



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ENGENHARIA DE ALIMENTOS



PURIFICAÇÃO DE LECTINAS DE SEMENTES DE JACA UTILIZANDO
TROCADORES IÔNICOS MONOLITICOS SUPERMACROPOROSOS

IVONÉA SOARES DO NASCIMENTO
Orientador:

Prof. DSc. Rafael da Costa Ilhéu Fontan - UESB

ITAPETINGA
BAHIA - BRASIL

2017

IVONÉA SOARES DO NASCIMENTO

**PURIFICAÇÃO DE LECTINAS DE SEMENTES DE JACA UTILIZANDO
TROCADORES IÔNICOS MONOLITICOS SUPERMACROPOROSOS**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB, como parte integrante das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, área de concentração em Engenharia de Alimentos, para obtenção do título de Mestre.

Orientador:

Prof. DSc. Rafael da Costa Ilhéu Fontan - UESB

Co-Orientadores:

Profª DSc. Cristiane Martins Veloso – UESB

Profª. DSc. Lizzy Ayra Alcântara Veríssimo – UFLA

**ITAPETINGA
BAHIA - BRASIL**

2017

634.7 Nascimento, Ivonéa Soares do
N195p Purificação de lectinas de sementes de jaca utilizando trocadores iônicos monolíticos supermacroporosos. / Ivonéa Soares do Nascimento. - Itapetinga: UESB, 2017.
51p.

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB, como parte integrante das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, área de concentração em Engenharia de Alimentos, para obtenção do título de Mestre. Sob a orientação do Prof. D.Sc. Rafael da Costa Ilhéu Fontan e co-orientação da Prof^a. D.Sc. Cristiane Martins Veloso e Prof^a. D.Sc. Lizzy Ayra Alcântara Veríssimo.

1. Sementes de jaca - Lectinas. 2. Sementes de jaca - Criogéis. 3. Trocadores iônicos. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos. II. Fontan, Rafael da Costa Ilhéu. III. Veloso, Cristiane Martins. IV. Veríssimo, Lizzy Ayra Alcântara. V. Título.

CDD(21): **634.7**

Catálogo na fonte:

Adalice Gustavo da Silva – CRB/5-535
Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para Desdobramento por Assunto:

1. Sementes de jaca - Lectinas
2. Sementes de jaca - Criogéis
3. Trocadores iônicos



Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia
Programa de Pós-Graduação
Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos



Áreas de Concentração: Engenharia de Alimentos
Ciência de Alimentos

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: PURIFICAÇÃO DE LECTINAS DE SEMENTES DE JACA UTILIZANDO TROCADORES IÔNICOS MONOLÍTICOS SUPERMACROPOROSOS.

Autor (a): IVONÉA SOARES DO NASCIMENTO

Orientador (a): Prof.^o Dr. Rafael da Costa Ilhéu Fontan

Coorientadores: Prof.^a Dr.^a Cristiane Martins Veloso
Prof.^a Dr.^a Lizzy Ayra Alcantara Veríssimo

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de **MESTRE EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ENGENHARIA DE ALIMENTOS**, pela Banca Examinadora.


Prof.^o Dr. Rafael da Costa Ilhéu Fontan (UESB)


Prof.^a Dr.^a Renata Cristina Ferreira Bonomo (UESB)


Prof.^a Dr.^a Elizama Aguiar de Oliveira (UESC)

Itapetinga-BA, 22 de fevereiro de 2017.

“Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar; porque descobri, no caminho incerto da vida, que o mais importante é o decidir.”

Cora Coralina

A DEUS
Aos meus pais e família
Aos meu esposo e filha “Júlia”

Dedico!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **DEUS**, pelo dom da vida, pela proteção, oportunidades e por me conceder saúde e sabedoria para conquistar meus objetivos.

Aos meus pais, **Neuza e João**, pelo amor, dedicação, empenho e sempre estarem ao meu lado em todos os momentos dando-me força e incentivo para continuar.

Aos meus **irmãos**, pelos momentos de alegria e descontração, amizade, carinho e confiança, que sempre depositam em mim.

Ao meu Namorado, companheiro e pai, **Ted Possidônio**, por estar comigo em todos os momentos. E por ter me dado o melhor presente do mundo a minha linda pequena princesa **Júlia**, meu amor eterno, que me ensinou e me ensina a cada dia a ser uma pessoa melhor.

Aos **amigos** de longe e perto por de um modo ou outro sempre estão ao meu lado desejando-me o bem e sucesso.

Aos **colegas e novos amigos** que encontrei ao decorrer do curso, sou grata a cada um que do seu modo esteve comigo.

Ao Professor **Rafael Fontan**, por ter feito muito mais do que seu papel como orientador, amizade e companheirismo.

A todos os **professores** que contribuíram com o conhecimento didático e de vida até o momento.

A todos do **LEP**, em especial para **Débora Lemos da Silva, Thaís Barros Pereira e Anie Nolasco Alves**, pela ajuda no desenvolvimento do projeto.

A todos do Laboratório de leite, em especial **Ben Hur** pela ajuda
À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB).

A **CAPES** pela concessão da bolsa e financiamento do projeto.

A todos, que por ventura não tenha sido citados, mas contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	15
2.1 Lectinas.....	15
2.1.1. Classificação das lectinas.....	15
2.1.2 Ocorrência.....	16
2.1.3 Funções e Aplicações.....	16
2.1.4 Lectina de semente de jaca (<i>Artocarpus integrifolia</i>) Jacalina.....	18
2.2 Purificação.....	19
2.2.1 Cromatografia de Troca Iônica.....	20
2.3 Criogéis poliméricos monolíticos.....	21
2.3.1 Mecanismo de síntese do criogéis poliméricos.....	23
2.3.2 Enxertia de grupos trocadores iônicos.....	24
3. Objetivos.....	26
3.1 objetivo geral.....	26
3.2 objetivos específicos.....	26
4. Materiais e métodos.....	27
4.1 Reagentes.....	27
4.2 Síntese dos criogéis monolíticos.....	27
4.2 Produção dos Trocadores iônicos	27
4.4. Caracterização dos criogéis / trocadores iônicos.....	28
4.4.1. <i>Capacidade de inchamento e grau de expansão</i>	28
4.4.2 Porosidade.....	29
4.4.3 Espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	29
4.5. Purificação das lectinas.....	30
4.5.1. Avaliação dos extratos obtidos e picos coletados.....	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
5.1 Capacidade de inchamento e grau de expansão.....	33
5.2 Porosidade.....	34

5.3 Espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	
.....	34
5.4 Purificação de jacalina.....	36
6. CONCLUSÃO.....	42
7. REFERÊNCIAS.....	43

RESUMO

NASCIMENTO, I.S. **Purificação de lectinas de sementes de jaca utilizando trocadores iônicos monolíticos supermacroporosos.** Itapetinga-BA: UESB, 2016. 51 p. (Dissertação – Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos).*

Técnicas cromatográficas são usadas para extração e purificação de biocompostos ativos, sendo a troca iônica uma das mais adequadas para tal. Entre as possíveis matrizes cromatográficas incluem-se os monólitos, estruturas porosas, interconectadas em corpo único, destacando-se os criogéis poliméricos, obtidos a partir do congelamento de uma mistura reativa em polimerização. Entre as modificações possíveis está a imobilização de grupos funcionais na estrutura dos criogéis. Neste trabalho foi avaliada a imobilização de quatro trocadores iônicos: Dois de troca catiônica, AMPSA, ACRAC, DMAEMA e DMAEA-Q. Os criogéis contendo tais trocadores foram caracterizados em relação à capacidade de inchamento que foi de 12,37 a 14,67 Kg, grau de expansão de 14 a 15 Kg. Kg⁻¹ e porosidade total de 90%, sendo 75% de macroporos. Os extratos proteicos brutos de sementes de jaca foram utilizados para a purificação da jacalina por meio de cromatografia de troca iônica. Os picos coletados foram utilizados para determinada a atividade específica da jacalina empregando-se testes de hemaglutinação com sangue humano dos grupos ABO, tendo o AMPSA com melhor fator recuperação da proteína em torno de 4,26. Na análise de eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE) encontrou-se duas bandas fortes com massa molar de 14,3 kDa, em todos os picos coletados. Assim, é possível dizer que as colunas monolíticas supermacroporosas de troca iônica, são capazes de purificar a jacalina das sementes de jaca (*Artocarpus integrifolia*).

Palavras-chave: Criogéis, trocadores iônicos e lectinas.

* Orientador: Rafael da Costa Ilhéu Fontan, DSc., UESB. Co-orientadores: Prof^a DSc. Cristiane Martins Veloso – UESB; Prof^a. DSc. Lizzy Ayra Alcântara Veríssimo – UFPA

ABSTRACT

NASCIMENTO, I.S. **Purification of jackfruit seed lectins using supermacroporous monolithic ion exchangers**. Itapetinga-BA: UESB, 2016. 51 p. (Dissertation - Master in Engineering and Food Science). *

Chromatographic techniques are used for extraction and purification of active biocomposites, with ion exchange being one of the most suitable for this. Possible chromatographic matrices include the monoliths, porous structures, interconnected in a single body, especially polymer cryogels, obtained from the freezing of a reactive mixture in polymerization. Among the possible modifications is the immobilization of functional groups in the cryogenic structure. In this work the immobilization of four ion exchangers: two of cation exchange, AMPSA, ACRAC, DMAEMA and DMAEA-Q were evaluated. The cryogels containing such exchangers were characterized in relation to the swelling capacity which was 12,37 to 14,67 kg, degree of expansion of 14 to 15 kg Kg⁻¹ and total porosity of 90%, being 75% of macropores. The crude protein extracts of jackfruit seeds were used for the purification of the jacalina by means of ion exchange chromatography. The collected peaks were used to determine the specific activity of the jacalina using human blood haemagglutination tests of the ABO groups, with AMPSA having the best protein recovery factor around 4,26. In the analysis of polyacrylamide gel electrophoresis under denaturing conditions (SDS-PAGE) two strong bands with 14,3 kDa molar mass were found in all peaks collected. Thus, it is possible to say that superoxoporous ion-exchange monolithic columns are capable of purifying the jacalin of jackfruit seeds (*Artocarpus integrifolia*).

Key words: Criogels, ion exchangers and lectins.

* Advisor: Rafael da Costa Ilhéu Fontan, DSc., UESB. Co-advisors: Prof^a DSc. Cristiane Martins Veloso - UESB; Prof^a. DSc. Lizzy Ayra Alcântara Veríssimo - UFLA

1. INTRODUÇÃO GERAL

As lectinas são proteínas de origem não imune que se ligam de maneira reversível a carboidratos ou substâncias que contenham açúcares. Têm capacidade de aglutinar células e/ou precipitar glicoconjugados sem, entretanto, alterar a estrutura de nenhum glicosil ligante (Pandey et al., 2009). Por terem a capacidade de se ligar a mono e oligossacarídeos, apresentam uma variedade de efeitos biológicos, alguns dos quais servindo como base para a aplicação de lectinas na investigação de atividades químicas e biológicas, tais como ação inseticida (Coelho et al., 2007), fungicida (Sitohy et al., 2007), bactericida (Santi-Gadelha et al., 2006), antitumoral (Petrossian et al., 2007) e até ação inibitória sobre a protease HIV-1 (Ng et al., 2002).

Este grupo de glicoproteínas é encontrado em muitos organismos de bactérias a animais (Perçin e Aksöz, 2012), mas são as plantas, em especial sementes de leguminosas, a principal fonte de lectinas (Etzler, 1986). Muitas fontes menos usuais também são utilizadas, como plantas das famílias das Cucurbitáceas, Moráceas e Amarantáceas, entre outras (Peumans e Van Damme, 1998), como as sementes de jaca e umbú (Kabir, 1995; Oliveira et al., 2000; Barre et al., 2004; Ferreira et al., 2007).

A demanda da indústria de alimentos e farmacêutica por biocompostos ativos, incluindo as lectinas, é crescente, buscando-se o emprego de técnicas que mantenham ao máximo a bioatividade dos mesmos (Guiochon e Beaver, 2011). Técnicas cromatográficas são as mais importantes no desenvolvimento de processos de purificação de biocompostos, compondo em média de duas a três etapas destes (Jungbauer e Hanh, 2008; Lenhoff, 2011). Ao se trabalhar com a purificação de biocompostos, as técnicas de troca iônica têm grande importância e aplicabilidade devido à seletividade e capacidade de separação em condições próximas às fisiológicas, causando menos danos aos compostos. Esta técnica se baseia na adsorção diferenciada de compostos carregados (positiva ou negativamente) em uma superfície com carga oposta, e vem sendo empregada na purificação de proteínas, peptídeos e enzimas (Chen et al., 2010). Devido a isso, o desenvolvimento de novos adsorventes e trocadores iônicos é constante. Na vanguarda desse processo está a produção de monólitos, estruturas porosas altamente interconectadas formadas em corpo único, considerados a quarta geração dos materiais cromatográficos (Jungbauer e Rahn, 2008). Dentre estes, destacam-se os criogéis poliméricos, obtidos a partir do congelamento de uma mistura reativa em polimerização. São caracterizados por possuírem elevada porosidade com poros grandes (diâmetro acima de 10 micrometros) interconectados (Lozinsky, 2002; Lozinsky et al. 2003). Esses compostos são versáteis no seu uso, podendo ser produzidos na forma de colunas,

discos ou membranas, e apresentam baixo custo se comparados a matrizes tradicionais na cromatografia (Guiochon, 2007).

Outra característica de interesse em tais matrizes é a baixa resistência ao escoamento através de um leito monolítico. Com isso soluções mais viscosas podem ser usadas sem afetar a eficiência de purificação, com a vantagem de se poder utilizar soluções pré-concentradas ou menos diluídas, otimizando o tempo de processo (Lozinsky et al., 2003; Guiochon, 2007). Devido a estas características, um grande crescimento no uso de criogéis poliméricos para a purificação de macromoléculas vem sendo observado (Billakanti e Fee, 2009; Yan et al., 2011; Çimen e Denizli, 2012; Srivastava et al., 2012; Sun et al., 2012; Uygun et al., 2012; Yun et al., 2012).

Apesar das vantagens apresentadas pelos criogéis poliméricos, sua estrutura física gera uma área superficial significativamente menor se comparada a de um leito fixo empacotado, o que pode diminuir sua eficiência. Por isso o estudo de modificações na estrutura dos criogéis é uma área essencial e que vem se desenvolvendo rapidamente. Modificações, químicas ou físicas, podem ser feitas visando a aumentar a eficiência dos processos de separação (Arvidsson et al., 2002; Babac et al., 2006; Kumar et al., 2006; Yao et al., 2007; Yun et al., 2007; Wang et al., 2008).

Algumas modificações feitas na estrutura dos criogéis são a imobilização de grupos funcionais nas estruturas dos criogéis, assim radicais iônicos podem ser incorporados tornando-os trocadores iônicos. Para este trabalho foi avaliada a imobilização de quatro radicais iônicos na estrutura de criogéis de poliácridamida visando à purificação de lectinas de sementes de jaca: dois voltados para a troca catiônica, o ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanossulfônico (AMPSA) e o ácido acrílico (ACRAC), e dois voltados para a troca aniônica, o 2-(dimetilamino)-etil metacrilato (DMAEMA) e o cloreto de [2-(Acriloiloxi)etil] trimetilamônio (DMAEA-Q). Os criogéis contendo tais trocadores foram caracterizados em relação à capacidade de inchamento, grau de expansão, porosidade e demais frações constituintes. Em seguida foram avaliadas as análises da eficiência de purificação de lectinas das sementes de jaca (*Artocarpus integrifolia*), através da cromatografia de troca iônica, observando se houve seletividade de algum trocador aqui testado.

A jacalina é uma lectina encontrada na semente da espécie *Artocarpus integrifolia*, popularmente chamada de jaca. Acredita-se que a origem desta fruta seja nas florestas tropicais da Índia, e que tenha se distribuído para o sudeste asiático, Filipinas, leste africano, Brasil e Suriname, tornando-se muito popular. As lectinas do gênero *Artocarpus* têm despertado interesse desde a descoberta da jacalina uma lectina galactose-específica (Moreira et al., 1977; Monteiro-Moreira 2002), possui propriedade de ligar-se a IgA humana (Roque-

Barreira et al., 1986), forte afinidade com o dissacarídeo Gal β 1-3GalNAc α O, que é o antígeno Thomsen-Friedereich associado a um tumor de origem oncofetal. A atividade anti-HIV e propriedades inseticidas estimularam posteriores pesquisas com a jacalina, tornando-a importante ferramenta biotecnológica, especialmente em imunologia (Kabir et al., 1998).

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Lectinas

O termo lectina (originado do latim “*lectus*”), foi introduzido por Boyd e Shapleigh no ano de 1954, em virtude da habilidade de se ligarem especificamente a carboidratos de uma forma não-covalente (Hong et al., 2001). O termo aglutinina é usado como um sinônimo para lectina, por que se refere à habilidade de aglutinar eritrócitos ou outras células (Peumans e van Damme, 1995).

Assim as lectinas são definidas como proteínas de origem não imune que se ligam de maneira reversível a carboidratos ou substâncias que contenham açúcares, tais como glicoproteínas (Pandey et al., 2009).

2.1.1. Classificação das lectinas

Diversas propostas já foram feitas para tentar classificar as lectinas de acordo com suas propriedades, tais como: na estrutura geral (Van Damme et al., 1998) e na especificidade ao carboidrato (Lis e Sharon, 1998). Algumas lectinas possuem especificidade dupla podendo ligar-se em diferentes açúcares simultaneamente. Deste modo, são classificadas em um mesmo grupo.

A classificação das lectinas de plantas é baseada nas sequências genéticas, estrutura da proteína e ligações com os carboidratos, sendo subdividida em sete famílias estruturalmente e evolutivamente relacionadas. Também existe a classificação pelo tipo de açúcar ao qual a lectina se liga, baseada nos seguintes monossacarídeos: L-fucose, D-glicose, D-mannose, D-galactose, N-acetil-D-galactosamina, N-acetil-D-glicosamina (Van Damme et al., 1998).

Segundo Van Damme et al. (1998), as lectinas de plantas são divididas em 4 classes. As merolectinas são lectinas que tem pelo menos um CRD (domínio reconhecedor de carboidrato), ou seja, são monovalentes e conseqüentemente incapazes de precipitar glicoconjugados ou aglutinar células. As hololectinas são lectinas que possuem dois ou múltiplos CRDs idênticos ou muito similares estruturalmente, sendo capazes de hemaglutinar e precipitar glicoconjugados. As quimerolectinas ou hemilectinas são lectinas que apresentam um ou mais CRDs e mais um domínio distinto, com atividade catalítica ou outra atividade biológica. E por fim, superlectinas são lectinas que apresentam pelo menos dois CRDs distintos, diferentes das hololectinas devido ao fato de seus domínios serem capazes de reconhecer açúcares não relacionados.

2.1.2. Ocorrência

As lectinas são encontradas em muitos organismos, de bactérias a animais (Perçin e Aksöz, 2012). Plantas, em especial sementes de leguminosas são a principal fonte de lectinas comerciais (Etzler, 1986), mas muitas fontes menos usuais também são utilizadas, como plantas das famílias das Cucurbitáceas, Moráceas e Amarantáceas, entre outras (Peumans e Van Damme, 1998).

Além destas, lectinas vêm sendo extraídas de outras fontes, como a faveira-amargosa (Silva et al., 2012a), pata-de-vaca (Silva et al., 2012b), caranguejo-luva chinês (Wang et al., 2013), banana (Dimitrijevic et al., 2012). Alguns também foram feitos com extração de lectinas das sementes de jaca (De Simone et al., 1994; Barre et al., 2004) e das sementes de umbu (Oliveira et al., 2000; Ferreira et al., 2007).

As lectinas de plantas respondem por cerca de metade das lectinas com estrutura tridimensional conhecida (Pratap, 2002; Jeyaprakash, 2004). São sintetizadas nos ribossomos, nos processos co-traducionais e pós-traducionais (Rüdiger; Gabius, 2001). No retículo endoplasmático são transportadas ao complexo de Golgi, onde serão empacotadas e secretadas para os vacúolos (Rüdiger; Gabius, 2001). Nestes, dividem-se em partes menores chamados de corpos proteicos, onde permanecem armazenadas na semente (Rüdiger; Gabius, 2001).

Em relação à distribuição nos tecidos vegetais, as lectinas estão presentes em todas as partes da planta; concentrando-se nas sementes (Ventura, 2006). Nas outras partes da planta tal como folhas (Silva et al., 2010), caules, bulbos e cascas (Trindade, 2005), raízes, tubérculos, rizomas (Zanetti, 2007) ou flores se encontram pequenas quantidades (Ventura, 2006).

As lectinas mais estudadas são da família *Leguminosae*. Entretanto, muitas lectinas de outras famílias também têm sido frequentemente isoladas e caracterizadas como, por exemplo, de *Solanaceae* (Peumans et al., 2003), *Euphorbiaceae* (Wititsuwannakul et al., 1998), *Labiatae*, *Moraceae* (Moreira et al., 1998) e outras.

2.1.3. Função e aplicações

As lectinas apresentam funções diferentes em uma ou mais espécies, por serem encontradas em todos os organismos, assim estas macromoléculas são chamadas de multifuncionais (Oliveira, 2014).

Devido às características e propriedades bioquímicas, as lectinas vêm sendo utilizadas como valiosos instrumentos em pesquisas médicas e biológicas (Tabela 2). Algumas lectinas são específicas em reagir com eritrócitos humanos dos sistemas ABO e MN, inclusive com

os subgrupos ABO, e conseqüentemente são utilizadas na tipagem sanguínea e investigações sobre as bases químicas da especificidade dos grupos sanguíneos (Sharon e Lis, 1972).

Estudos de inibição por açúcares simples das lectinas de *Phaseolus limensis* e *Vicia craca*, específica para o grupo A, e de *Lotus tetragonolobus* e *Anguilla anguilla*, específicas para o grupo O, forneceram evidências de que N-acetilgalactosamina e L-fucose desempenham um papel importante na especificidade dos grupos A e O, respectivamente (Sharon e Lis, 1987).

Tem se verificado diversas funções para as lectinas, como a ação inseticida (Coelho et al., 2007), fungicida (Sitohy et al., 2007), bactericida (Santi-Gadelha et al., 2006), antitumoral (Petrossian et al., 2007) e até ação inibitória sobre a protease HIV-1 (Ng et al., 2002). Além disso, as lectinas podem ser utilizadas na produção de biossensores para a indústria de alimentos, verificando a existência de certos grupos de analitos e/ou microrganismos, assegurando a qualidade de matérias-primas e produtos industrializados (Rahaie e Kazemi, 2010).

A habilidade em se ligar reversivelmente a carboidratos ou glicoconjugados é à base do desenvolvimento de marcadores seletivos para o reconhecimento de carboidratos. A tecnologia de biorreconhecimento de lectinas por açúcares tem sido aplicada no diagnóstico clínico (Gemeiner et al., 2009), na remoção de vírus de sangue (Tullis et al., 2009), purificação de glicoproteínas do plasma (Lima et al., 1997) e de anticorpos (Babac et al., 2006).

Tabela 2: Emrego de lectinas em atividades de pesquisa e diagnóstico*

Caracterização de carboidratos e glicoconjugados
Estruturas de carboidratos comleos e partículas subcelulares de animais, bactérias e vírus
Arquitetura de suerficies celulares e suas mudanças sob transformação malignas
Tipagem sanguínea, estudos estruturais de substâncias de grupos e subgrupos sanguíneos
Genética, biossíntese e função de glicoconjugados de suerficies celulares
Estimulação mitogênica de linfócitos
Sítios de ligação específicas de carboidratos-proteínas
Análises estruturais dos modelos de interação proteína-prteína
Estimulação linfocitária e de citotoxicidade celular dependentes de lectinas
Modelos moleculares de transdução de sinal
Fatores de resistência em vegetais heterólogos
*Adaptado de: MOREIRA et al., 1991; LORIS et al., 1998; DAM e BREWER, 2002.

2.1.4 Lectina de semente de jaca (*Artocarpus integrifolia*) - Jacalina

Moreira e Ainouz (1978) descreveram a atividade hemaglutinante em extratos de semente de jaca (*Artocarpus integrifolia*) sugerindo a existência de lectinas nesta fruta, a qual foi posteriormente chamada Jacalina. A jacalina, primeira das lectinas a ser isolada desta fonte, é uma proteína homotetramérica formada por quatro monômeros idênticos que consistem de uma cadeia leve e uma pesada (Bourne, 2002). A cadeia pesada (α) possui 133 resíduos de aminoácidos, enquanto a cadeia leve (β) tem 20 resíduos de aminoácidos.

A jacalina é uma lectina que possui uma cadeia α principal ligadas em dois peptídeos, essas cadeias tem peso molecular de 12 e 15,4 kDa, numa proporção de 2:1 (Kabir, 1993). Possui uma cadeia menor de 2 kDa, que por sua vez, está associada de forma não-covalente com as cadeias alfa (Young et al., 1989). As cadeias alfa são glicosiladas, sendo que a cadeia de 15 kDa é mais glicosilada do que a cadeia de 12 kDa (Ruffet et al., 1992). Esta lectina, com massa molecular de 66 kDa (Jeyaprakash, 2005), liga-se a D-galactose e a seu derivado Gal β 1-3GalNAc, tal especificidade permite sua ampla aplicação como ferramenta na identificação e no isolamento de proteínas O-glicosiladas de mamíferos. A jacalina também interage seletivamente com a Imunoglobulina A do tipo 1 (IgA 1) do soro humano, o que viabiliza seu uso no estudo da nefropatia (Hiki, 1996; Bourne, 2002; Wu, 2003; Barre, 2004; Jeyaprakash, 2005; Silva, 2005).

A Jacalina foi descrita com relação ao seu papel imunoestimulante no sistema imune inato, bem como os seus efeitos adjuvantes contra parasitas como *Trypanosoma cruzi* (Albuquerque et al., 1999) e *Leishmania* spp (Teixeira et al., 2006). Foi demonstrado sendo mitogênico para linfócitos TCD4 humanos (ineau et al., 1990), ações imunorreguladores, que foi demonstrada na infecção pelo HIV,(Babac et al., 2007). Apresenta forte efeito imunoestimulante e adjuvante na imunização de ratos contra neosporose, (Cardoso et al., 2011).

Santos-de-Oliveira et al. (1994) a caracterizaram como uma molécula tetramérica, com massa molecular de 39,5 kDa, constituída pelas cadeias α e β , com massas moleculares de 11,8 e 14,7 kDa. Estas cadeias podem apresentar variações gerando isoformas (Young et al., 1991). Kabir et al., (1995) identificou duas bandas com massas moleculares de 12 e 15,4kDa, caracterizadas como as cadeias α e α' isoformas da jacalina. Os autores concluíram que em uma faixa de pH de 4,5 a 8,5 observou-se a presença de mais bandas características da jacalina, assim é possível isolar jacalina em uma ampla faixa de pH com atividade hemaglutinante ativa.

2.2. Purificação de lectinas

A primeira lectina purificada foi descrita por Summer (1919), quando obteve a Concanavalina A (*Canavalia ensiformis*), a partir de precipitação salina e cristalização. Summer e Howell (1936) relataram que além de aglutinar hemácias, a concanavalina A também precipitava o glicogênio em solução e a sua atividade hemaglutinante era inibida por açúcar de cana, sugerindo que a interação das lectinas ocorria com carboidratos da superfície das hemácias. O crescente interesse na purificação de lectinas deve-se à sua potencial utilização em diversas áreas da medicina clínica, bem como em pesquisa química e biológica (Metsui et al. 2001; Banerjee et al., 2004; Vega e Pérez, 2006).

Métodos comuns utilizados na purificação de proteínas são aplicados para purificar as lectinas. Entre eles, 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 de lectinas de cotilédones de *Luetzelburgia auriculata* (Oliveira et al., 2002), dos tubérculos de *Helianthus tuberosus* L. (Suseelan et al., 2002). Extratos com atividade hemaglutinante (AH) podem ter suas lectinas purificadas parcialmente através de fracionamento salino com sulfato de amônio (Coelho e Silva, 2000; Sá et al., 2008) ou pela utilização de polietilenoglicol (PEG 8000) que remove compostos polifenólicos, como os presentes na entrecasca de *Hevea brasiliensis* (Wititsuwannakul et al., 1998).

Diversos métodos cromatográficos são usados para purificação de lectinas, tais como cromatografia de afinidade convencional (Sá et al., 2008) ou em membrana (Boi et al., 2006; Sorci et al., 2006); cromatografia de troca iônica (Yan et al., 2005) e cromatografia de filtração em gel (Rojo et al., 2003). Gilboa-Garber et al. (1985) trabalhando com lesmas-dormar utilizaram precipitação com sulfato de amônia e filtração em gel para purificar lectinas das gônadas e ovos fertilizados. Ortega et al. (1990) utilizaram o princípio de interação com eritrócitos para purificar lectinas a partir de sementes de *Erythrina americana*. Jung et al. (2003) aplicaram técnicas de filtração em membrana, filtração em gel e cromatografia de afinidade para isolar lectinas de ovos de peixes da espécie *Katsuwonus pelamis*.

Dada a capacidade das lectinas em se ligar a carboidratos e outras glicoproteínas, a técnica mais utilizada na purificação deste grupo de proteínas é a cromatografia de afinidade (Tyagi et al., 1996; Oliveira et al., 2002; Roy et al., 2005; Takahashi et al., 2008). Tal princípio vem sendo amplamente explorado, sendo estudada a interação com goma guar (Tyagi et al., 1996), derivados de galactose (Oliveira et al. 2002), manose (Ourth e Rose, 2011) e proteínas (Jung et al., 2003).

A purificação de lectina deu-se também por outros métodos, como por exemplo cromatografia de troca iônica (Moreira e Ainouz, 1981) e cromatografia de afinidade

utilizando-se diferentes meios como goma guar (Sureshkumar et al., 1982), estroma de hemácias humanas AB (Moreira e Oliveira, 1983), IgA-Sepharose (Roque-Barreira e Campos Neto, 1986). Nas técnicas envolvendo troca iônica, podemos citar estudos realizados por Kabir et al., (1995), que utilizaram um trocador aniônico fraco (DEAE-Sepharose) para purificar jacalina de sementes de jaca, enquanto que Santana et al. (2008) extraíram lectinas de sementes de *Macrotyloma axillare* utilizando uma coluna de troca aniônica.

O uso de matrizes comerciais para purificação de lectinas por técnicas cromatográficas é onerosa, sendo deste modo interessante o estudo de novas matrizes com capacidade de ligar lectinas de diferentes especificidades e de baixo custo, portanto, o interesse em desenvolver colunas poliméricas monolíticas usando a técnica de troca iônica para purificação de lectinas está cada vez maior.

2.2.1. Cromatografia de troca iônica

Um sistema cromatográfico compreende duas fases, uma fase estacionária fixa e uma fase móvel. O princípio da separação se baseia na existência de interações entre os constituintes da amostra com a fase móvel e a fase estacionária. As moléculas possuem interações diferentes (Cargas iônicas) com a fase estacionária, sendo transportada a velocidades diferentes separando-se assim umas das outras (Fidelis, 2011).

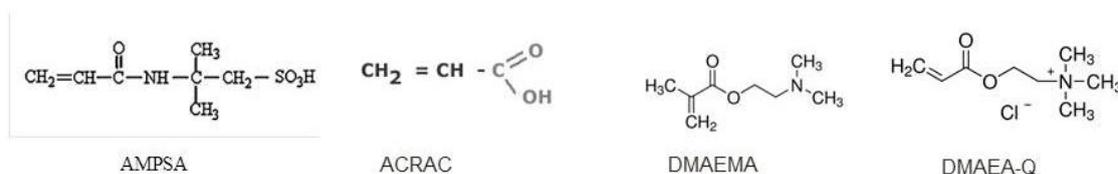
A cromatografia de troca iônica (CTI) envolve um fenômeno físico-químico em que uma solução troca íons com a superfície de um sólido poroso (Guiochon, 2002). A estrutura de um trocador de íons consiste de uma matriz sólida com grupos iônicos carregados (positivos ou negativos) ligados a essa matriz (Samuelson, 1963). A vantagem do uso da CTI para proteínas é que a adsorção pode ser facilmente reversível com a mudança das condições do processo (Fidelis, 2011).

Na cromatografia de troca iônica a interação da proteína ocorre com os grupos de carga oposta 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 nesse tipo de cromatografia são os derivados de celulose, como a carboximetil celulose (CM), um trocador catiônico carregado negativamente, e a dietilaminoetil celulose (DEAE), um trocador aniônico (Li et al., 2008).

Além destes, ainda podem ser usadas colunas com trocadores iônicos denominados de fortes ou fracos. A força iônica está relacionada com a capacidade do mesmo para se dissociar em contato com uma solução, assim como por exemplo, o grupo carboxílico (COO^-) é

considerado fraco, pois libera parcialmente seus prótons em solução, enquanto que o grupo SO_3^{-2} que se dissocia completamente é considerado forte (MIRANDA, 2000). Assim no presente trabalho foram usados quatro trocadores iônicos: troca catiônica ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanossulfônico (AMPSA) e ácido acrílico (ACRAC), e os grupos de troca aniônica 2-(dimetilamino)-etil metacrilato (DMAEMA) e cloreto de [2(acrilóiloxi)etil] trimetilamônio (DMAEA-Q). Sendo assim, o AMPSA e DMAEA-Q, são trocadores fortes, enquanto que o ACRAC e DMAEMA são trocadores fracos (Figura 1).

Figura 1: Estrutura química dos trocadores iônicos



Fonte: Adaptada pela autora via internet

2.3. Criogéis Poliméricos Monolíticos

Técnicas adsorptivas são utilizadas em pelo menos uma etapa de praticamente todos os processos de purificação de biocompostos existentes. A otimização dessas técnicas é de grande interesse, por trazer impacto direto no rendimento de tais processos. Nesse sentido, os monólitos poliméricos são considerados o que há de mais moderno no setor de matrizes cromatográficas.

Entre as várias maneiras de se conduzir os processos cromatográficos, a adsorção em leito fixo possui a maior eficiência dada a maior área superficial de contato, sendo uma técnica de fácil implementação nos processos produtivos. No entanto, a presença de biomoléculas grandes e materiais altamente concentrados desafiam sua capacidade e produtividade (Stickel et al., 2001).

A adsorção em leito expandido permite o uso de uma solução de alimentação contendo material particulado, eliminando a necessidade de clarificação inicial do meio, reduzindo o número de etapas do processo e evitando a perda de atividade da biomolécula. No entanto, esse método cromatográfico exige tipos especiais de colunas e acessórios que não podem ser instalados em sistemas tradicionais de cromatografia de leito empacotado (FIDELIS, 2011). Para contornar esses problemas, em especial os problemas de transferência de massa, vem

crescendo o interesse dos pesquisadores pelo desenvolvimento de colunas monolíticas, que permitem que o processo ocorra a uma velocidade superficial comparável a cromatografia líquida de alta eficiência convencional e superior às utilizadas em leito expandido, utilizando baixas pressões (Guiochon, 2007).

Criogéis são monólitos poliméricos formados em meio congelado e foram introduzidos como uma nova matriz de separação para aplicação em vários processos de biosseparação (Lozinsky et al., 2001). Os criogéis possuem um sistema contínuo de macroporos interconectados com tamanho variando de 10 a 100 μm e se caracterizam por fornecer uma baixa resistência ao escoamento de fluidos e uma difusão desobstruída de solutos de qualquer tamanho. Estes materiais poliméricos altamente porosos podem ser produzidos essencialmente a partir de qualquer precursor de formação de gel e com uma ampla variedade de morfologias e porosidades (Plieva et al., 2008). Caracteriza-se por uma estrutura em corpo único, com poros interconectados e grandes o suficiente para permitir a passagem até mesmo de células inteiras, o que leva a uma maior permeabilidade ao escoamento e a uma menor queda de pressão. São versáteis no seu uso, podendo ser produzidos na forma de colunas, discos ou membranas, e de baixo custo, se comparados a matrizes tradicionais utilizadas na cromatografia (Guiochon, 2007).

Apesar das vantagens apresentadas pelos criogéis poliméricos, os grandes poros e consequentemente a elevada porosidade de sua estrutura fazem com que sua área superficial seja significativamente menor se comparada a de um leito fixo empacotado, levando a uma menor eficiência teórica. Por isso o estudo de modificações na estrutura dos criogéis é uma área essencial e que vem se desenvolvendo rapidamente. Modificações, químicas ou físicas, podem ser feitas visando a aumentar a eficiência dos processos de separação (Arvidsson et al., 2002; Babac et al., 2006; Kumar et al., 2006; Yao et al., 2007; Yun et al., 2007; Wang et al., 2008). Entre tais modificações, uma técnica de grande interesse é a enxertia sobre o esqueleto polimérico utilizando um agente iniciador (técnica conhecida por *grafting from*), em que a ligação de grupos de interesse ocorre em regiões pré-ativadas da superfície do criogel (Savina et al., 2005a). Outros métodos podem ser utilizados na síntese de criogéis, como por exemplo, a polimerização direta de monômeros (Arvidsson et al.; 2002).

A caracterização de tais criogéis é de grande importância para se conhecer a dinâmica do escoamento de fluidos em seu interior, bem como o processo de interação dos sítios ativos com moléculas em solução, visando a predição desse comportamento no escalonamento do processo analisado e na otimização dos processos de purificação de diferentes biocompostos (Fontan, 2013).

A análise dos aspectos físicos (porosidade e tamanho de poros), hidrodinâmicos (permeabilidade ao escoamento) e químicos (grau de enxertia, número de sítios ativos) de criogéis vem sendo relatada por diversos autores e os resultados correlacionados às alterações nos processos de obtenção dos criogéis, seja em relação às rotas criogênicas usadas, seja em relação à composição dos mesmos. (Savina et al., 2005a e 2005b; Yao et al., 2006a; Chen et al., 2008).

2.3.1. Mecanismo de síntese dos criogéis de poliacrilamida

O desenvolvimento e utilização de monólitos poliméricos são recentes, sendo observado um significativo aumento no número de trabalhos com tal material apenas nas duas últimas décadas (Arvidsson et al., 2002; Lozinsky et al., 2003; Plieva et al., 2004a e 2004b). Entre os possíveis polímeros empregados na síntese desses compostos, destacam-se os monólitos macroporosos de poliacrilamida, obtidos da polimerização de moléculas de acrilamida (Aam) com o agente formador de ligações cruzadas N,N-metileno-bis-acrilamida (BAam), adicionados ou não de outros monômeros (como o alil-glicidil éter, AGE), sob condições de congelamento moderado (-10 °C a -20 °C), pela técnica conhecida como criogeleificação (Plieva et al., 2004b). Os monólitos assim produzidos são chamados de criogéis pAam, e sua utilização vem sendo reportada por diversos autores (Plieva et al., 2004a; Yao et al., 2007; Billakanti e Fee, 2009; Yan et al., 2011; Dragan et al., 2012).

Os componentes normalmente utilizados na síntese de criogéis são acrilamida (Aam), N,N-metileno-bis-acrilamida (BAam), tetrametilenodiamina (TEMED) e persulfato de amônio (APS). O persulfato de amônio quando colocado na presença de água, promove a formação de radicais livres, que quando colocados com a acrilamida promove uma reação radicalar. A acrilamida “ativada” pode então reagir da mesma maneira com sucessivas moléculas de acrilamida na produção de longas cadeias de polímero. Uma solução destes polímeros, embora viscosa, não forma gel. A geleificação não ocorre porque as longas cadeia podem deslizar passando uma sobre a outra. A formação do gel requer o enlace de várias cadeias unidas. Isso é feito, por meio da polimerização na presença de N,N-metileno-bis-acrilamida (BAam), um composto com duas moléculas de acrilamida acopladas nas extremidades em terminações não reativas. A polimerização acontece de forma a produzir redes de cadeia de acrilamida (Cooper, 1977).

O tamanho do poro dos criogéis é influenciado pelo conteúdo de acrilamida utilizado por unidade de volume de reação do meio e o grau de ligação cruzada. Independentemente do conteúdo total de acrilamida por unidade de volume, a média do tamanho dos poros alcança

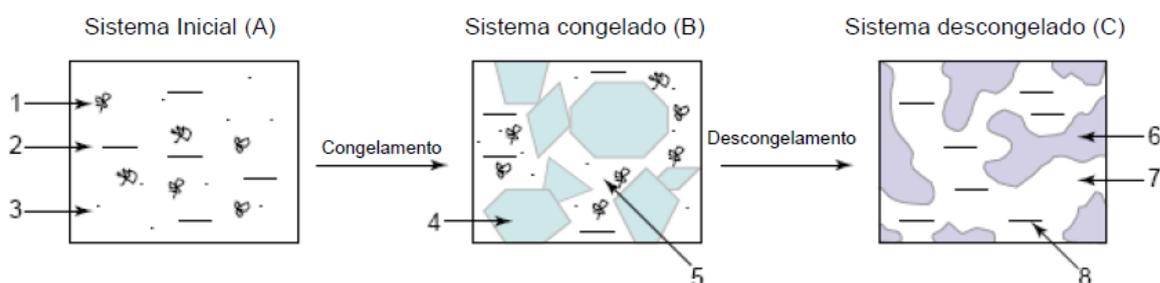
um mínimo quando 5% do total de acrilamida usado é N,N-metileno-bis-acrilamida (BAam) (Cooper, 1977).

A polimerização que ocorre nos criogéis é uma reação de polimerização comum, porém em condições de congelamento. Segundo Butler e Bruice (1964) e Pinock (1966 e 1969), em soluções moderadamente congeladas, parte do solvente permanece não estruturado, também chamado de microfase líquida não congelada. Substâncias dissolvidas nestes sistemas concentram-se nesta região de solvente não congelado, permitindo assim que posteriores reações químicas aconteçam embora toda a amostra pareça ser um bloco sólido.

O sistema congelado consiste em uma fase sólida (cristais de solvente congelado) e microfase líquida não congelada. Esta última usualmente constitui de 0,1-10% do total da amostra (Gusev et al., 1990, 1993.; Konstantinova & Lozinsky, 1997.; Lozinsky et al., 1989, 2000.; Mikhalev et al., 1991).

Após o descongelamento das amostras congeladas, o gel formado tem uma estrutura macroporosa. Os cristais congelados do solvente desempenham o papel do agente formador de poros, o derretimento destes cristais forma as cavidades nos criogéis (Lozinsky, 2008). A representação esquemática para a formação de criogéis poliméricos é mostrada na Figura 2.

Figura 2: Representação esquemática da produção de criogéis. Os componentes marcados nos sistemas são: (1) precursor de alto peso molecular, (2) solvente, (3) precursor de baixo peso molecular ou substâncias solúveis, (4) policristais do solvente congelado, (5) microfase líquida não congelada, (6) rede polimérica do criogel, (7) macroporos e (8) solvente descongelado.



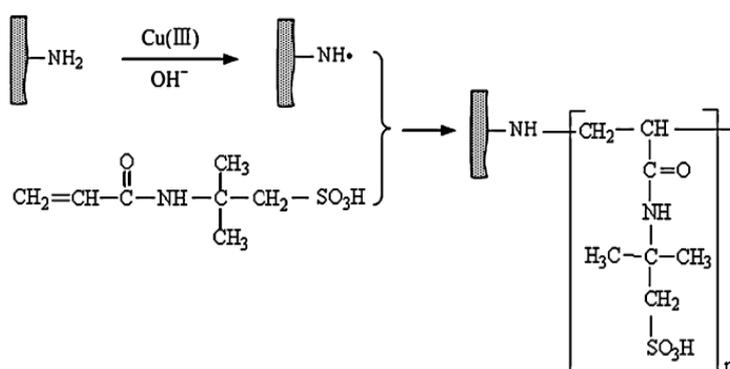
Fonte: Adaptado de Lozinsky et al. (2003).

2.3.2. *Enxertia de grupos trocadores iônicos*

Várias são as modificações químicas que podem ser realizadas nos criogéis, umas destas é a inclusão de grupos funcionais como os trocadores iônicos. Entre as alternativas existentes, uma técnica de grande interesse é a enxertia sobre o esqueleto polimérico utilizando um agente iniciador (técnica conhecida por *grafting from*), em que a ligação de

grupos de interesse ocorre em regiões pré-ativadas da superfície do criogel, sendo o agente iniciador mais comumente utilizado o diperiodato cuprato de potássio (Savina et al., 2005a). Na Figura 3, pode-se observar que os grupamentos amina (NH^2) resentes na matriz do criogel de acrilamida é ativado através de uma reação de redox com o cátion Cu^{3+} do diperiodato cuprato de potássio ($\text{K}_5[\text{Cu}(\text{HIO}_6)_2]$). Um elétron do átomo de nitrogênio é passado para o cátion Cu^{3+} formando um radical cátion, este subsequentemente perde um próton para o meio alcalino resultando em um radical amidil, que é capaz de iniciar a polimerização de monômeros (Fidelis, 2011).

Figura 3. O mecanismo de início de polimerização de enxerto para criogel AMPSA usando diperiodato cuprato de potássio.



Fonte: Yao et al., 2007

A enxertia usualmente é realizada de modo estático, com a solução com o grupo a ser enxertado sendo deixada estagnada em contato com o criogel por um determinado período de tempo (Savina et al., 2005a e 2005b; Hanora et al., 2006; Yao et al., 2007; Chen et al., 2008; Srivastava et al., 2012).

Entre os compostos químicos utilizados no processo de enxertia em criogéis pAAm estão o ácido acrílico, o ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanossulfônico (AMPSA) e o ácido iminodiacético, 2-dimetilaminoetil metacrilato (Arvidsson et al., 2002; Plieva et al., 2004b; Savina et al., 2005). Outros monômeros podem ser utilizados com este propósito. Em estudo feito por Arvidsson et al.; 2002) foi produzido um criogel utilizando uma solução de monômeros AAm + DMAEMA + MBAAm. Em outro estudo na síntese do criogel foi utilizado uma solução de AAm + AGE + MBAAm, (Arvidsson et al.; 2003).

Neste trabalho foram utilizados quatro tocadores iônicos: troca catiônica ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanossulfônico (AMPSA) e ácido acrílico (ACRAC), e os grupos de troca aniônica 2-(dimetilamino)-etil metacrilato (DMAEMA) e cloreto de [2(acriloiloxi)etil] trimetilamônio (DMAEA-Q), para dá funcionalidade aos criogéis.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

O principal objetivo foi desenvolver adsorventes monolíticos poliméricos supermacroporosos voltados para o processo de purificação de lectinas presentes nas sementes de jaca pela técnica de cromatografia de troca iônica.

3.2. Objetivos Específicos

- Desenvolver adsorventes poliméricos supermacroporosos monolíticos, obtidos pelo processo de criogeificação e modificados quimicamente para serem utilizados em processos cromatografia de troca iônica;
- Avaliar a enxertia de quatro radicais trocadores iônicos, dois catiônicos e dois aniônicos, caracterizando os adsorventes produzidos;
- Avaliar as diferenças na eficiência de purificação de lectinas utilizando-se os trocadores aniônicos e catiônicos;
- Purificar e caracterizar as lectinas obtidas a partir de sementes de jaca;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Reagentes

Para a realização deste trabalho foram utilizados acrilamida (AAm) e N,N'-metileno-bis-acrilamida (BAAm) para a produção dos criogéis que servirão de suporte para os grupos de troca catiônica ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanossulfônico (AMPSA) e ácido acrílico (ACRAC), e os grupos de troca aniônica 2-(dimetilamino)-etil metacrilato (DMAEMA) e cloreto de [2(acriloiloxi)etil] trimetilamônio (DMAEA-Q). Os demais reagentes e materiais necessários são descritos na sequência. Todos os reagentes químicos utilizados possuem, no mínimo, grau de pureza PA-ACS. Em todos os experimentos foi utilizada água deionizada ultra-pura.

4.2 Síntese dos criogéis monolíticos

Na síntese dos criogéis, foram adaptadas as metodologia proposta por Kumar et al. (2006) e Yao et al. (2006a). Resumidamente, uma solução contendo 7% (m/v) de monômeros AAm (5,6 g) e BAAm (1,4 g) foi preparada em banho de gelo. Adicionou-se então 39 μ L de APS e 120 μ L de TEMED em relação à massa total de monômeros. Após a homogeneização da solução, a mesma foram vertida em seringas plásticas e mergulhadas em um banho termostático à temperatura de $-12,0^{\circ}\text{C}$, por 24 h. Decorrido esse tempo, as seringas foram deixadas à 4°C por 4 h para o descongelamento da água existente. Os criogéis então foram desidratados em estufa a 60°C para a verificação de defeitos no processo de síntese. Após isso os mesmos foram lavados com água deionizada, utilizando-se uma bomba peristáltica, para a remoção de reagentes não polimerizados e então novamente desidratados. Decorridas essas etapas os criogéis foram submetidos aos processos de ativação e enxertia dos grupos trocadores. Os criogéis prontos apresentaram aspecto de um cilindro branco rígido e uniforme quando desidratados, com cerca de 5 cm de altura e 1 cm de diâmetro.

4.3 Produção dos trocadores iônicos

Os criogéis produzidos foram ativados com diperiodato cuprato de potássio, conforme metodologia adaptada de Savina et al. (2005a). A solução ativadora utilizada foi uma mistura de uma solução de NaOH ou HCl (1,0 mol/L) e diperiodato cuprato de potássio 0,0562 mol/L na proporção de 1:3, que bombeou-se através dos criogéis em circuito fechado durante 90 min (re-circulação) a uma vazão de 1,0 mL/min e temperatura de 45°C , mantida constante com o uso de uma estufa BOD.

Uma vez ativados, procedeu-se a enxertia dos radicais trocadores AMPSA, ACRAc, DMAEMA ou DMAEA-Q, seguindo metodologia adaptada de Yao et al. (2007). Para isso, foi utilizada uma solução com o radical trocador desejado na concentração de 2,0 mol/L, a 45°C durante 2h. Em seguida, o criogel foi lavado com 100 mL de uma solução de HCl ou NaOH (0,1 mol/L), temperatura de 45°C e seguido de 100 mL de água deionizada, para assegurar a retirada das moléculas livres, os mesmos foram desidratados em estufa a 60°C e armazenados secos até o uso.

4.4. Caracterização dos criogéis / trocadores iônicos

4.4.1. Capacidade de inchamento e grau de expansão

A capacidade de inchamento S (kg.kg^{-1}) foi determinada por meio da imersão de 6 criogéis individualizados desidratados e com as massas conhecidas em recipientes contendo 50 mL de água à temperatura ambiente, por 24 horas. Posteriormente, o excesso de água foi retirado e as massas foram verificadas em balança analítica. O valor de S foi calculado utilizando-se a Equação 1, onde: m_s é a massa (kg) do criogel hidratado e m_d é a massa (kg) do criogel desidratado (Savina et al., 2005).

$$S = \frac{(m_s - m_d)}{m_d} \quad (1)$$

O grau de expansão ED (L.kg^{-1}) dos criogéis é uma medida útil para a conversão entre a massa desidratada do criogel (quando armazenado) e o seu volume hidratado quando em uso (Gonçalves, 2016). Os criogéis individualizados e identificados usados na determinação de S tiveram seus volumes quando hidratados determinados utilizando-se uma proveta a partir da diferença de um volume inicial conhecido de água (V_1) e após a imersão dos criogéis saturados na proveta (V_2). O valor de ED foi calculado utilizando-se a Equação 2, onde: V_1 é o volume inicial de água na proveta (L), V_2 é o volume final lido na proveta após a colocação do criogel (L) e m_d é a massa do criogel desidratado (kg) (Fontan, 2013).

$$ED = \frac{V_2 - V_1}{m_d} \quad (2)$$

A capacidade de inchamento e o grau de expansão foram avaliados para os criogéis sem modificação e enxertados com os quatro diferentes radicais de troca iônica. Todas as análises foram conduzidas de maneira aleatorizada, sendo os resultados obtidos submetidos à análise de variância e Teste de Tukey, ambos a 5% de probabilidade.

4.4.2. Porosidade

Para a determinação da porosidade, foi utilizado um método muito usado na análise de criogéis poliméricos, que se baseia na medida do conteúdo de água livre (Plieva et al., 2004a e 2004b; Erzengin et al., 2011). Criogéis sem modificação e enxertados com os quatro diferentes grupos trocadores (seis unidades experimentais de cada um), desidratados e com as massas conhecidas, foram mantidos por sete dias em um dessecador contendo uma solução saturada de sulfato de potássio, para que a umidade relativa do ar permaneça em torno de 98% à temperatura ambiente (25 °C) (Greenspan, 1977), sendo as massas novamente determinadas ao fim deste período. Com tal medida foi determinada a quantidade de água de ligação do criogel (Plieva et al., 2004a e 2004b). Depois os criogéis foram saturados com água por 24 h, sendo suas massas obtidas novamente. Os criogéis foram então delicadamente espremidos e secos com lenços de papel para retirada da água livre no interior dos macroporos, sendo suas massas novamente medidas. A fração de macroporos (φ_M), com tamanho $\geq 1\mu\text{m}$, fração de meso e microporos (φ_m), com tamanho $< 1\mu\text{m}$, fração de água ligada (φ_{wb}), fração de polímero seco (φ_d) e porosidade total (φ_T) dos criogéis foram calculadas utilizando as Equações 3 a 7, respectivamente, Onde: m_s é a massa do criogel hidratado (kg), m_d é a massa do criogel desidratado (kg), m_e é a massa do criogel espremido (kg) e m_{wb} é a massa do criogel com água de ligação (kg), (Plieva et al. 2004a e 2004b).

$$\varphi_M = \frac{m_s - m_e}{m_s} \quad (3)$$

$$\varphi_m = \frac{m_e - m_{wb}}{m_s} \quad (4)$$

$$\varphi_{wb} = \frac{m_{wb} - m_d}{m_s} \quad (5)$$

$$\varphi_d = \frac{m_d}{m_s} \quad (6)$$

$$\varphi_T = \frac{m_s - m_{wb}}{m_s} = \varphi_M + \varphi_m \quad (7)$$

Todas as análises foram conduzidas de maneira aleatorizada, sendo os resultados obtidos submetidos à análise de variância e Teste de Tukey, ambos a 5% de probabilidade.

4.4.3. Espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os criogéis produzidos foram avaliados por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). As amostras avaliadas foram desidratadas, transformadas em pó e lidas diretamente utilizando-se a técnica de reflectância total atenuada (ATR) na região

infravermelha de 4000-500 cm^{-1} em um espectrofotômetro FTIR Bruker, modelo Vertex 70.

4.5. Purificação das lectinas

Foi avaliada a extração de lectinas de sementes de jaca, obtidas de produtores locais. As sementes foram retiradas manualmente, lavadas e secas ao sol, trituradas em moinho de facas com peneiras de 1mm, depois foram peneiradas em malha de 1 mm. Pesou-se então cerca de 5 g da farinha obtida, que foi misturada a 50 mL de solução-tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,2 contendo 150 mM de NaCl, colocadas sob agitação por 24 h a 4°C. Em seguida tais amostras foram centrifugadas e o sobrenadante recolhido e filtrado em membrana com poro de 0,45 micra, sendo então dialisado contra a solução-tampão sem NaCl. Os extratos obtidos foram então congelados a -18°C e descongelados sob refrigeração (4°C) para a utilização. No momento do uso os extratos obtidos eram mantidos em banho de gelo.

Para a extração das lectinas das soluções de alimentação, foram realizados experimentos em triplicata utilizando-se colunas de 5 cm de altura e 1 cm de diâmetro contendo os criogéis sem modificação e com os grupos trocadores enxertados adaptadas a um cromatógrafo preparativo ÄKTA Pure 25L (GEHealthcare, Upsalla, Suécia). Ao todo foram conduzidas 15 corridas cromatográficas.

As condições de cada corrida são apresentadas na Tabela 3. Todo o processo foi monitorado a 280 nm e a vazão de trabalho foi de 1,5 mL/min. Antes de se trabalhar com cada coluna as mesmas foram lavadas com cerca de 25 volumes de coluna (VC), cerca de 100 mL de água deionizada para hidratação e retirada de qualquer bolha que pudesse existir no sistema.

Tabela 3: Condições operacionais utilizadas nas corridas cromatográficas.

Etapa	Condição
Equilíbrio	15 mL de solução-tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,2.
Alimentação / Captura	7,5 mL de extrato proteico de semente de jaca em tampão fosfato de sódio.
Lavagem	Tampão fosfato de sódio até $\text{Abs}_{280\text{nm}}$ ser menor que 0,005 (ou 5 mAU) – cerca de 20mL.
Eluição (Etapa em gradiente)	- Fase móvel inicial: tampão fosfato de sódio (solução A). - mudança para 100% de tampão fosfato sódio, adicionado de 1,0 mol/L de NaCl (solução B) em 10 mL. - manutenção da solução B por 15 mL - retorno instantâneo para solução A e manutenção nela por 20mL.
Re-equilíbrio	15 mL de solução-tampão fosfato de sódio

Em uma breve descrição, a coluna após a lavagem com água foi equilibrada com tampão fosfato de trabalho. Em seguida, foi percolada pela alimentação desejada, observando-

se a formação da curva de ruptura. Após isso, as colunas foram lavadas com tampão para a retirada do material não-adsorvido, seguido da eluição do material adsorvido, com uma solução-tampão contendo 1,0 mol/L de NaCl. O pico observado foi coletado manualmente após o detector, determinando-se o seu início e fim na valor de 0,070 de Abs_{280nm} (70 mAU). Terminada a eluição, a coluna foi reequilibrada, reiniciando-se o processo. Ao fim das replicatas cada coluna foi lavada com 50 mL de água deionizada e 50 mL de solução de etanol 20%, sendo armazenadas sob refrigeração para uso posterior.

Os picos coletados na etapa de eluição foram submetidos a um processo de diálise para retirada do sal, utilizando-se um tubo de diálise de 2 cm de diâmetro previamente ativado, imerso em tampão por 12 h sob refrigeração. E posteriormente foram realizado os testes de hemaglutinação, dosagem de proteínas totais e eletroforese SDS-PAGE.

4.5.1. Avaliação dos extratos obtidos e picos coletados

Nos extratos das sementes de jaca utilizados e nos picos coletados na etapa de eluição em cada corrida cromatográfica realizaram-se as análises de proteína total, teste de hemaglutinação e identificação das frações proteicas por eletroforese SDS-PAGE, assim como nas frações de lectinas coletadas.

A determinação da concentração de proteínas totais ocorreu pelo método de Bradford (Bradford, 1976) e as lectinas foram identificadas por cromatografia líquida e eletroforese.

Para análise do conteúdo proteico de cada amostra utilizou-se a eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE) conforme descrito por Laemmli (1970), com modificações. Para tal, foi utilizado um gel de empilhamento com concentração de 5%, gel de separação com concentração de 12%, 25 µL de amostra desnaturada por poço e corrida com tensão constante de 250 V.

A atividade aglutinante das frações foi verificada pelo teste de aglutinação de células vermelhas de sangue de humanos do tipo sanguíneo A, B e O, conforme metodologia descrita por Silva et al. (2001). A atividade da lectina foi medida por determinação da Atividade de Hemaglutinação (HU), onde o número de unidades de atividade de hemaglutinação foi definido como o recíproco da maior diluição de amostra que promoveu a aglutinação total de eritrócitos. O HU específica foi definida como a razão entre as unidades e a concentração de proteína (mg / mL), (Carvalho et al., 2015).

Para os testes foram utilizados uma suspensão de hemácias humanas a 5% (v/v) dos grupos sanguíneos ABO e as frações de proteínas purificadas e extrato bruto foram diluídas em uma diluição seriada de base 2 (2^0 , 2^1 , 2^2 , ..., 2^{15}), em triplicata. Foram utilizadas placas de ELISA de fundo “U” para realização dos testes, onde em cada poço foi colocado

100 μ L de solução salina (0,9% de NaCl), em seguida 100 μ L das amostras e depois 100 μ L da suspensão de hemácias, sempre realizando a homogeneização e descarte de 100 μ L excedentes. Após aplicação nos poços foi incubada durante 1h a temperatura ambiente e realizada a leitura a olho nu. A reação de hemaglutinação ocorre quando há interação entre a lectina e os carboidratos presentes na membrana dos eritrócitos, formando uma rede decorrente dessa interação. O fator de diluição correspondente à menor concentração capaz de aglutinar os eritócitos é denominado título. A partir do título e da concentração proteica nos extratos usados e picos coletados foi determinada a atividade aglutinante específica e o fator de purificação da jacalina.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Capacidade de inchamento e grau de expansão

Os valores obtidos para a capacidade de inchamento (S) e grau de expansão (ED) dos criogéis avaliados são apresentados na Tabela 4. As diferenças entre as médias para cada parâmetro foi avaliada por meio do teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A capacidade de inchamento (S) nos criogéis produzidos não apresentaram diferenças estatísticas entre si ($p > 0,05$). Para a capacidade de inchamento o processo de enxertia dos grupos funcionais não foi alterado, que ficou 12,37 e 14,67 kg de água para cada quilograma de criogel desidratado. Mas quando comparado com outros estudos apresentou menores valores para S como, por exemplo, no estudo realizado por Fontan (2013), que encontrou 20 kg.kg^{-1} usando enxertia com ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanossulfônico (AMPSA), porém a concentração dos monômeros utilizados na síntese das colunas foi diferentes 6%, enquanto, que neste estudo utilizou-se 7%. Outros autores relatam valores que variam entre 3 e 15 kg.kg^{-1} , para os mais diversos tipos de criogéis poliméricos (Arvidson et al., 2002 e 2003; Bereli et al., 2012; Çimen e Denizli, 2012; Uygun et al., 2012). É importante lembrar que quanto maior for à capacidade de inchamento, maior a tendência das colunas serem mais maleáveis (depois de hidratadas) e, provavelmente, com menor resistência mecânica (Carvalho, 2010), esta característica é importante, uma vez que ao serem hidratadas as colunas podem sofrer modificações podendo ser danificadas durante seu uso, o que com este resultados não podem ocorrer pois estas colunas suportariam baixas pressões.

O grau de expansão também não foi afetado pelo processo de enxertia quando observado os grupos funcionais ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanossulfônico (AMPSA), ácido acrílico (ACRAC) e os grupos de troca aniônica 2-(dimetilamino)-etil metacrilato (DMAEMA) com valores entre 14 e 15 kg.kg^{-1} . Mas quando se observa os valores para o criogel puro e o cloreto de [2(acrilóiloxi)etil] trimetilamônio (DMAEA-Q), há uma diferença entre os mesmos, isso ocorre por que nestas colunas há uma prevalência de poros maiores proporcionando uma maior expansão quando hidratado, já no criogel com trocador DMAEA-Q há poucos poros quando comparados com os demais e a água ligada do mesmo é maior ocupando mais espaço impedindo uma maior expansão quando hidratado. Tal parâmetro possui grande importância, pois fornece uma relação entre a massa do criogel seco (em condição de armazenamento) e o volume que o mesmo ocupa em condições operacionais (Gonçalves, 2016). Estes resultados são favoráveis para os processos de purificação de biomoléculas, como as proteínas, por exemplo, uma vez que, estas colunas podem suportar variações de pressão.

Tabela 4: Parâmetros físicos associados ao processo de síntese dos criogéis.

Parametro	Não ativados	Trocador Iônico			
		ACRAC	AMPSA	DMAEMA	DMAEA-Q
S (kg.kg⁻¹)	14,64 ^a ±1,74	13,25 ^a ±0,69	12,85 ^a ±0,43	13,21 ^a ±0,61	12,37 ^a ±1,08
ED (L.kg⁻¹)	18,03 ^a ±2,32	15,12 ^b ±2,78	14,07 ^b ±1,97	14,65 ^b ±1,46	12,70 ^c ±1,16

5.2. Porosidade

Os criogéis sintetizados ao serem umedecidos com água, permaneceram com uma estrutura consistente, cilíndrica e esponjosa, características também comprovada por outros autores (Persson et al., 2004; Arvidsson et al., 2002; Yao et al., 2006a). Além disso, ao serem imersos em água o mesmos voltaram a sua forma original, e ao serem espremidos, removendo o excesso de água livre no interior dos poros, não tiveram sua estrutura danificada.

Os resultados encontrados para as frações dos constituintes dos criogéis produzidos e modificados com os diferentes radicais trocadores de íons são apresentados na Tabela 5. A partir das análises realizadas, verificou-se que este apresentou elevada porosidade, em torno de 90%, como foi observado na literatura por pesquisadores trabalhando com criogéis obtidos com diferentes formulações (Arvidsson et al., 2002; Persson et al., 2004; Yao et al., 2006).

Observa-se que os criogéis aqui produzidos possuem em sua estrutura poros grandes, uma vez que sua fração de macroporos variou entre 69 e 75%, característica desejável para o mesmo, uma vez que, são utilizados para o processo de purificação de biomoléculas que em sua maioria possuem tamanhos grandes, facilitam o escoamento de fluídos e o não entupimento das colunas devido a presença de impurezas nas amostras utilizadas. O processo de enxertia não proporcionou variações bruscas nas estruturas das colunas, não influenciando assim nos processos cromatográficos.

5.3. Espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A avaliação dos espectros na região do infravermelho apresenta grande potencial para determinação dos grupos funcionais, assim foi utilizada a técnica de FTIR para avaliar o processo de enxertia nas colunas macroporosas produzidas, uma vez que todas as substâncias moleculares orgânicas e inorgânicas absorvem radiação na região do infravermelho (Gomes, 1986). Na Figura 4 é apresentado o espectro de FTIR dos criogéis enxertados com os diferentes os trocadores iônicos assim como o criogel sem ativação.

Para todos os criogéis pode-se observar uma banda de vibração formada na região de 1650 cm^{-1} , característica do grupamento amida presente na poliacrilamida dos criogéis produzidos (Figura 4.a). Vários autores relatam a presença desta banda, quando utilizado os monômeros AAm e BAAm, (Savina et al., 2005; Tao et al., 2014, Perçin et al., 2015, Gonçalves, 2016).

Verificou-se alteração no espectro para os criogéis enxertados (Figura 4.b), principalmente na faixa de 1750 a 700 cm^{-1} . Para o criogel com AMPSA observou-se uma queda na transmitância em 1185 cm^{-1} e o surgimento de uma banda em 1040 cm^{-1} , associadas à presença de radicais com enxofre (sulfonatos) do AMPSA. Para o criogel com ACRAC houve um ligeiro aumento na banda em 1190 cm^{-1} que pode ser associado à ligação carbono-nitrogênio na amina secundária decorrente da enxertia do ácido acrílico na matriz de poliacrilamida. Os criogéis enxertados com DMAEMA apresentaram uma pequena alteração na banda de 1160 cm^{-1} , que pode ser associada à ligação carbono-nitrogênio na amina terciária do grupo trocador (Roy et al., 2008). E para o criogel enxertado com DMAEA-Q a banda que surgiu em 956 cm^{-1} é típica do radical $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ presente em sua estrutura (Zheng et al., 2014).

A presença destes radicais em cada coluna era o esperado, uma vez que, foram usados tais radicais para dar funcionalidade às colunas, estes são importantes para purificação utilizando a cromatografia de troca iônica, pois dão aos criogéis a funcionalidade de ser um trocador aniônico ou catiônico dependendo do radical presente, sendo este ainda caracterizado como forte ou fraco.

Tabela 5: Parâmetros físicos: Distribuição de fração de poros e porosidade total.

Parametro (Kg.Kg ⁻¹)	Trocador Iônico				
	Não ativados	ACRAC	AMPSA	DMAEMA	DMAEA-Q
ϕ_d	$0,065^a \pm 0,008$	$0,071^b \pm 0,004$	$0,072^b \pm 0,003$	$0,071^b \pm 0,003$	$0,075^b \pm 0,006$
ϕ_{wb}	$0,028^a \pm 0,005$	$0,029^a \pm 0,007$	$0,029^a \pm 0,004$	$0,035^b \pm 0,004$	$0,038^b \pm 0,005$
ϕ_M	$0,786^a \pm 0,043$	$0,690^b \pm 0,046$	$0,725^c \pm 0,040$	$0,755^c \pm 0,012$	$0,726^c \pm 0,045$
ϕ_m	$0,122^a \pm 0,044$	$0,210^b \pm 0,038$	$0,174^c \pm 0,040$	$0,140^a \pm 0,013$	$0,161^c \pm 0,039$
ϕ_T	$0,908^a \pm 0,010$	$0,901^a \pm 0,010$	$0,898^a \pm 0,004$	$0,895^a \pm 0,006$	$0,887^a \pm 0,010$

Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5%. ϕ_M : fração de macroporos; ϕ_m : fração de meso e microporos; ϕ_{wb} : fração de água ligada; ϕ_d : fração do polímero seco; ϕ_T : Porosidade total

5.4. Purificação da jacalina

Da farinha de semente de jaca foi possível obter os extratos brutos, que foram utilizados no processo de purificação usando a cromatografia de troca iônica fazendo uso das colunas monolíticas produzidas anteriormente, nos testes de hemaglutinação e eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE). A concentração média de proteína solúvel nos extratos utilizados foi de $(1,54 \pm 0,24)$ mg/mL.

A purificação de jacalina dos extratos brutos foi avaliada utilizando-se os trocadores produzidos e o criogel sem modificação conforme descrito na metodologia. Os perfis cromatográficos obtidos são apresentados na Figura 5.

Figura 4: Espectros de FTIR dos criogéis produzidos. (a) toda a faixa de número de onda analisada. (b) destaque para a região de 1750 a 700 cm^{-1}).

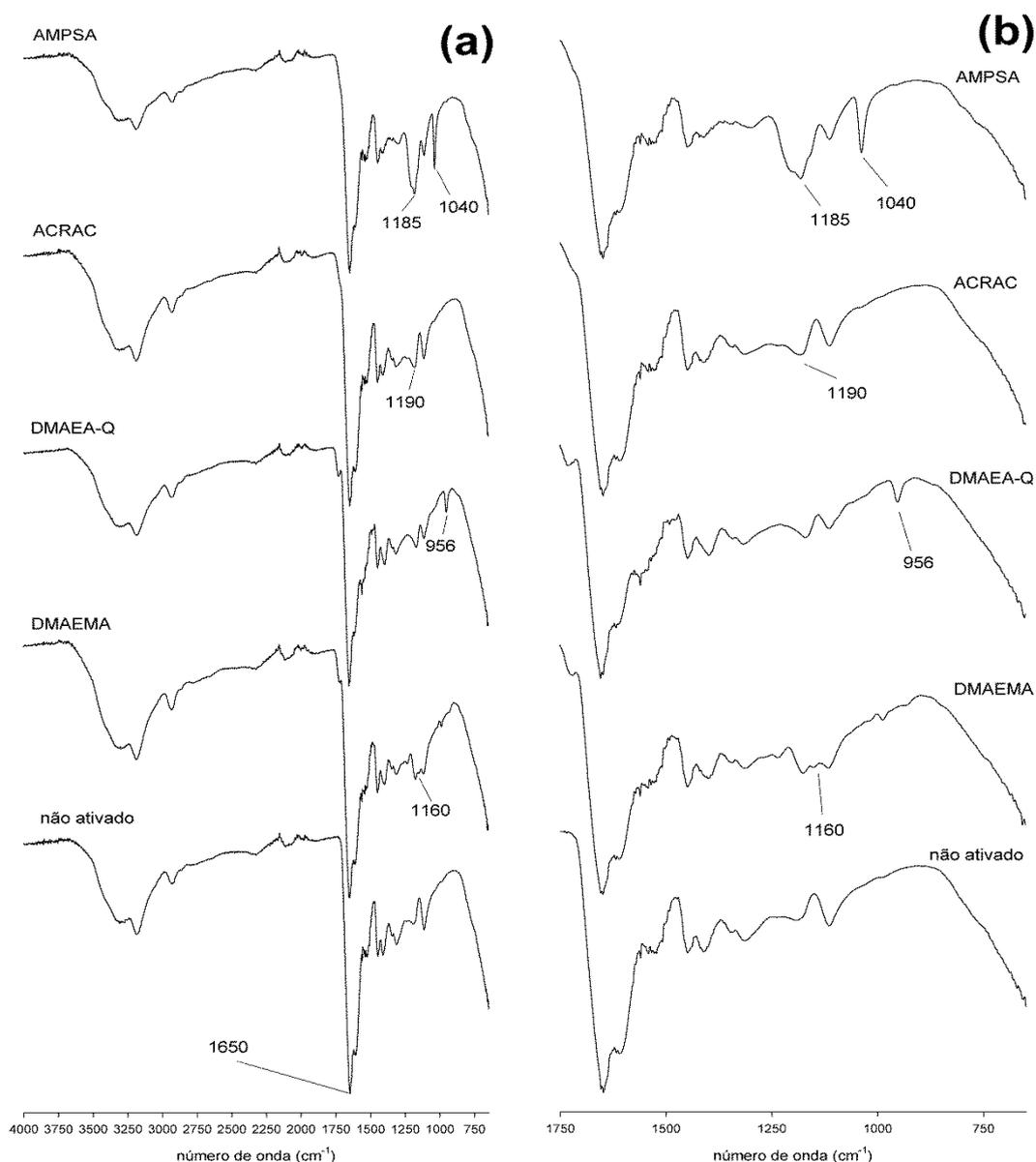
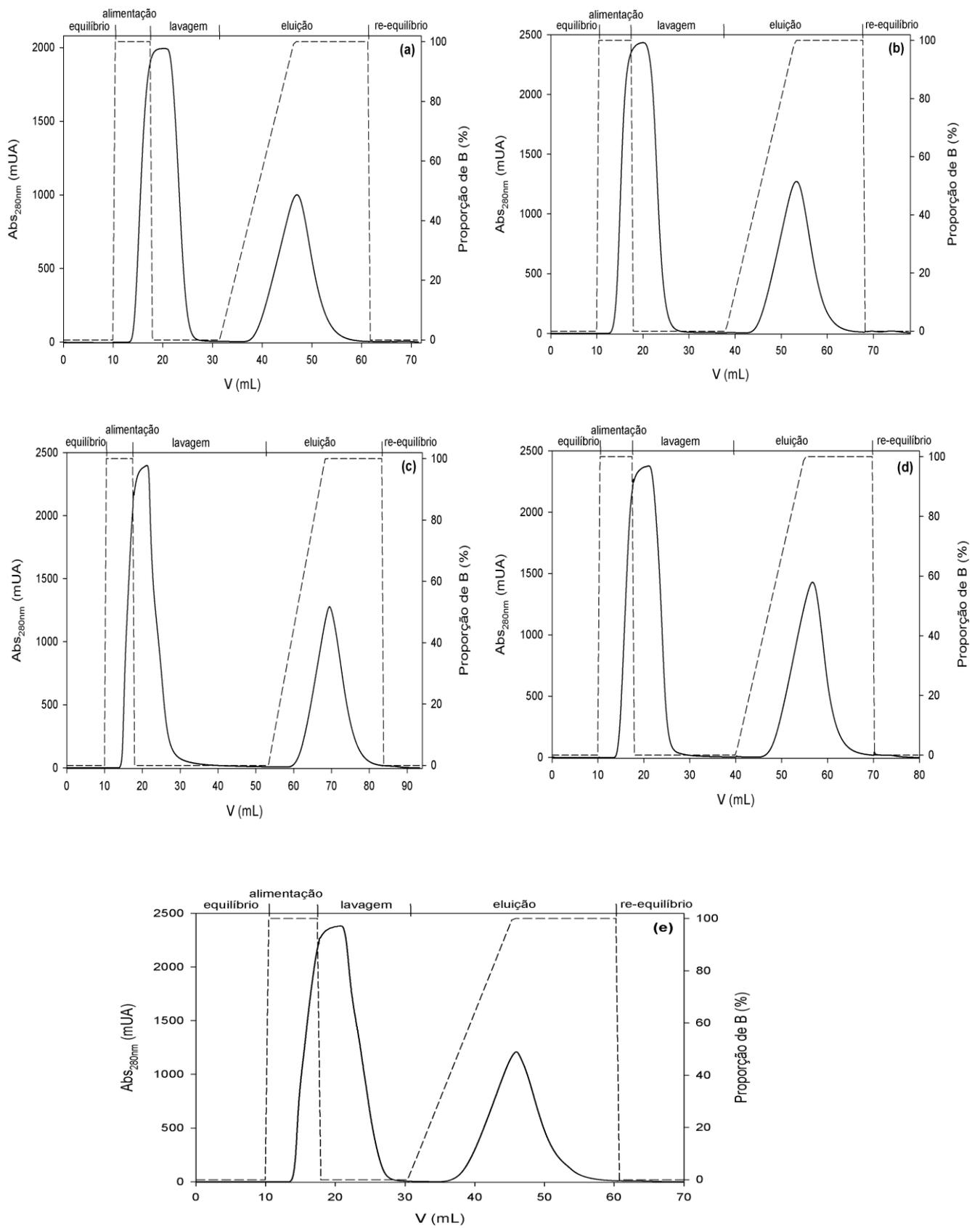


Figura 5: Perfis cromatográficos de purificação obtidos com as diferentes colunas. (a) ACRAC; (b) AMPSA; (c) DMAEMA; (d) DMAEA-Q; (e) Não Ativado

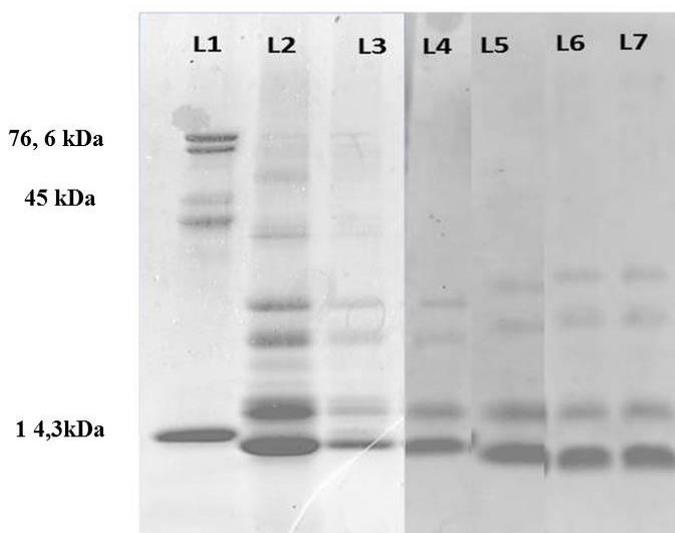


Verificou-se a presença de um único pico de eluição em todas as colunas monolíticas, e que entre as replicatas o comportamento foi o mesmo (dados não apresentados). Isso indica que a condição de eluição usada foi eficiente na remoção do material adsorvido, porém não apresentou diferença nas frações proteicas existentes.

O perfil eletroforético do extrato bruto e dos extratos purificados obtidos são apresentados na Figura 6. A eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE) foi utilizada para verificar qual a massa molar estimada das proteínas presentes em solução. É possível observar que aparecem duas bandas fortes em todas as frações correspondentes a massa molecular próxima a 14,3 kDa do marcador utilizado (no caso a proteína lisozima). Tais bandas tem indicativo de serem as cadeias pesadas (α e α') da jacalina encontradas também em outros estudos (Kabir, et al 1995 e 1998) com massa molar de 12 e 15,4 kDa respectivamente, em uma faixa de pH de 6-9.

Observar-se também que nas frações purificadas além destas bandas fortes aparecem outras bandas fracas, estas podem ser outras isoformas da jacalina que podem aparecer em uma variação de pH de 4,5-9 (Kabir et al., 1995), ainda pode ser outras proteínas, como por exemplo, a Artin M, também conhecida como KM+ ou artocarpina que está presente nas sementes da jaca na concentração de traços, pois representa somente 0,5% das proteínas totais da semente (SILVA, 2008). Isso pode ter ocorrido devido ao processo de purificação, que ocorreu em apenas uma etapa com pH constante e igual em todas as colunas testadas.

Figura 6: Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE, mostrando a pureza da jacalina.



L1= Marcador molecular (Lisozima 14,3 kDa, Canalbumina 76,6 kDa e Albumina 45 kDa); L2= Extrato Bruto; L3= AMPSA; L4= DMAEMA; L5= DMAEA-Q; L6= AACR; L7= Não Ativado

Os resultados para a quantidade de proteína recuperada (MP), atividade hemaglutinante específica (AE) e fator de recuperação (FR) obtidos nos ensaios são apresentados na Tabela 6. Os resultados mostram que há presença de lectinas nas frações coletadas e que estas por sua vez aglutinaram os eritrócitos para todos os grupos sanguíneos testados. Observando o fator de recuperação das proteínas é possível notar que houve variações nas colunas utilizadas. Estes resultados demonstram que a maior parte da proteína recuperada é jacalina na sua isoforma α , pois essa é específica para reconhecimento de resíduos de D-galactose, (Kabir et al., 1998; Sell et al., 2000; Roy et al., 2005), açúcar este encontrado principalmente na membrana de hemácias do grupo sanguíneo B que apresentou o maior fator de recuperação. Quando observamos o mesmo parâmetro, para a aglutinação do grupo sanguíneo A, o menor valor foi verificado ao se usar o criogel não ativado, com um fator de recuperação menor que um, não havendo seletividade da coluna neste caso.

Quando se comparam os resultados obtidos das colunas modificadas com não ativada é possível observar que apesar da massa de proteína total recuperada ser similar, a quantidade de lectinas adsorvidas é menor, indicando menor seletividade na coluna não ativada. Os criogéis ativados exerceram sua função, que é possibilitar uma maior quantidade de lectina adsorvida com funcionalidade de aglutinação de células sanguíneas de espécie humana. Verificou-se que, de modo geral, os criogéis trocadores catiônicos apresentaram melhores valores para o fator de recuperação se comparados aos trocadores aniônicos testados, indicando que alterações no pH de trabalho podem conduzir a melhores resultados.

Kabir et al., (1995), verificou que ao purificar jacalina extraída das sementes de jacas usando cromatografia de afinidade e troca iônica usando uma coluna DEAE-Celulose (2.5 x 50cm) em condições de pH 7,4 PBS nas condições de 0,1M e foram utilizadas solução de eluição de 50mM, 100mM, 150mM, 200mM e 500mM. É possível obter concentrações de 17,9mg, 9,5mg, 9,5mg, 10,8mg e 5,5mg de proteínas. Estes autores conseguiram demonstrar através da Focalização isoelétrica (IEF), usando uma faixa de pH de 3,5-9,5, a presença de duas bandas com massa molecular de 12 e 15,4kDa, estas por sua vez através do teste de hemaglutinação obteve uma forte reação com hemácias do grupo B. Resultados semelhantes foram encontrados no presente estudo. Assim, pode-se afirmar que com as colunas monolíticas produzidas no presente trabalho, conseguiu-se purificar parcialmente lectinas da semente de jaca usando trocadores iônicos.

A partir da Tabela 6 é possível observar que houve reação positiva para todas as frações comprovando a presença de lectinas nas mesmas, uma vez que, as lectinas possuem a habilidade de ao ligar-se com açúcares presentes na membrana de hemácias, formar uma rede, que é então denominada de aglutinação. Estes resultados são favoráveis, uma vez que, os

açúcares presentes nas estruturas dessas células são principalmente o D-galactose e N-acetilgalactosamina, açúcar este de maior afinidade da jacalina (Kabir et al., 1998; Sell et al., 2000; Roy et al., 2005), o que pode sugerir a presença da mesma nos extraídos e purificados.

Tabela 6: Resultados dos testes de hemaglutinação realizados com os grupos ABO.

	C (mg/mL)	MP (mg)	Grupo A			Grupo B			Grupo O		
			Título (HU)	AE (HU/mg/mL)	FR	Título (HU)	AE (HU/mg/mL)	FR	Título (HU)	AE (HU/mg/mL)	FR
Ext. Bruto	1,54	11,54	1024	676,83		1024	676,83		2048	1353,66	
AMPSA	0,23	4,21	256	1126,14	2,13	512	2252,28	4,26	512	2252,28	2,13
ACRAC	0,32	5,33	512	1652,37	2,48	512	1652,37	2,48	1024	2815,05	2,11
DMAEMA	0,42	7,14	1024	1207,69	1,67	512	2415,37	3,35	512	1207,69	0,84
DMAEA-Q	0,36	7,12	256	776,46	1,01	512	1552,91	2,03	1024	3105,83	2,03
Não ativado	0,33	5,75	128	392,26	0,56	512	1584,97	2,28	512	1569,04	1,13

C – concentração de proteína, MP – massa de proteína aplicada/recuperada, AE – atividade específica hemaglutinante, FR – fator de recuperação da atividade.

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho foram produzidos criogéis trocadores iônicos utilizando-se diferentes radicais para tal, que possibilitaram os seus usos com natureza catiônica ou aniônica. Os trocadores iônicos foram avaliados quanto à viabilidade de uso em processos de purificação de lectinas a partir de extratos de sementes de jaca, utilizado a cromatografia de troca iônica. Verificou-se que a ativação dos criogéis alterou suas propriedades de hidratação, mas que o tipo de modificação não levou a diferenças perceptíveis nos criogéis, que apresentaram características semelhantes. Nos testes de hemaglutinação todas as frações coletadas aglutinaram células sanguíneas humanas do grupo sanguíneo ABO enfatizando tratar-se da presença de lectinas no meio. Por meio da análise de SDS-PAGE, identificou-se duas bandas fortes em todas as frações coletadas, indicativo da cadeia pesada da jacalina, já relatada por outros autores. Assim, é possível dizer que as colunas monolíticas supermacroporosas de troca iônica, são capazes de purificar a jacalina das sementes de jaca (*Artocarpus integrifolia*).

7. REFÊRENCIAS

- Albuquerque, D.A.; Martins, G.A.; Campos-Neto, A.; Silva, J.S. The adjuvant effect of jacalin on the mouse humoral immune response to trinitrophenyl and *Trypanosoma cruzi*. *Immunol. Lett.*, 68(2-3):375-381, 1999.
- Arvidsson, P.; Plieva, F. M.; Lozinsky, V. I.; Galaev, I. Y.; Mattiasson, B. (2003). *Journal of Chromatography A*, v.986, 275-290.
- Arvidsson, P.; Plieva, F. M.; Savina, I. N.; Lozinsky, V. I.; Fexby, S.; Bülow, L.; Galaev, I. Y.; Mattiasson, B. (2002). *Journal of Chromatography A*, v.977, 27-38.
- Babac, C.; Yavuz, H.; Galaev, I. Y.; Pişkin, E.; Denizli, A. (2006). *Reactive & Functional Polymers*, v.66, 1263- 1271.
- Banerjee, S.; Chaki, S.; Bhowal, J.; Chatterjee, B.P. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v.421, p.125-134, 2004.
- Barre, A.; Peumans, W. J.; Rossignol, M.; Borderies, G.; Culerrier, R. et al. (2004). *Biochimie*, v.86, 685-691.
- Berruex, L. G.; Freitag, R.; Tennikova, T. B. (2000). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.24, 95-104.
- Bidlingmeyer, B. A.; Warren, Jr., F. V. (1984). *Analytical Chemistry*, v.56, 1583A-1596A.
- Billakanti, J. M.; Fee, C. J. (2009). *Biotechnology and Bioengineering*, v.103, 1155-1163.
- Bradford, M. M. (1976). *Analytical Biochemistry*, v.72, 248-254.
- Boi, C.; Cattoli, F.; Facchini, R.; Sorci, M.; Sarti, G. C. Adsorption of lectins on affinity membranes. *Journal of Membrane Science*, v.273, p. 12-19, 2006.
- Calleri, E.; Marrubini, G.; Massolini, g.; Lubda, d.; De Fazio, S. S. et al. (2004). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.35, 1179-1189.
- Chen, X.; Tolley, H. D.; Lee, M .L. (2010). *Journal of Chromatography A*, v.1217, 3844-3854.
- Çimen, D.; Denizli, A. (2012). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v.93, 29-35.
- Coelho, M. B.; Marangoni, S.; Macedo, M. L. R.. (2007). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v.146, 406-414.

- 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.
- De Simone, S. G.; Santos, R.; Araujo, M. F.; Pinho, R. T. (1994). *Journal of Chromatography A*, v.688, 357-362.
- Dimitrijevic, R.; Stojanovic, M.; Micic, M.; Dimitrijevic, L.; Gavrovic-Jankulovic, M. (2012). *Journal of Functional Foods*, v.4, 636-641.
- Dragan, E. S.; Lazar, M. M.; Dinu, M. V.; Doroftei, F. (2012). *Chemical Engineering Journal*, v.204-206, 198-209.
- Erzengin, M.; Ünlü, N.; Odabaşı, M. (2011). *Journal of Chromatography A*, v.1218, 484-490.
- Etzler, M. E. (1986). Distribution and function of plant lectins. In: *The Lectins, Properties, Functions, and Applications in Biology and Medicine*. Liener, I. E.; Sharon, N.; Goldstein, I. J. (Eds.). Academic Press: New York; p.371-435.
- Ferreira, R. S.; Brito, C. M. G.; Coelho, L. C. B. B.; Paiva, P. M. G. (2007). Identification of lectin in *Spondias tuberosa* endocarp. In: *Anais da 10th IUBMB Conference / XXXVI Annual Meeting of the SBBq*.
- FIDELIS, P.C. Desenvolvimento de um adsorvente contínuo supermacroporoso de troca catiônica para recuperação de lactoferrina de soro de leite. 2011. 87p. Dissertação. Universidade Federal de Viçosa, MG. CDD 22 ed. 664.022
- Fontan, R. C. I. Desenvolvimento e caracterização de trocador catiônico supermacroporoso para a purificação de macromoléculas. 2013. 147 p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.
- Gemeiner, P.; Mislovicová, D.; Tkác, J.; Svitel, J.; Pätoprstý, V. et al. (2009). *Biotechnology Advances*, v.27, 1-15.
- Gilboa-Garber, N.; Susswein, A. J.; Mizrahi, L.; Avichezer, D. (1985). *FEBS Letters*, v.181, 267-270.
- Greenspan, L. (1977). *Journal of Research of the National Bureau of Standards A. Physics and Chemistry*, v.81A, 89- 96.
- Guiochon, G. (2006). *Journal of Chromatography A*, v.1126, 6-49.

- Guiochon, G. (2007). *Journal of Chromatography A*, v.1168, 101-168.
- Guiochon, G.; Beaver, L. A. (2011). *Journal of Chromatography A*, v.1218, 8836-8858.
- Gupalova, T. V.; Lojkina, O. V.; Pàlàgnuk, V. G.; Totolian, A. A.; Tennikova, T. B. (2002). *Journal of Chromatography A*, v.949, 185-193.
- Hage, D.; Ruhn, P. (2005). *An Introduction to Affinity Chromatography*. In: Hage, D. S. (Ed.). *Handbook of Affinity Chromatography*. Boca Raton: CRC Press, p.3-13. (Chromatographic Science Series)
- Hage, D. S.; Cazes, J. (2005). *Handbook of Affinity Chromatography, Second Edition*: Taylor & Francis.
- Hanora, A.; Savina, I.; Plieva, F. M.; Izumrudov, V. A.; Mattiasson, B.; Galaev, I. Y. (2006). *Journal of Biotechnology*, v.123, 343-355.
- Hajizadeh, S.; Kirsebom, H.; Leistner, A.; Mattiasson, B. (2012). *Journal of Separation Science*, v.35, 2978-2985.
- Hermanson, G. T. (2008). *Bioconjugate Techniques*. Academic Press.
- 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.
- Jeyaprakashi, A. A.; Srivastav, A.; Surolia, A.; Vijayan, M. Structural basis for the carbohydrate specificities of artocarpin: variation in the length of a loop as a strategy for generating ligand specificity. *Journal of the Molecular Biology*, v. 338, p. 757-770, Mar. 2004.
- Jeyaprakashi, A. A.; Jayashree, G.; Mahanta, S. K.; Swaminathan, C. P.; Sekar, K.; Surolia, A.; Vijayan, M. Structural basis for the energetics of jacalin-sugar interactions: promiscuity versus specificity. *Journal of the Molecular Biology*, v. 137, p. 181-188, Jan. 2005.
- Jiang, T.; Mallik, R.; Hage, D. S. (2005). *Analytical Chemistry*, v.77, 2362-2372.
- Jungbauer, A.; Hahn, R. (2008). *Journal of Chromatography A*, v.1184, 62-79.
- Jung, W.-K.; Park, P.-J.; Kim, S.-K. (2003). *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v.35, 255-265.
- Kabir, S. (1995). *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, v.27, 147-156.

- Khan, S.; Lindahl, S.; Turner, C.; Karlsson, E. N. (2012). *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.80, 28-38.
- Kim, H. S.; Hage, D. S. (2005). *Handbook of Affinity Chromatography*. Boca Raton: CRC Press.
- Konozy, E. H. E.; Bernnades, E. S.; Rosa, C.; Faca, V.; Greene, L. J.; Ward, R.J; *Archieves of Biochemistry and Biophysics*, v. 410, p. 222-229, 003.
- Kumar, A.; Bansal, V.; Andersson, J.; Roychoudhury, P. K.; Mattiasson, B. (2006). *Journal of Chromatography A*, v.1103, 35-42.
- Laemmli, U. K. (1970). *Nature*, v.227, 680-685.
- Lenhoff, A. M. (2011). *Journal of Chromatography A*, v.1218, 8748-8759.
- Li, Y. R.; Liu, Q. H.; Wang, H. X.; , Ng, T. B. *Biochimica at Biophysica Acta*, v> 1780. P. 51-57, 2008.
- Lima, V. L. M.; Correia, M. T. S.; Cechinel, Y. M. N.; Sampaio, C. A. M.; Owen, J. S.; Coelho, L. C. B. B. (1997). *Carbohydrate Polymers*, v.33, 27-32.
- Lim, S. B.; Chua, C. T.; Hashim, O. H. (1997). *Journal of Immunological Methods*, v.209, 177-186.
- Lozinsky, V. I. (2002). *Russian Chemical Reviews*, v.71, 489-511.
- Lozinsky, V. I.; Galaev, I. Y.; Plieva, F. M.; Savina, I. N.; Jungvid, H.; Mattiasson, B. (2003). *TRENDS in Biotechnology*, v.21, 445-451.
- Luo, Q.; Zou, H.; Zhang, Q.; Xiao, X.; Ni, J. (2002). *Biotechnology and Bioengineering*, v.80, 481-489.
- Maciel, M. I. S.; Cavalcanti, M. S. M.; Napoleão, T. H.; Paiva, P. M. G.; Catanho, M. T. J. A. et al. (2012). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.168, 580-591.
- Mallik, R.; Hage, D. S. (2006). *Journal of Separation Science*, v. 29, 1686-1704.
- Mallik, R.; Jiang, T.; Hage, D. S. (2004). *Analytical Chemistry*, v.76, 7013-7022.
- Miller, G. L. (1959). *Analytical Chemistry*, v.31, 426-428.
- Montgomery, D.C. (2001). *Design and analysis of experiments*, 5th edition. John Wiley & Sons, Inc., New York, 684p.

- Moreira, R.A. Lectinas vegetais: uma abordagem química e físico-química. Tese para Professor Titular da Universidade Federal do Ceará – Fortaleza, 1998.
- Ng, T. B.; Au, T. K.; Lam, T. L.; Ye, X. Y.; Wan, D. C. C. (2002). *Life Sciences*, v.70, 927-935.
- Oliveira, D. K.; Coelho, L. C. B. B.; Paiva, P. M. G. (2000). Different lectins in *Spondias tuberosa* (umbu). In: XXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq).
- Oliveira, J. T. A.; Melo, V. M. M.; Câmara, M. F. L.; Vasconcelos, I. M.; Beltramini, L. M. et al. (2002). *Phytochemistry*, v.61, 301-310.
- Ortega, M.; Sanchez, C.; Chacon, E.; Rendon, J. L.; Estrada, R. et al. (1990). *Plant Science*, v.72, 133-140.
- Ortner, E.K.; Rohwer, E. R. (1999). *Journal of Chromatography A*, v.863, 57-68.
- Ostryanina, N. D.; Vlasov, G. P.; Tennikova, T. B. (2002). *Journal of Chromatography A*, v.949, 163-171.
- Ourth, D. D.; Rose, W. W. (2011). *Aquaculture*, v.321, 191-196.
- Pandey, G.; Fatma, T.; Cowsik, S. M.; Komath, S. S. (2009). *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v.97, 87-93.
- Paredes, B.; González, S.; Rendueles, M.; Díaz, J. M. (2004). *Separation and Purification Technology*, v.40, 243-250.
- Perçin, I.; Aksöz, E. (2012). *Hacettepe Journal of Biology & Chemistry*, v.40, 303-308.
- Petro, M.; Svec, F.; Fréchet, J. M. J. (1996). *Biotechnology and Bioengineering*, v.49, 355-363.
- Petrossian, K.; Banner, L. R.; Oppenheimer, S. B. (2007). *Acta Histochemica*, v.109, 491-500.
- Peumans, W. J.; Van Damme, E. J. M. (1998). Chapter 7: Plant lectins versatile proteins with important perspectives in biotechnology. In: *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, v.15, 199-228.
- Plieva, F. M.; Andersson, J.; Galaev, I. Y.; Mattiasson, B. (2004a). *Journal of Separation Science*, v.27, 828-836.

- Plieva, F. M.; Savina, I. N.; Deraz, S.; Andersson, J.; Galaev, I. Y.; Mattiasson, B. (2004b). *Journal of Chromatography B*, v.807, 129-137.
- Pratap, J. V.; Jeyaprakash, A. A.; Rani, P. G.; Sekar, K.; Surolia, A.; Vijayan, M. Crystal structures of artocarpin, a moraceae lectin with mannose specificity, and its complex with methyl- α -D-mannose: implications to the generation of carbohydrate specificity. *Journal of the Molecular Biology*, v. 317, p. 237-247, Jan. 2002.
- Rahaie, M.; Kazemi, S. S. (2010). *Biotechnology*, v.9, 428-443.
- Roque-Barreira M. C. and Campos-Neto A. (1985) Jacahn: an IgA-binding lectin. *J. Immunol.* 134, 1740-1743.
- Roy, I.; Sardar, M.; Gupta, M. N. (2005). *Biochemical Engineering Journal*, v.23, 193-198.
- Ruffet E., Paquet N., Frutiger S., Hughes G. J. and Jaton J. C. (1992) Structural and electron-microscopic studies of jacalin from jackfruit (*Artocarpus integrifolia*) show that this lectin is a 65 kDa tetramer. *Biochem. J.* 286, 131-134.
- Ruhn, P. F.; Garver, S.; Hage, D. S. (1994). *Journal of Chromatography A.*, v.669, 9-19.
- Santana, M. A.; Santos, A. M. C.; Oliveira, M. E.; Oliveira, J. S.; Baba, E. H. et al. (2008). *International Journal of Biological Macromolecules*, v.43, 352-358.
- Santi-Gadelha, T.; Gadelha, C. A. A.; Aragão, K. S.; Oliveira, C. C.; Mota, M. R. L.; Gomes, R. C. et al. (2006). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.350, 1050-1055.
- Savina, I.; Galaev, I. Y.; Mattiasson, B. (2005b). *Journal of Chromatography A*, v.1092, 199-205.
- Savina, I.; Mattiasson, B.; Galaev, I. Y. (2005a). *Polymer*, v.46, 9596-9603.
- Santos-de-Oliveira, R.; Dias-Baruffi, M.; Thomaz, S.M.O.; Beltramini L.M.; Roque-Barreira, M.C. A neutrophil migration-inducing lectin from *Artocarpus integrifolia*. *J. Immunol.*, 153:1798-1807, 1994.
- Sharon, N.; Lis, H. Lectins: cell-agglutinating and sugar-specific Proteins. *Science*, 177(4053): 949-50, 1972.
- Sharon, N.; Lis, H. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. *Chemical Reviews*, v. 98, n. 2, p. 637-674, Jan. 1998.

- Silva, A. L. C.; Horta, A. C. G.; Moreira, R. A. (2001). *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v.13, 262-269.
- Silva, G. P. da; Roque-Barreira, M. C.; Van Dame, E. J. M. Artin M: a rational substitution for the names artocarpin and KM⁺. *Immunology Letters*, v. 119, p. 114-115, June 2008.
- Silva, H. C.; Nagano, C. S.; Souza, L. A. G.; Nascimento, K. S.; Isidro, R. et al. (2012a). *Process Biochemistry*, v.47, 2347-2355.
- Silva, M. C. C.; Santana, L. A.; Mentele, R.; Ferreira, R. S.; Miranda, A.; Silva-Lucca, R. A. et al. (2012b). *Process Biochemistry*, v.47, 1049-1059.
- Sitohy, M.; Doheim, M.; Badr, H. (2007). *Food Chemistry*, v.104, 971-979.
- Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H. et al. (1985). *Analytical Biochemistry*, v.150, 76-85.
- Srivastava, A.; Shakya, A. K.; Kumar, A. (2012). *Enzyme and Microbial Technology*, v.51, 373-381.
- Sun, S.; Tang, Y.; Fu, Q.; Liu, X.; Guoc, L.; Zhao, Y.; Chang, C. (2012). *International Journal of Biological Macromolecules*, v.50, 1002-1007.
- Takahashi, K. G.; Kuroda, T.; Muroga, K. (2008). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, v.150, 45-52.
- Teixeira-Sá, D. M. A.; Reicher, F.; Braga, R. C.; Beltramini, L. M.; Moreira, R. A. (2009). *Phytochemistry*, v.70, 1965- 1972.
- Teixeira, C. S.; Cavassani, K. A.; Gomes, R. B.; Teixeira, M. J.; Roque-Barreira, M. C.; Cavada, B. S.; Silva, J. S.da; Barral, A.; Barral Neto, M. Potential of KM⁺ lectin in immunization against *Leishmania amazonensis* infection. *Vaccine*, v. 24, n.15, p. 3001-3008, Jan. 2006.
- Tullis, R. H.; Duffin, R. P.; Handley, H. H.; Sodhi, P.; Menon, J. et al. (2009). *Blood Purification*, v.27, 64-69.
- Tüzmen, N.; Kalburcu, T.; Denizli, (2012). *Process Biochemistry*, v.47, 26-33.
- Tyagi, R.; Agarwal, R.; Gupta, M. N. (1996). *Journal of Biotechnology*, v.46, 79-83.
- Trindade, M. B. Purificação, caracterização e estudos estruturais de duas novas lectinas ligantes de quitina das sementes do gênero *Artocarpus*, 2005. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, São Carlos, pp.17.

- Uygun, M.; Uygun, D. A.; Özçalişkan, E.; Akgöl, S.; Denizli, A. (2012). *Journal of Chromatography B*, v.887-888, 73-78.
- Wang, L.; Shen, S.; He, X.; Yun, J.; Yao, K.; Yao, S.-J. (2008). *Biochemical Engineering Journal*, v.42, 237-242.
- Wang, L.; Wang, L.; Zhang, D.; Li, F.; Wang, M. et al. (2013). *Fish & Shellfish Immunology*, v.34, 832-842.
- 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.
- Wu, A. M.; Wu, J. M.; Lin, L. H.; Lin, S. H.; Liu, J. H. Binding profile of *Artocarpus integrifolia* agglutinin (Jacalin). *Life Sciences Research Report*, v. 72, p. 2285, Jan. 2003.
- Yan, L.; Shen, S.; Yun, J.; Yao, K. (2011). *Chinese Journal of Chemical Engineering*, v.19, 876-880.
- Yao, K.; Shen, S.; Yun, J.; Wang, L.; He, X.; Yu, X. (2006a). *Chemical Engineering Science*, v.61, 6701-6708.
- Yao, K.; Yun, J.; Shen, S.; Wang, L.; He, X.; Yu, X. (2006b). *Journal of Chromatography A*, v.1109, 103-110.
- Yao, K.; Yun, J.; Shen, S.; Chen, F. (2007). *Journal of Chromatography A*, v.1157, 246-251.
- Young N. M., Johnston R. A. Z., Szabo A. G. and Watson D. C. (1989) Homology of the D-galactose-specific lectins from *Artocarpus integrifolia* and *Maclura pomiferu* and the role of an unusual small polypeptide subunit. *Arch. Biochem. Biophys.* 270, 596-603.
- Young N. M., Johnston R. A. 2. and Watson D. C. (1991) The amino acid sequences of jacahn and the *Maclura pomifera* agglutinin. *FEBS Lest.* 282, 382-384.
- Yun, J.; Shen, S.; Chen, F.; Yao, K. (2007). *Journal of Chromatography B*, v.860, 57-62.
- Yun, J.; Tu, C.; Lin, D.-Q.; Xu, L.; Guo, Y.; Shen, S.; Zhang, S.; Yao, K.; Guan, Y.-X.; Yao, S.-J. (2012). *Journal of Chromatography A*, v.1247, 81-88.
- Zabka, M.; Minceva, M.; Rodrigues, A. E. (2006). *Chemical Engineering and Processing*, v.45, 150-160.

Zanetti, G. D. Lectina dos rizomas de *Arundo Donax* L.: purificação, caracterização, propriedades, imuno-histoquímica e separação das isoformas. 2007. 262 f. Tese (Doutorado em Botânica) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.