente**, 2v., Editora Massangana, 2002.

TASUMIA, S.; YANGH, W.; USAMIA, T.; TSUTSUIA, S.; OHIRAC, T.; KAWAZOEC, I.; WILDERB, M. N.; AIDAC, K.; SUZUKIA, Y. Characteristics and primary structure of a galectin in the skin mucus of the Japanese eel, *Anguilla japonica*. **Developmental & Comparative Immunology**, p. 325-335, 2004.

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

VAN DAMME, E. J. M.; BARRE, A.; BEMER, V.; ROUGÉ, P.; VAN LEUVEN, F.; PEUMANS, W. J. A lectin and a lectin-related protein are the two most prominent proteins in the bark of yellow wood (*Cladrastis lutea*). **Plant Molecular Biology**, v. 29, p. 579-598, 1995.

VAN DAMME, E. J. M.; BARRE, A.; V.; ROUGÉ, P.; VAN LEUVEN, F.; PEUMANS, W. J. The neuAc(α -2,6)-Gal/GalNAc-binding lectin from elderberry (*Sambucus nigra*) bark, a type-2 ribosome-inactivating protein with an unusual

specificity and structure. **European Journal Biochemistry**, v. 235, p. 128-137, 1996.

VAN DAMME, E. J.M.; VAN LEUVEN, F.; PEUMANS, W. J. Isolation , characterization and molecular cloning of the bark lectins from *Maackia amurensis*. **Glycoconjugate Journal**, v.14, p. 449-456, 1997a.

VAN DAMME, E. J. M.; BARRE, A.; BEMER, V.; ROUGÉ, P.; PEUMANS, W. J. Molecular cloning of the bark and seed lectins from the Japanese pagoda tree (*Sophora japonica*). **Plant Molecular Biology**, v. 33, p. 523-536, 1997b.

VAN DAMME, E. J. M.; HAUSE, B.; HU, J.; BARRE, A.; ROUGÉ, P.; PROOST, P.; PEUMANS, W. J. Two distinct jacalin-related lectins with a different specificity and subcellular location are major vegetative storage proteins in the bark of the black mulberry tree. **Plant Physiology**, v. 130, p. 757-769, 2002.

VATS, V.; GROVER, J. K.; RATHI, S. S. Evaluation of anti-hyperglycemic and hypoglycemic effect of *Trigonella foenum-graecum* Linn, *Ocimum sanctum* Linn and *Pterocarpus marsupium* Linn in normal and alloxanized diabetic rats. **Ethnopharmacology**, v. 79, p. 95-100, 2002.

ZENG, X.; NAKAOKI, Y.; MURATA, T.; USUI, T. Chemoenzymatic synthesis of glycopolypeptides carrying α -Neu5Ac-(2 $\rightarrow$ 3)- β -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 3)- α -D-GalNAc, β -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 3)- α -D-GalNAc, and related compounds and analysis of their specific interactions with lectins. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 383, p. 28-37, 2000.

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

ZOCCATELLI, G.; PELLEGRINA, C. D.; VINCENZI, S.; RIZZI, C.; CHIGNOLA, R.; PERUFFO, A. D. B. Egg-matrix for large-scale single-step affinity purification of plant lectins with different carbohydrate specificities. **Protein Expression and Purification**, v. 27, p. 182-185, 2003.

WEIS, W. I.; DRICKAMER, K. Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. **Annual Reviews Biochemistry**, v.65, p.441-473, 1996.

WITITSUWANNAKUL, R.; WITITSUWANNAKUL, D.; SAKULBORIRUG, C. A. Lectin from the bark of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*). **Phytochemistry**, v. 47, n. 2, p. 183-187, 1998.

YADAV, S.; VATS, V.; DHUNNOO, Y.; GROVER, J. Hypoglycemic and antihyperglycemic activity of *Murraya koenigii* leaves in diabetic rats. **Journal Ethnopharmacology**, v. 82, p. 111-116, 2002.

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.

YOSHIDA, K. et al. Serial lectin affinity chromatography with Concanavalin A and wheat germ agglutinin demonstrates altered asparagine-linked sugar-chain structures of prostatic acid phosphatase in human prostate carcinoma. **Journal Chromatography B**, v. 695, p. 439-443, 1997.

5. ARTIGO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO BIOTECHNOLOGY PROGRESS

**PURIFICATION IN MILLIGRAM QUANTITIES OF *Crataeva tapia* BARK LECTIN
AND ITS USE AS BIOSPECIFIC ADSORBENT FOR GLYCOPROTEIN
ISOLATION**

Purification in milligram quantities of *Crataeva tapia* bark lectin and its use as biospecific adsorbent for glycoprotein isolation

Araújo, R.M.S.; Correia, M.T.S; Coelho, L.C.B.B. and Paiva, P.M.G.¹

Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Moraes Rego, S/N, Cidade Universitária, Recife-PE, 50670-420, Brazil.

¹ Corresponding author. Tel.-fax: + 55-081-32718354; E-mail address: pmgpaiva@bol.com.br

Abstract

A lectin from *Crataeva tapia* bark, CrataBL, was purified to electrophoretic homogeneity by ammonium sulphate fractionation and affinity or ion exchange chromatography. CrataBL activity was obtained with human, chicken and rabbit erythrocytes, which was mainly inhibited by glycoproteins. CrataBL was thermostable and EDTA treatment did not affect the HA; activity did not change after Ca^{2+} , Mg^{2+} and Mn^{2+} addition. CrataBL migrated as a single band after electrophoresis to native basic proteins and two polypeptide bands of molecular mass 21,000 Da and 40,000 Da after SDS-PAGE with or without reducing agent; the polypeptides were also detected on gel using glycoprotein reagent. Glycoprotein nature of CrataBL was also revealed by its interaction with glucose/mannose lectin upon agarose gel. The lectin molecular mass by gel filtration chromatography was 52,000 Da. CrataBL immobilized on Sepharose 4B bioselectively adsorbed and purified casein, fetuin and ovalbumin.

Key words: Bark lectin; Crataeva tapia; lectin immobilization; glycoprotein isolation.

1. Introduction

Plant lectin comprises a structurally versatile group of proteins and interaction with carbohydrates of the cell surface promotes hemagglutination (1). The carbohydrate binding specificity makes lectins potential tools as bioselective ligand to isolate glycoprotein (2,3).

Legume seeds have been the main source of plant lectins, but its presence was also detected in other tissues such as tuber (4) and bark. From the later tissue lectins were isolated from species belonging to different families including Moraceae, genus *Morus* (5), Leguminosae, genus *Maackia* (6), *Cladrastis* (7), *Robinia* (8), *Sophora* (9), *Laburnum* (10), Euphorbiaceae, genus *Hevea* (11) and Caprifoliaceae family, genus *Sambucus* (12).

Most of bark lectins did not human blood group specific, were inhibited by glycoproteins, had multiple subunits and were thermostable, remaining active at high temperatures (6, 7, 8, 9, 11, 12, 13). Evaluation of bark lectin biological properties revealed the ineffective action of *Sambucus nigra* lectin upon tobacco-mosaic virus translation (13) and mitogenic activity of *M. amurensis* lectin (6).

Around the world, bark extracts have been used in popular medicine as therapeutic agents in human affections. Hypoglycemic (14), antifungal (15) as well as antibacterial (16) effects of bark extracts were already demonstrated. In Northeast Brazil *Crataeva tapia* bark infusion has been used to control blood glycemic level. This work describes the purification and partial characterization of *C. tapia* bark lectin, CrataBL. The lectin was immobilized on Sepharose 4B and the affinity matrix CrataBL-Sepharose 4B was analyzed for casein, fetuin and

ovalbumin binding. This is the first report of bark lectin purification from the Capparaceae family.

2. Methods

2.1. Lectin purification

C. tapia bark was collected in the State of Pernambuco, Northeast Brazil, and the powder (10 g) obtained by trituration was added to 0.15 M NaCl (100 ml). The mixture was left under agitation for 16 h at 4°C. After, filtration on gaze and centrifugation (4,000 x g for 15 min) were performed. The supernatant (crude extract) was fractionated with ammonium sulphate and the 30-60% fraction (11 mg of protein), containing lectin activity dialyzed against 0.15 M NaCl was applied to column (4.4 x 1.2 cm) of cross-linking refined gum guar (17) equilibrated with 0.15 M NaCl and CM-Cellulose (Sigma, USA) column (5.2 x 1.6 cm) equilibrated with 10 mM citrate-phosphate buffer, pH 5.5. The columns (flow rate of 20 ml/h) were washed with the respective equilibration solutions until A₂₈₀ nm < 0.05. CrataBL was eluted from guar gel and CM-Cellulose columns with 1 M NaCl and 0.5 M NaCl, respectively. Guar gel column was also irrigated with 0.2 M galactose. The protein measurement of eluted fractions was performed according to Lowry *et al.* (18) using bovine serum albumin (0 a 500 µg ml⁻¹) as standard.

2.2. Hemagglutinating activity and effect of ions, temperature and inhibitors on activity.

Hemagglutinating activity (HA) of CrataBL preparations was evaluated according to Paiva and Coelho (19) using glutaraldehyde (Merck, Germany)

treated chicken, rabbit and human (A, B, AB and O) erythrocytes. Assays were performed on microtiter plates (Kartell S.P.A., Italy) and the evaluated preparations (50 μ l) were serially two-fold diluted in 0.15 M NaCl before addition of 2.5% (v/v) suspension of erythrocytes (50 μ l). The HA (titer) was defined as the lower sample concentration which showed hemagglutination. Specific HA (SHA) means titer divided by protein (mg/ml). Inhibition of HA was performed by incubation (45 min) of lectin with monosaccharides and glycoproteins before erythrocyte addition. To evaluate the effect of ions on HA, CrataBL was previously dialyzed against 5 mM EDTA by 16 h at 4° C followed by 0.15 M NaCl (6 h) to eliminate EDTA. Then a 50 μ l aliquot of dialyzed CrataBL was serially diluted with 0.15 M NaCl containing 5 mM Ca^{2+} , Mg^{2+} or Mn^{2+} before erythrocyte addition. For temperature effect on HA, CrataBL was heated (30, 40, 50, 60 and 100°C, 30 min) before HA assay.

2.3. Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)

Electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulphate (SDS-PAGE) was performed on 10% (w/v) gel according to Laemmli (20). Polypeptide bands of CrataBL (50 μ g of protein) and standards (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, α -lactalbumin, 14,200 Da from Sigma, USA) were stained with Coomassie Brilliant Blue (20). Glycoprotein staining (21) was performed with Schiff's reagent (Merck, Germany). PAGE for native basic (7.5% (w/v) gel) and acidic (12% (w/v)

gel) proteins were made according to Reisfeld *et al.* (22) and Davis (23), respectively.

2.4 Gel filtration chromatography

CrataBL was chromatographed on gel filtration Hiprep 16/60 Sephacryl S-300 column (16 mm x 60 cm)/Äkta FPLC system (Amersham Pharmacia Biotech, Sweden) pre-equilibrated at 24°C with 0.5 M NaCl. Samples (2.0 ml; 4 mg of protein) were injected and eluted (3.0 ml fraction) with the same solution at a flow rate of 0.5 ml min⁻¹. The standards (Sigma, USA) similarly chromatographed were bovine serum albumin (66,000 Da), fetuin (64,000 Da), ovalbumin (45,000 Da) and trypsin inhibitor type III-O chicken (28,000 Da).

2.5. Gel diffusion

Gel diffusion assay was performed according to Ashford *et al.* (24). The central well was charged with glucose/mannose specific isolectins 1,4 (15 µg) from *Cratylia mollis* (25); sample wells were filled with 100 µg of bark extract, 100 µg of 30-60% fraction and 26 µg of CrataBL. Samples were allowed to diffuse in agarose (Inlab, Brazil) gel (1% in 0.15 M NaCl) in a humid chamber at 4°C; after 24 h the gel was exhaustively washed and stained with Coomassie Brilliant Blue (0.4% (w/v) in 25% (v/v) ethanol and 8% (v/v) acetic acid) for 15 min.

2.6. CrataBL immobilization on Sepharose 4B

Cyanogen bromide-activated Sepharose 4B (Pharmacia, Sweden) was used for CrataBL immobilization according to Paiva *et al.* (3). CNBr-activated Sepharose 4B (3 g) was washed with 0.5 M NaCl, pH 2.5, followed by 0.1 M NaHCO₃/0.5 M NaCl, pH 8.2. Then, incubation (24 h, 4°C) was performed with CrataBL (10 mg of protein). After filtration and washing with the NaHCO₃ solution the matrix CrataBL-Sepharose 4B was washed with 0.1 M NaHCO₃/0.5 M NaCl, pH 8.2 followed by 0.1 M sodium acetate/0.5 M NaCl, pH 4.0 and distilled water. Protein concentration was determined (18-Lowry) in the preparations obtained after filtration and wash; for quantification of CrataBL immobilized, the values were compared to total protein used to immobilization.

2.7. Evaluation of glycoprotein binding on CrataBL-Sepharose 4B

Casein (Inlab, Brazil), fetuin and ovalbumin (Sigma, USA) glycoproteins (1 mg) were chromatographed on CrataBL-Sepharose 4B column (2.3 x 1.2 cm) equilibrated (flow rate of 10 ml/h) with 10 mM citrate-phosphate buffer, pH 5.5. The lectin affinity support was then washed with the same buffer until A_{280 nm} < 0.05 and bound proteins were eluted with the buffer containing 1 M NaCl. The procedure for each glycoprotein was performed three times.

3. Results and discussion

C. tapia bark infusion is broadly used as hypoglycemic agent in popular medicine. The interest in *C. tapia* bark as a lectin source started with detection of HA in bark extract (Table 1) and inhibition of this activity with carbohydrates and

glycoproteins (data not showed). Inhibition of HA determined the lectin nature of hemagglutination; bark is generally rich in phenolic compounds (8, 11) that can promote erythrocytes dispersion and thus false hemagglutination (11).

The initial step of ammonium sulphate fractionation resulted in a 30-60% fraction (Table 1); this step was important to concentrate the lectin.

Isolation by affinity chromatography using a galactose derived matrix (guar gel) yielded a CrataBL preparation eluted with 1 M NaCl of high SHA (561) and low protein concentration (0.5 mg). Attempts to remove bound CrataBL with galactose (0.2 M) did not elute the lectin. Similarly, mannose/glucose lectin from *Sophora japonica* remained bound to mannose-Sepharose 4B column after 0.1 M mannose elution (9). Bark lectin tightly bound to affinity matrix was eluted by altering pH to 11 (8).

CrataBL was also obtained through ammonium sulphate fraction chromatography of 30-60% on CM-Cellulose; the lectin was separated from unadsorbed contaminants as a single 0.5 M NaCl peak (Figure 1). This protocol also contains a single chromatographic step but provided CrataBL in milligram quantities (Table 1). Additionally, it was a cheap procedure with a short execution time.

Characterization of CrataBL activity revealed the lectin similarly recognizing human, chicken and rabbit erythrocytes (SHA of 102), thermostable at 40 to 60°C (SHA of 51) and inactive at 100°C. CrataBL HA was not affected after dialysis against EDTA and ions addition. Detection of HA after EDTA treatment was

speculated as not dependence of ion or that quelant agent was not efficient to ion elimination because its tight binding to the lectin (26).

CrataBL activity was inhibited by monosaccharides and glycoproteins but only fetuin abolished its HA (Table 2). Bark lectin inhibition with monosaccharide, glycoproteins or both were previously reported (6, 8, 11). The inhibition of *Morus nigra* bark lectin by galactose, mannose as well as glucose was justified by extended size of carbohydrate-binding site (5).

CrataBL CM-Cellulose or affinity obtained showed the same electrophoretic pattern; on native PAGE for basic protein gave a single protein band (Figure 2A) and no protein was detected on native PAGE for acidic protein. Although isolectins are common in bark (6, 7, 8, 9), the electrophoretic pattern indicated that CrataBL purification methods resulted in a unique protein. The detection of only one peak with HA in the chromatographic profile of CM-Cellulose column corroborate with this. Native PAGE and ion-exchange chromatography has been tools to isolectin identification (4, 8) detecting differences in protein structure.

CrataBL on SDS-PAGE revealed of two polypeptide bands of molecular mass 21,000 Da and 40,000 Da (Figure 2B); the same pattern was obtained with or without reducing agent β -mercaptoethanol. Glycoprotein staining on SDS-PAGE showed that the 21,000 Da polypeptide band was more strongly stained than 40,000 Da band revealing different glycosylation pattern. Similarly to CrataBL, bark lectin constituted of arrangements of subunits that differ in glycoprotein nature has been already found (7). Characterization of glycan chains of bark lectins showed mannose as a very common monosaccharide (8, 12); interaction of CrataBL with

glucose/mannose isolectins from *C. mollis* upon agarose gel (Figure 3) suggest that the carbohydrate moiety of CrataBL contains the mentioned carbohydrate residues. Similarly, binding of *Erythrina speciosa* seed lectin to glucose/mannose lectin from *Canavalia ensiformis* confirmed its glycoprotein nature and indicated of mannose presence in glycan chain (27).

Chromatographic profile of gel filtration revealed one protein peak of 52,000 Da (Figure 4) indicating that CrataBL is a dimer constituted of 21,000 Da and 40,000 Da subunits similar to other bark lectins that constitute a mixture of multiple polypeptides (6, 7, 8, 9). The difference in molecular mass obtained by SDS-PAGE and gel filtration is probably due to the glycoprotein nature of subunits (28).

CrataBL was effectively immobilized to Sepharose 4B (9.4 mg) corresponding to 94% of initial protein. Glycoproteins that inhibits CrataBL similarly bound (0.52 mg) to CrataBL-Sepharose 4B and were eluted with 1.0 M NaCl. Immobilized CrataBL thus could be applied to the fractionation and purification of glycoproteins.

4. Conclusion

CrataBL isolated from bark of Capparaceae family resembles to bark lectins from other botanical families. The lectin maintains the glycoprotein binding capacity after immobilization on Sepharose 4B. The results revealed thus a practical utilization of CrataBL. The facility to obtain highly pure CrataBL in milligram quantities stimulates its use as a biotechnological tool. Hypoglycemic propertie was already detected in lectin (29); evaluation of CrataBL hypoglycemic activity is in progress.

Acknowledgements

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

References

1. Kennedy, J. F., Paiva, P. M. G.; Correia, M. T. S.; Cavalcanti, M. S. A.; Coelho, L. C. B. B. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. *Carbohydrate Polymers*, **1995**, 26, 219-230.
2. 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*, **2003**, 1006, 127-135.
3. Paiva, P. M. G.; Souza, A. F.; Oliva, M. L. V.; Kennedy, J. F.; Cavalcanti, M. S. M.; Coelho, L. C. B. B.; Sampaio, C. A. M. Isolation of a trypsin inhibitor from *Echinodorus paniculatus* seeds by affinity chromatography on immobilized *Cratylia mollis* isolectins. *Biores. Technol.* **2003**, 88, 75-79.
4. Suseelan, K. N.; Mitra, R.; Pandey, R.; Sainis, K. B.; Krishna, T. G. Purification and characterization of a lectin from wild sunflower (*Helianthus tuberosus* L.) tubers. *Arch. Biochem. Biophys.* **2002**, 407, 241-247.
5. Rougé, P.; Peumans, W. J.; Barre, A.; van Damme, E. J. A structural basis for the difference in specificity between the two jacalin-related lectins from mulberry (*Morus nigra*) bark. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, 304, 91-97.
6. van Damme, E. J. M.; van Leuven, F.; Peumans, W. J. Isolation, characterization and molecular cloning of the bark lectins from *Maackia amurensis*. *Glycoconjugate J.* **1997**, 14, 449-56.
7. van Damme, E. J. M.; Barre, A.; Bemmer, V.; Rougé, P.; van Leuven, F.; Peumans, W. J. A lectin and a lectin-related protein are the two most

prominent proteins in the bark of yellow wood (*Cladrastis lutea*). Plant Mol. Biol. **1995**, 29, 579-98.

8. van Damme, E. J. M.; Barre, A.; Smeets, K.; Torrekens, S.; van Leuven, F.; Rougé, P.; Peumans, W. J. The bark of *Robinia pseudoacacia* contains a complex mixture of lectins. Plant Physiol. **1995**, 107, 833-843.
9. van Damme, E. J. M.; Barre, A.; Rougé, P.; Peumans, W. J. Molecular cloning of the bark and seed lectins from the japanese pagoda tree (*Sophora japonica*). Plant Mol. Biol. **1997**, 33, 523-536.
10. Lutsik, M. D.; Antoniuk, V. A. New fucose-specific lectin from the bark of dwarf almond golden rain *Laburnum anagyroides* Medik: purification, properties and immunochemical specificity. Biokhimiia **1982**, 47, 1710-1715.
11. Wititsuwannakul, R.; Wititsuwannakul, D.; Sakulborirug, C. A lectin from the bark of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*). Phytochemistry **1998**, 47, 183-187.
12. Nsimba-Lubaki, M.; Peumans, W. J.; Allen, A. K. Isolation and characterization of glycoprotein lectins from the bark of three species of elder, *Sambucus ebulus*, *S. nigra* and *S. racemosa*. Planta **1986**, 168, 113-118.
13. Broekaert, W. F.; Nsimba-Lubaki, M.; Peeters, B.; Peumans, W. J. A lectin from elder (*Sambucus nigra* L.) bark. Biochem. J., **1984**, 221, 163-169.
14. Vats, V.; Grover, J. K.; Rathi, S. S. Evaluation of anti-hyperglycemic and hypoglycemic effect of *Trigonella foenum-graecum* Linn, *Ocimum sanctum*

- Linn and *Pterocarpus marsupium* Linn in normal and alloxanized diabetic rats. J. Ethnopharmacol. **2002**, 79, 95-100.
15. Huang, R. H.; Xiang, Y.; Liu, X. Z.; Zhang, Y.; Hu, Z.; Wang, D. C. The novel antifungal peptides distinct with a five-disulfide motif from the bark of *Eucommia ulmoides* Oliv. FEBS Lett. **2002**, 521, 87-90.
16. Eloff, J. N. Antibacterial activity of marula (*Sclerocarya birrea* (A. rich.) Hochst. Subsp. Caffra (sond.) Kokwaro) (Anacardiaceae) bark and leaves. J. Ethnopharmacol. **2001**, 76, 305-308.
17. Gupta, K. C.; Sahni, M. K.; Rathaur, B. S.; Narang, C. K.; Mathur, N. K. Gel filtration medium derived from guar gum. Chromatogr. **1978**, 11, 428.
18. Lowry, O. H.; Rosebrought, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. **1951**, 193, 265-275.
19. Paiva, P. M. G.; Coelho, L. C. B. B. Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* Mart (camaratu bean). App. Biochem. Biotech. **1992**, 36, 113-118.
20. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **1970**, 227, 680-685.
21. Pharmacia Fine Chemicals. Polyacrylamide Electrophoresis; Laboratory Techniques. Pharmacia, Uppsala **1980**.
22. Reisfeld, R. A.; Lewis, U. J.; Williams, D. E. Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. Nature, **1962**, 195, 281-283.

23. Davis, B. J. Disc electrophoresis II: method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1964**, 121, 404-427.
24. Ashford, D.; Allen, K.; Neuberger, A. The production and properties of an antiserum to potato (*Solanum tuberosum*) lectin. *Biochem. J.*, **1982**, 201, 641-645.
25. Correia, M. T. S.; Coelho, L. C. B. B. Purification of a glucose/mannose specific lectin, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu bean). *App. Biochem. Biotech.*, **1995**, 55, 261-273.
26. Oliveira, J. T. A.; Melo, V. M. M.; Câmara, M. F. L.; Vasconcelos, I. M.; Beltramini, L. M.; Machado, O. L. T.; Gomes, V. M.; Pereira, S. P.; Fernandes, C. F.; Nunes, E. P.; Capistrano, G. G. G.; Monteiro-Moreira, A. C. O. Purification and physicochemical characterization of a cotyledonary lectin from *Luetzelburgia auriculata*. *Phytochemistry* **2002**, 61, 301-310.
27. Konozy, E. H. E.; Bernardes, E. S.; Rosa, C.; Faca, V.; Greene, L. J.; ward, R. J. Isolation, purification, and physicochemical characterization of a D-galactose-binding lectin from seeds of *Erythrina speciosa*. *Arch. Biochem. Biophys.* **2003**, 410, 222-229.
28. Puri, K. D.; Surolia, A. Amino acid sequence of the winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus*) basic lectin. *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 30917-30926.
29. Kavali, G.; Tuncel, H.; Goksel, S.; Hatemi, H. H. Hypoglycemic activity of *Urtica pilulifera* in streptozotocin-diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* **2003**, 84, 241-245.

FIGURE CAPTIONS

Figure 1. CrataBL isolation by ion exchange chromatography.

Sample of 30-60% ammonium sulphate fraction (11 mg of protein) was applied to the column; arrows demonstrate eluents added. Fractions of 2.0 ml were collected. A 280 nm (●), HA (○). Each bar represents the mean $\pm$ S.D. of four experiments.

Figure 2. Electrophoretic patterns of CrataBL.

(1) CrataBL (50 μ g), (2) cytochrome C (10 μ g) and (3) molecular mass standards containing 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) were applied. Native-polyacrylamide gel was stained with amido black (A); SDS-polyacrylamide gel was stained with Coomassie Brilliant Blue (B) and Schiff's reagent (C).

Figure 3. Diffusion in agarose gel.

C. tapia lectin preparations were allowed to diffuse in agarose gel against isolectins 1,4 (15 μ g) from *C. mollis* (A). The precipitation lines were stained with Coomassie Brilliant Blue. Wells: 1- Bark extract (100 μ g); 2- 30-60% fraction (100 μ g) and 3- CrataBL (26 μ g).

Figure 4. Gel filtration on Sephacryl S-300.

Sample (2 ml; 4 mg) of CrataBL was applied on Sephacryl S-300 (16 mm x 60 cm).

Fractions of 3.0 ml were collected at 0.5 ml/min.

Table 1. Summary of CrataBL purification.

Preparation	Total protein (mg)	Total HA	SHA	Purification (fold)	Yield (%)
Bark extract	473	40,960	87	1	100
30-60% fraction	310	29,696	96	1.1	72
CrataBL ion exchange isolated	10	1,024	102	1.2	100

The protein was measured according to Lowry *et al.* (18). Hemagglutinating activity (HA) was made with 2.5% (v/v) suspension of glutaraldehyde treated rabbit erythrocytes. SHA, specific HA (titer/protein). Yield was expressed as percentage of total HA isolated.

Table 2. Inhibition of CrataBL preparation activity with monosaccharides and glycoproteins

Inhibitor	SHA
Carbohydrate (100 mM)	
N-acetylglucosamine	25.6
Galactose	51.2
Glucose	25.6
Fructose	51.2
Mannose	25.6
Glycoproteins (500 µg/ml)	
Casein	3.2
Fetuin	0
Ovalbumin	25.6

Hemagglutinating activity (HA) was performed with 2.5% (v/v) suspension of glutaraldehyde treated rabbit erythrocytes. SHA, specific HA (titer/protein), in 0.15 M NaCl was 102. 1-O-Methyl- α -D-glucopyranoside did not inhibit CrataBL activity.

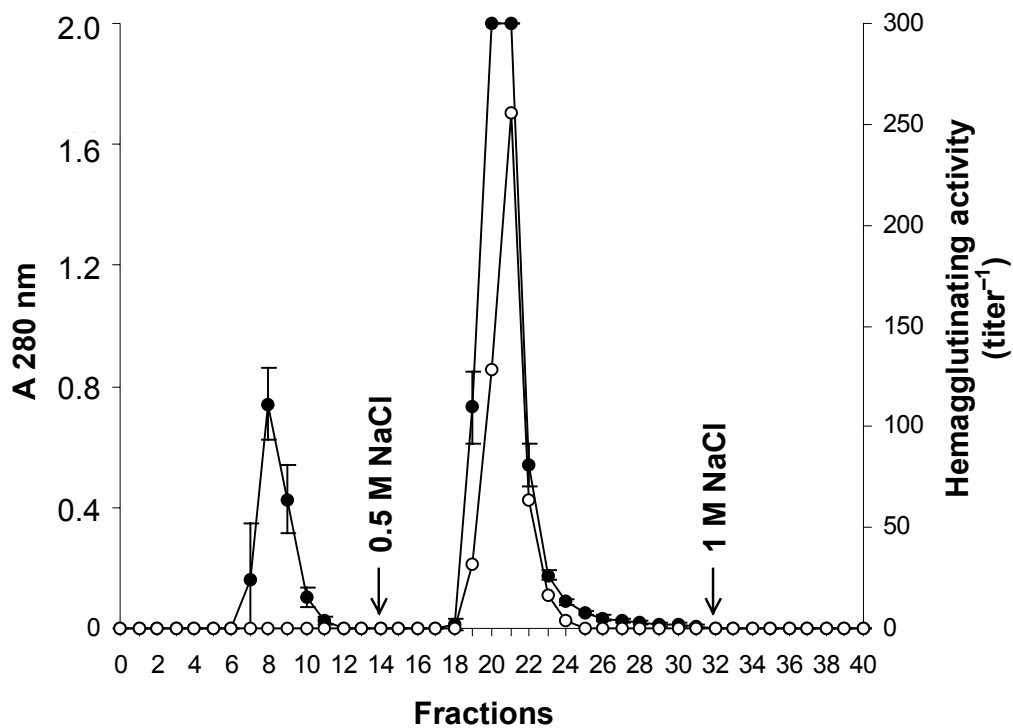


Figure 1. CrataBL isolation by ion exchange chromatography.

Sample of 30-60% ammonium sulphate fraction (11 mg of protein) was applied to the column; arrows demonstrate eluents added. Fractions of 2.0 ml were collected. A 280 nm (●), HA (○). Each bar represents the mean $\pm$ S.D. of four experiments.

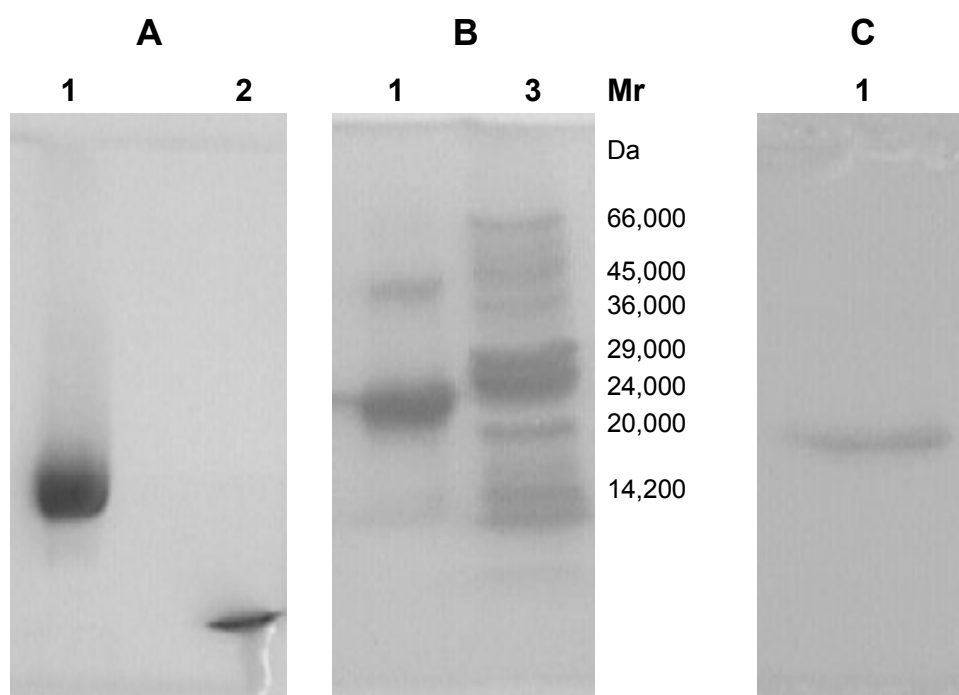


Figure 2. Electrophoretic patterns of CrataBL.

(1) CrataBL (50 μ g), (2) cytochrome C (10 μ g) and (3) molecular mass standards containing 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) were applied. Native-polyacrylamide gel was stained with amido black (A); SDS-polyacrylamide gel was stained with Coomassie Brilliant Blue (B) and Schiff's reagent (C).

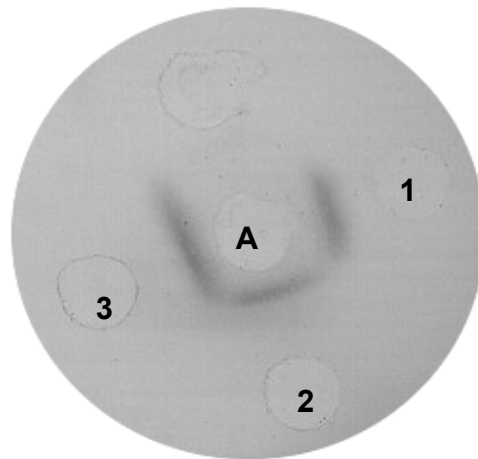


Figure 3. Diffusion in agarose gel.

C. tapia lectin preparations were allowed to diffuse in agarose gel against isolectins 1,4 (15 μ g) from *C. mollis* (A). The precipitation lines were stained with Coomassie Brilliant Blue. Wells: 1- Bark extract (100 μ g); 2- 30-60% fraction (100 μ g) and 3- CrataBL (26 μ g).

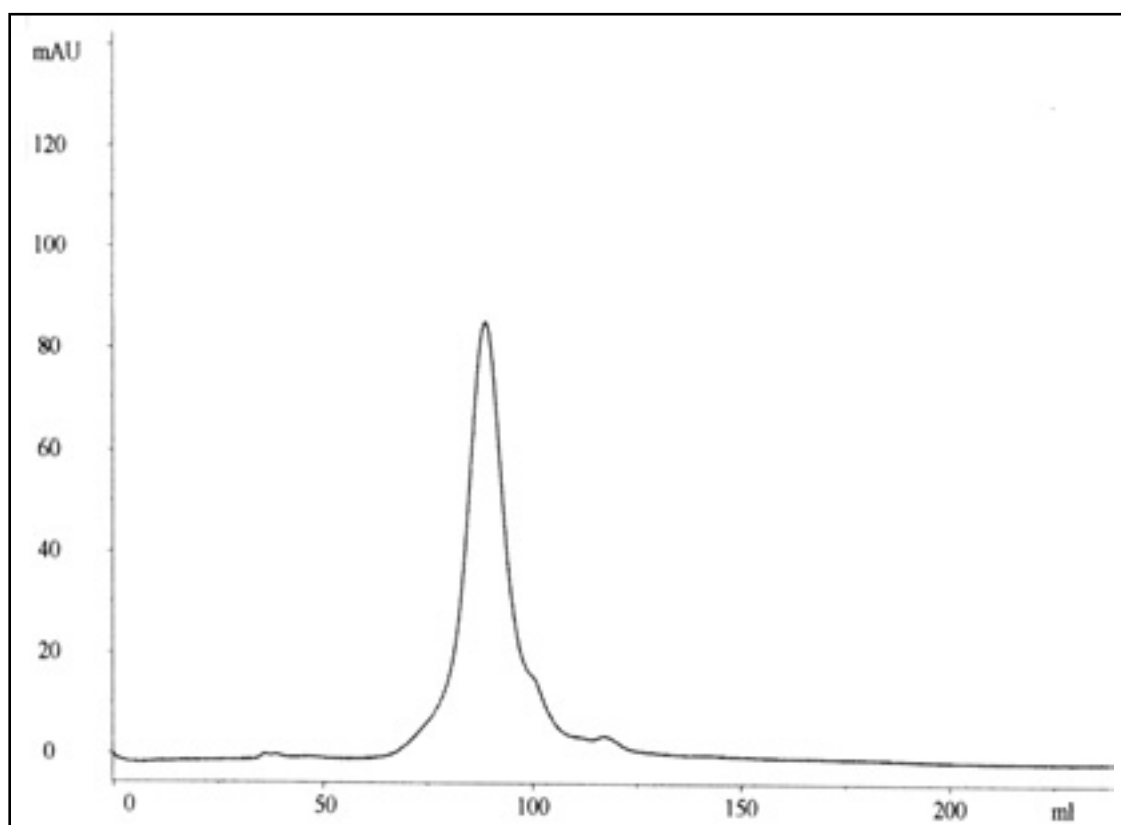


Figure 4. Gel filtration on Sephacryl S-300.

Sample (2 ml; 4 mg) of CrataBL was applied on Sephacryl S-300 (16 mm x 60 cm).

Fractions of 3.0 ml were collected at 0.5 ml/min.

6. CONCLUSÕES

- Entrecasca de *C. tapia* contém lectina (CrataBL).
- CrataBL aglutinou eritrócitos de diferentes espécies animais.
- A lectina foi principalmente inibida por glicoproteína.
- A AH de CrataBL não foi afetada em presença de EDTA e de íons.
- CrataBL é uma lectina termoestável.
- A lectina de *C. tapia* é uma proteína básica, constituída por duas subunidades diferentes.
- CrataBL é uma glicoproteína reconhecida por lectina glicose/manose.
- CrataBL imobilizada em Sepharose CL-4B ligou glicoproteínas.