



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

Área de Concentração: Engenharia de Alimentos



**LORENNAM KAMILA DE MELO SOUZA**

**EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO PARCIAL DE LECTINAS DO FEIJÃO-DE-CORDA**  
**(*Vigna unguiculata* L.) POR AFINIDADE COM ÍONS METÁLICOS EM ADSORVENTES**  
**MACROPOROSOS.**

ITAPETINGA-BAHIA

2023

**LORENNA KAMILA DE MELO SOUZA**

**EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO PARCIAL DE LECTINAS DO FEIJÃO-DE-CORDA (*Vigna unguiculata* L.) POR AFINIDADE COM ÍONS METÁLICOS EM ADSORVENTES MACROPOROSOS**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, área de concentração em Engenharia de Alimentos, da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB.

**ORIENTADOR:** DSc. Rafael da Costa Ilhéu Fontan

**CO-ORIENTADORA:** DSc. Renata Cristina Ferreira Bonomo

ITAPETINGA-BAHIA

2023

## FICHA CATALOGRÁFICA

660.634 Souza, Lorena Kamila de Melo.  
S716e Extração e purificação parcial de lectinas do feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* L.) por afinidade com íons metálicos em adsorventes macroporosos. / Lorena Kamila de Melo Souza. – Itapetinga-BA: UESB, 2023.  
52f.

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, área de concentração em Engenharia de Alimentos, da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB. Sob a orientação do Prof. D. Sc. Rafael da Costa Ilhéu Fontan e coorientação da Prof.<sup>a</sup> D. Sc. Renata Cristina Ferreira Bonomo.

1. Lectinas – Extração. 2. Lectinas - Purificação. 3. Feijão-de-corda – Lectinas. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Programa de Pós-Graduação de Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos, *Campus* de Itapetinga. II. Fontan, Rafael da Costa Ilhéu. III. Bonomo, Renata Cristina Ferreira. IV. Título.

**CDD(21): 660.634**

Catálogo na Fonte:

Adalice Gustavo da Silva – CRB 535-5<sup>a</sup> Região  
Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para desdobramentos por Assunto:

1. Íons metálicos
2. Adsorventes macroporosos
3. Proteína

## DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO



Governo do  
Estado da Bahia

## DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

**Título:** “EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO PARCIAL DE LECTINAS DO FEIJÃO-DE-CORDA (*Vigna unguiculata* L.) POR AFINIDADE COM ÍONS METÁLICOS EM ADSORVENTES MACROPOROSOS.”

**Autor (a):** LORENNNA KAMILA DE MELO SOUZA


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

**Coorientador:** Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Renata Cristina Ferreira Bonomo

Aprovada 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<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Rosana Moura de Oliveira  
IF BAIANO

  
Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Vanessa Santos Sampaio  
UESB

  
Prof. Dr. Rafael da Costa Ilhéu Fontan  
Orientador - UESB  
Presidente da Banca

Itapetinga-BA, 07 de março de 2023.

***“Consagre ao Senhor tudo o que você faz, e os seus planos serão bem-sucedidos.”***

***Provérbios 16:3- Bíblia Sagrada.***

*A Deus.*

*A meus pais.*

*As minhas irmãs, família.*

*Aos meus amigos.*

*Ao meu namorado.*

*Dedico!*

## AGRADECIMENTOS

Agradecer primeiramente a Deus por me permitir chegar até aqui.

Nesses dois anos de mestrado, de muito estudo, esforço e empenho, gostaria de agradecer a algumas pessoas que me acompanharam e foram fundamentais para a realização de mais este sonho. Por isso, expresso aqui, através de palavras sinceras, um pouquinho da importância que elas tiveram, e ainda têm, nesta conquista e a minha sincera gratidão a todas elas.

Agradeço aos meus pais José e Maria; às minhas irmãs Letícia e Talytha, por sempre me apoiarem, e por desejarem sempre o melhor para mim, e, principalmente, pelo amor imenso que vocês têm por mim. A vocês, minha família, sou eternamente grata por tudo que sou, por tudo que consegui conquistar e pela felicidade que tenho.

Minha gratidão especial ao Prof. *DSc.* Rafael da Costa Ilhéu Fontan, meu orientador, pela pessoa e profissional que é. Obrigada por sua dedicação, que o fez, por muitas vezes, deixar de lado seus momentos de descanso para me ajudar e me orientar. E, principalmente, obrigada por ter depositado sua confiança em mim ao longo de todos esses anos.

Um agradecimento especial também a todos do laboratório de Engenharia de Processos (LEP), que me ajudaram direta ou indiretamente a conquistar esse objetivo.

Agradecer aos meus avós paternos Expedito e Maria do Nascimento (*in memoriam*) e avós maternos Manuela e Manoel Senhor (*in memoriam*), pelo amor, carinho e estímulo nessa caminhada. Meu avô Manoel Senhor e minha avó Maria do Nascimento estão junto ao pai, mas que sempre estarão no meu coração.

Aos meus familiares, amigos e namorado, quero agradecer por todo suporte, amizade, parceria e momentos de ajuda e alegrias compartilhadas, e que mesmo a distância sempre estiveram comigo, me apoiando e torcendo por mim.

A todos os professores que contribuíram para o meu crescimento profissional. À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos pela oportunidade e por fornecerem as condições de trabalho necessárias para que eu me tornasse mestre. À CAPES, pela bolsa concedida. A todos que não foram citados, mas contribuíram de forma significativa para a realização desse trabalho.

**MUITO OBRIGADA!**

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS .....	x
LISTA DE FIGURAS .....	xi
RESUMO .....	xii
ABSTRACT .....	xiii
INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVOS.....	3
OBJETIVO GERAL.....	3
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	3
REFERÊNCIAS .....	4

### **CAPITULO 1 Purificação parcial de lectinas do feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* L) por colunas macroporosas funcionalizadas com íons metálicos: Importância da obtenção da lectina.....**

1. INTRODUÇÃO.....	8
2. REFERENCIAL TEÓRICO .....	9
<b>2.1 Feijão-de-corda .....</b>	<b>9</b>
<b>2.2. Proteínas em leguminosas .....</b>	<b>9</b>
<b>2.3. Lectinas.....</b>	<b>11</b>
2.4. Função e aplicações das lectinas .....	11
2.4.1. Classificação das lectinas vegetais .....	12
2.4.2. Lectina de semente de leguminosas.....	15
2.4.3. Processos de extração e purificação de lectinas .....	15
<b>2.5. cromatografia de afinidade com íons metálicos .....</b>	<b>17</b>
<b>2.6. Criogéis poliméricos .....</b>	<b>17</b>
2.6.1 Modificações nas superfícies dos criogéis poliméricos para o processo de purificação.	19
REFERÊNCIAS .....	21

### **CAPITULO 2 Síntese e caracterização de matrizes de afinidade por íons metálicos para a purificação de lectinas do feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* L).....**

1. INTRODUÇÃO.....	31
2. METODOLOGIA.....	32
2.1 Feijão-de-Corda.....	32
<b>2.2 Obtenção da farinha do feijão-de-Corda para extração de proteínas.....</b>	<b>32</b>



2.3 Obtenção do extrato do feijão-de-corda .....	32
2.4. Determinação do teor de proteínas solúveis do Extrato .....	33
2.5. Síntese dos Criogéis Monolíticos .....	33
2.6. Ativação e funcionalização do Criogel com íons metálicos.....	34
2.7. Caracterização dos Criogéis .....	34
<b>2.7.1. Capacidade de inchamento e grau de expansão .....</b>	<b>34</b>
<b>2.7.2. Porosidade dos Criogéis .....</b>	<b>35</b>
2.8. Espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) .....	36
2.9. Estudos de adsorção .....	36
2.10. Purificação em batelada.....	37
2.11. Leito monolítico .....	37
2.12. Avaliação do extrato e frações eluídas em batelada e em leito monolítico.....	38
<b>2.12.1 Determinação da concentração de proteína.....</b>	<b>38</b>
<b>2.12.2. A atividade aglutinante .....</b>	<b>38</b>
2.13. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) .....	38
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO-----</b>	<b>39</b>
3.1. Funcionalização dos adsorventes produzidos.....	39
3.2 Caracterização dos criogéis produzidos .....	40
3.3. Espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	41
3.4. Estudo da adsorção em batelada e leito monolítico .....	43
3.5 Atividade hemaglutinante .....	43
3.6. Purificação do extrato do feijão-de-corda em leito monolítico .....	44
3.7 Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE purificação do extrato do feijão.....	46
6. CONCLUSÃO.....	48
7. REFERÊNCIAS .....	49

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Caracterização dos criogéis não funcionalizados e os modificados com cobre ( $\text{Cu}^{+2}$ ) e zinco ( $\text{Zn}^{+2}$ ).....	<b>40</b>
<b>Tabela 2:</b> Análise de adsorção com BSA. ....	<b>43</b>
<b>Tabela 3:</b> Resultados do teste de hemaglutinação realizado em extratos eluídos com Glicina-HCL pH 2,5 em batelada. ....	<b>44</b>
<b>Tabela 4:</b> Resultados do teste de aglutinação realizado em extratos eluídos com Glicina-HCL pH 2,5 nos ensaios em coluna. ....	<b>46</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b> Representação da Produção de um Criogel. ....	<b>18</b>
<b>Figura 2-</b> Fluxograma para obtenção da farinha do feijão-de-Corda. ....	<b>32</b>
<b>Figura 3-</b> Imagens dos Criogéis produzidos. (A) controle sem ativação, (B) Funcionalizado com zinco (C) Funcionalizado com cobre. ....	<b>39</b>
<b>Figura 4-</b> Espectros de FTIR dos Criogéis produzidos. (A): 500-4000 cm <sup>-1</sup> ; (B): 500-2000 cm <sup>-1</sup> -----	<b>42</b>
<b>Figura 5-</b> Perfil de adsorção da purificação do extrato de feijão-de-corda com criogel de cobre por IMAC em sistema cromatográfico Akta Pure. ....	<b>45</b>
<b>Figura 6-</b> Imagem dos géis de eletroforese SDS-PAGE em batelada e Leito monolítico.....	<b>47</b>

## RESUMO

SOUZA, L. K. M. **Extração e purificação parcial de proteínas do Feijão-de-Corda (*Vigna unguiculata* L) por afinidade com íons metálicos em adsorventes macroporosos.** Itapetinga – BA: UESB, 2023. 52p. (Dissertação– Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) \*

Para a obtenção de lectinas a partir do feijão-de-corda, a funcionalização de adsorventes macroporosos com íons metálicos, para uso em cromatografia de afinidade, é considerada uma das técnicas mais eficientes. A indústria de alimentos, conduzida por demandas de mercado, disponibilidade de matéria-prima e crescentes pressões ambientais, busca constantemente inovar em produtos e tecnologias. O interesse em proteínas de leguminosas se dá devido aos benefícios que estes compostos possuem, como uso tecnológico em formulações de alimentos e baixo impacto ambiental. Assim o objetivo nesse trabalho foi extrair e purificar parcialmente lectinas do feijão-de-corda usando-se adsorventes macroporosos de afinidade por íons metálicos ( $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ). Tais materiais foram produzidos, modificados com a imobilização de íons cobre ou zinco e caracterizados, para então ser avaliado o processo de purificação de lectinas. As matrizes produzidas apresentaram elevada capacidade de inchamento, superior a  $10 \text{ kg.kg}^{-1}$ , e grau de expansão, superior a  $10 \text{ L.kg}^{-1}$ , além de porosidade total superior a 85%. A análise de FTIR mostrou que a banda em  $1100 \text{ cm}^{-1}$ , característica de radicais epóxi, diminuiu com o processo de funcionalização. A capacidade adsortiva foi avaliada utilizando-se albumina de soro bovino (BSA), verificando-se que o adsorvente com íons cobre apresentou melhor desempenho,  $44,6 \pm 0,8 \text{ mg}_{\text{BSA}} \cdot \text{g}^{-1}$ , que o adsorvente com zinco,  $39,97 \pm 0,98 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , enquanto a matriz não modificada (controle) apresentou  $24,72 \pm 0,9 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  de capacidade adsortiva. Avaliou-se o uso dos adsorventes produzidos na extração e purificação de lectinas a partir do extrato proteico bruto de feijão-de-corda no processo em batelada. Verificou-se um fator de purificação de 5,6 utilizando-se as matrizes com cobre, 4,1 com a matriz com zinco e 1,0 para a matriz controle, avaliando-se a atividade hemaglutinante específica. Tendo a matriz funcionalizada com cobre apresentado o melhor resultado, testou-se o seu uso em coluna, verificando-se nessa condição um fator de purificação igual a 7,5. As matrizes produzidas apresentaram características promissoras para a purificação de lectinas.

**Palavras-chave:** Purificação, Proteínas, lectinas, feijão-de-corda.

---

\* Orientador (a): Rafael da Costa Ilhéu Fontan, DSc., UESB

## ABSTRACT

SOUZA, L. K. M. **Extraction and partial purification of cowpea proteins (*Vigna unguiculata* L) by affinity with metal ions in macroporous adsorbents**. Itapetinga – BA: UESB, 2023. 52p. (Dissertation– Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) \*

To obtain lectins from cowpea, the functionalization of macroporous adsorbents with metallic ions, for use in affinity chromatography, is considered one of the most efficient techniques, and can be used in several applications. The food industry, driven by market demands, raw material availability and increasing environmental pressures, constantly seeks to innovate in products and technologies. The interest in leguminous proteins is due to the benefits that these compounds have, such as technological use in food formulations and low environmental impact. Thus, the aim of this work was to extract and partially purify cowpea lectins using macroporous adsorbents with affinity for metal ions ( $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ). Macroporous polymeric adsorbents were produced, modified with the immobilization of copper or zinc ions and characterized, so that the lectin purification process could be evaluated. For the purification of the cowpea lectins, cryogels were produced that served as support for the groups of metal ions at the time of purification of the lectins by affinity chromatography. The matrices produced showed high swelling capacity, greater than  $10 \text{ kg.kg}^{-1}$  and degree of expansion, greater than  $10 \text{ L.kg}^{-1}$ , in addition to total porosity greater than 85%. FTIR analysis showed that the band at  $1100 \text{ cm}^{-1}$ , characteristic of epoxy radicals, decreased with the functionalization process. This indicates success in the strategy of using this type of radical present in the polymeric structure for the immobilization of metallic ions. Adsorptive capacity was evaluated using bovine serum albumin (BSA). It was found that the adsorbent with copper ions had the best performance,  $44.6 \pm 0.8 \text{ mgBSA.g}^{-1}$ , with the adsorbent with zinc having an adsorptive capacity of  $39.97 \pm 0.98 \text{ mg.g}^{-1}$ , while the flat matrix (control) presented  $24.72 \pm 0.9 \text{ mg.g}^{-1}$  of adsorptive capacity. The use of adsorbents produced for the extraction and purification of lectins from cowpea crude protein extract in the batch process was evaluated. A purification factor of 5.6 was verified using the matrices with copper, 4.1 with the matrix with zinc and 1.0 for the control matrix, evaluating the specific hemagglutinating activity. As the matrix functionalized with copper presented the best result, its use was tested in a column, verifying in this condition a purification factor equal to 7.5. The matrices produced showed promising characteristics for the purification of lectins.

**Keywords:** Purification, Proteins, lecithins, cowpea.

---

\* Advisor (a): Rafael da Costa Ilhéu Fontan, DSc., UESB.

## 1. INTRODUÇÃO

O feijão é uma das principais leguminosas presentes na dieta dos brasileiros e ocupa lugar essencial na nutrição humana, principalmente por possuir elevado teor de proteínas (20-40%). O feijão-caupi, feijão-de-corda ou feijão macassar (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) destaca-se por sua importância socioeconômica para as famílias das regiões Norte e Nordeste do Brasil. Constitui-se um dos principais componentes da alimentação, nas zonas rural e urbana (FREIRE FILHO, 2019).

Os feijões possuem uma proteína, conhecida como lectina. As lectinas são (glico)proteínas de origem não imune capazes de reconhecer especificamente mono ou oligossacarídeos, ligando-se a estes sem, no entanto, alterar suas estruturas químicas. Diversas evidências diretas e indiretas apontam para uma possível função de defesa das lectinas, dentre as quais podemos citar o fato dessas moléculas serem capazes de reconhecer especificamente carboidratos não existentes em seus organismos de origem, entretanto, encontrados em patógenos ou predadores naturais desses seres. (PEUMANS & VAN DAMME, 2003).

As leguminosas, entre elas os feijões, possuem lectinas (PFAUNMILLER et al., 2013). As lectinas mais estudadas são da família *Leguminosae*. Entretanto, muitas lectinas de outras famílias também têm sido frequentemente isoladas e caracterizadas como, por exemplo, da família *Solanaceae* (PEUMANS et al., 2003), *Euphorbiaceae* (WITITSUWANNAKUL et al., 1998).

As lectinas são chamadas de multifuncionais, apresentando diversas funções, entre elas ação inseticida, fungicida, bactericida, antitumoral. (PEUMANS e VAN DAMME, 2003). Para a obtenção de lectinas de leguminosas, é necessário o uso de técnicas a fim de melhorar a viabilidade para purificação deste nutriente. (OLIVEIRA et al., 2019). Uma das principais técnicas envolvem a purificação de proteínas é cromatografia de afinidade baseada em interações altamente específicas (PFAUNMILLER et al., 2013). É uma técnica que utiliza propriedades físico-químicas para separação dos componentes de uma mistura, a partir da distribuição destes em duas fases, um móvel e outra estacionária que se encontram em íntimo contato (AKDUMAN et al., 2016).

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, 2020). Técnicas cromatográficas são as mais importantes no desenvolvimento de processos de purificação de biocompostos, compondo em média de duas a três etapas destes (LENHOFF, 2011).

A cromatografia de afinidade é uma das estratégias utilizadas para purificação de macromoléculas. As misturas bioquímicas tem naturalmente diferenças estruturais que favorecem uma interação altamente específica entre antígeno e anticorpo, enzima e substrato, ou receptor e ligante. Macromoléculas biológicas, como enzimas e outras proteínas, interagem com outras moléculas com alta especificidade através de vários tipos diferentes de ligações e interações. (PHARMACIA BIOTECH, 1999). A elevada seletividade da cromatografia de afinidade é conseguida ao se permitir que a molécula desejada interaja com a fase estacionária e sofra uma ligação reversível dentro da coluna a fim de ser separada do material indesejado. A seletividade sempre ocorre quando o material indesejado não interage com a coluna e elui, portanto, primeiro. (NARAYANAN, 1994).

A purificação cromatográfica de afinidade de lectinas requer suportes porosos, devido ao seu alto peso molecular (EROL et al., 2019). Os criogéis são materiais poliméricos macroporosos com canais interconectados, sendo uma alternativa aos suportes particulados convencionais na purificação e muito eficientes. (GHANEM et al., 2013).

A seletividade do método é garantida pela especificidade única bio-inerente à interação molécula e alvo. A dependência absoluta da interação de afinidade em reconhecimento biológico, em vez de propriedades físico-químicas, implica que esta técnica preserva as atividades biológicas e imunológicas dos produtos isolados (NARAYANAN, 1994).

Dessa forma, dado o crescente interesse do uso das lectinas pelas indústrias alimentar e farmacêutica, o objetivo nesse estudo é extrair e purificar lectinas do Feijão-de-Corda (*Vigna unguiculata* L.) com colunas macroporosas funcionalizadas com íons metálicos para o uso em cromatografia de afinidade.

## 1. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

O trabalho tem como principal objetivo a purificação parcial de lectinas do feijão-de-corda (*Vigna unguiculata L.*) por cromatografia de afinidade com íons metálicos.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver adsorventes poliméricos macroporosos monolíticos com íons metálicos para serem utilizados na cromatografia de afinidade;
- Caracterizar os adsorventes poliméricos macroporosos
- Obter lectinas presente no feijão-de-corda, utilizando-se criogéis ativados com íons metálicos por cromatografia de afinidade;
- Avaliar a purificação da lectina do feijão-de-Corda em diferentes íons metálicos, caracterizando os extratos obtidos.



## 2. REFERÊNCIAS

- AKDUMAN, B. et al. Purification of yeast alcohol dehydrogenase by using immobilized metal affinity cryogels. **Materials Science & Engineering C**, v. 33, p. 4842-4848, 2016.
- ALONSO, R.; GRANT, G.; MARZO, F. Thermal treatment improves nutritional quality of pea seeds (*Pisum sativum* L.) without reducing their hypocholesterolemic properties. **Nutr. Res.**, v. 21, p. 1067-1077, 2011.
- ANDRADE, A. R. et al. A. Disponibilidade térmica para diferentes culturas agrícolas em região de clima subtropical úmido obtida através da utilização de índice bioclimático. **Geosul**, Florianópolis, v. 32, n. 64, p. 66-83, set. 2017. ISSN 2177-5230. Disponível em: Acesso em: 22 nov. 2021. doi:<http://dx.doi.org/10.5007/2177-5230.2017v32n64p66>.
- EROL, B.; EROL, K.; GÖKMEŞE, E. The effect of the chelator characteristics on insulin adsorption in immobilized metal affinity chromatography. **Process Biochemistry**, v. 83, p. 104-113, 2019.
- FREIRE FILHO F.R. **Feijão-caupi no Brasil: produção, melhoramento genético, avanços e desafios Teresina**: Embrapa Meio-Norte, 2011. 84 p. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/916831/1/feijaocaupi.pdf>>. Acesso em: 22. nov. 2019.
- GHANEM A, HEALEY R, ADLY FG. Current trends in separation of plasmid DNA vaccines: A Review. *Analytica Chimica Acta*. 2013;760;1-15.
- GUIOCHON, G.; BEAVER, L. A. (2020). **Journal of Chromatography A**, v.1218, 8836-8858.
- LENHOFF, A. M. (2011). **Journal of Chromatography A**, v.1218, 8748-8759
- NARAYANAN, S. Preparative affinity chromatography of proteins. **Journal of Chromatography**. 658: 237-258, 1994.
- OLIVEIRA et. al. Increased protein content of chickpea (*Cicerarietinum* L.) inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi and nitrogen-fixing bacteria under water deficit conditions. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, e. 97, p. 4370-4385, Society of Chemical Industry, 2019.
- OLIVEIRA, D. K. et al (2017). Different lectins in *Spondias tuberosa* (umbu). In: XXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq).
- PANDEY, G. et al (2009). *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v.97, 87-93.
- PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Chapter 7: Plant lectins versatile proteins with important perspectives in biotechnology. In: **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v.15, 199-228, 2013.
- PFAUNMILLER, E. L. et al (2013). Affinity monolith chromatography: a review of principles and recent analytical applications. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, p. 2133-2145, 2013.
- PHARMACIA BIOTECH. **Protein purification handbook**. Sweden, P.97, 1999.
- WITITSUWANNAKUL, R. et al. A. Lectin from the bark of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Phytochemistry*, v. 47, n. 2, p. 183-187, 1998.

---

**REVISÃO SOBRE LECTINAS: IMPORTÂNCIA, USO E TÉCNICAS DE  
OBTENÇÃO.**

---

## RESUMO

SOUZA, L. K. M. **Revisão sobre lectinas: importância, uso e técnicas para obtê-las.** Itapetinga – BA: UESB, 2023. 52p. (Dissertação – Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) \*

Entre as proteínas do feijão-de-corda, temos as lectinas. As lectinas são proteínas capazes de interagir de forma seletiva e reversível com carboidratos. As interações proteína-carboidrato estão envolvidas em muitos processos biológicos, atuando como mediadoras de várias atividades celulares. Lectinas são proteínas ou glicoproteínas de origem não imune que apresentam pelo menos um domínio não catalítico que reconhecem e liga-se de maneira reversível às moléculas específicas de carboidratos e possuem habilidade de aglutinação de células animais e/ou células vegetais e ação de precipitar glicoconjugados. São distribuídas na natureza, estando presente em sua maioria na família Leguminosae, no qual uma variedade de lectinas deste grupo já foi isolada e caracterizada. Uma das principais técnicas para a purificação de lectinas, é a cromatografia de afinidade baseada em interações não específicas. A cromatografia de afinidade é ideal para a captura ou purificação intermediária de biomoléculas, podendo ser usada sempre que houver ligantes adequados para a proteína de interesse. A obtenção de leguminosas com maior conteúdo de lectinas a fim de melhorar a viabilidade para extração deste nutriente pode ser possível através de técnicas que melhorem essa purificação. Portanto, esse estudo objetivou a importância da purificação de lectinas, uso e técnicas para obtenção da mesma, a partir de colunas macroporosas funcionalizadas com íons metálicos por cromatografia de afinidade.

**Palavras-chave:** Lectinas, feijão-de-corda, purificação, glicoproteínas.

---

\* Orientador (a): Rafael da Costa Ilhéu Fontan, DSc., UESB

## **ABSTRACT**

SOUZA, L. K. M. **Review on lectins: importance, use and techniques to obtain them.** Itapetinga – BA: UESB, 2023. 52p. (Dissertation – Master in Food Science and Engineering) \*

Among the proteins in cowpeas, we have lectins. Lectins are proteins capable of interacting selectively and reversibly with carbohydrates. Protein-carbohydrate interactions are involved in many biological processes, acting as mediators of various cellular activities. Lectins are proteins or glycoproteins of non-immune origin that have at least one non-catalytic domain that recognize and reversibly bind to specific carbohydrate molecules and have the ability to agglutinate animal cells and/or plant cells and to precipitate glycoconjugates. They are distributed in nature, being mostly present in the Leguminosae family, in which a variety of lectins from this group have already been isolated and characterized. One of the main techniques for the purification of lecithins is affinity chromatography based on non-specific interactions. Affinity chromatography is ideal for the capture or intermediate purification of biomolecules and can be used whenever there are suitable ligands for the protein of interest. Obtaining legumes with a higher lectin content in order to improve the viability for extracting this nutrient may be possible through techniques that improve this purification. Therefore, this study focused on the importance of lectin purification, use and techniques for obtaining it, from macroporous columns functionalized with metal ions by affinity chromatography.

**Keywords:** Lectins, cowpeas, purification, glycoproteins.

---

\* Advisor (a): Rafael da Costa Ilhéu Fontan, DSc., UESB

## 1. INTRODUÇÃO

Leguminosas são alimentos de grande importância na garantia da segurança alimentar e devem estar presentes na alimentação diária (BRASIL, 2017). Os feijões são as leguminosas muito consumidas. Apresentam nutrientes de excelente qualidade, pois são ricos em proteínas, lipídios, carboidratos, vitaminas e sais minerais, tornando estes alimentos indispensáveis na dieta diária (MONTROYA et al., 2010). Embora façam parte do hábito alimentar de todos os países há milhares de anos, apenas recentemente seu uso e sua importância nutricional e funcional foram valorizados e intensamente investigados (CODA et al., 2019).

Lectinas são (glico)proteínas de origem não imune capazes de reconhecer especificamente mono ou oligossacarídeos, ligando-se a estes sem, no entanto, alterar suas estruturas químicas. (PEUMANS E VAN DAMME, 2004). 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).

Desde a sua descoberta, centenas dessas proteínas têm sido isoladas e caracterizadas em algum detalhe com respeito à sua especificidade de ligação a carboidratos, estrutura molecular e propriedades bioquímicas (PFAUNMILLER et al., 2013). Até o ano de 1970 elas tinham atraído pouca atenção. Essa atitude mudou com a demonstração de que lectinas são ferramentas extremamente úteis para a investigação de carboidratos na superfície celular, em particular, nas células malignas (SHARON E LIS, 2004).

A purificação de lectinas pode melhorar através de técnicas, envolvendo a extração e purificação, como o uso da cromatografia de afinidade baseada em interações altamente específicas e reversíveis, entre pares de materiais biológicos (PFAUNMILLER et al., 2013).

Uma das principais técnicas que envolve a purificação de proteínas é cromatografia de afinidade baseada em interações não específicas e reversíveis entre pares de materiais biológicos (enzima, substrato, enzima-inibidor, antígeno-anticorpo), garantindo uma maior seletividade, devido a características estereoquímicas e tipológicas específicas apresentadas pelas proteínas (PFAUNMILLER et al., 2013).

Dessa forma, com o crescente interesse do uso das lectinas e das técnicas cromatográfica o objetivo do estudo é fazer uma revisão sobre a importância das lectinas e técnicas e aplicações usadas para purificação de lectinas.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Feijão-de-corda

O feijão-de-corda ou feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) é uma cultura de origem africana, que foi introduzida no Brasil na segunda metade do século XVI, pelos colonizadores portugueses, no estado da Bahia (FREIRE FILHO, 1988). O feijão-de-corda é classificado como uma dicotiledônea pertencente à ordem Fabales, família Fabaceae, subfamília Faboideae, tribo Phaseoleae, subtribo Phaseolinae, gênero *Vigna*, espécie *Vigna unguiculata* (L.) Walp. (PADULOSI e NG, 1997).

No Brasil, o feijão-de-corda é cultivado predominantemente no sertão semi-árido da região Nordeste e em pequenas áreas na Amazônia (MAIA, 1996). No Nordeste, a produção e a produtividade são de 429.375 toneladas e 303,5 kg.ha<sup>-1</sup>, respectivamente. Os maiores produtores são os Estados do Ceará, Piauí, Bahia e Maranhão, os quais também apresentam as maiores áreas plantadas. A produção dos grãos, secos ou verdes, é destinada principalmente para o consumo humano in natura, na forma de conserva ou desidratado (EMBRAPA MEIO NORTE, 2020).

O feijão, como a maioria das sementes de leguminosas, requer tratamento térmico antes do seu consumo, a fim de inativar fatores antinutricionais como inibidores de amilases e lectinas e também melhorar a digestibilidade da proteína e a sua palatabilidade (BRASIL, 2017).

A qualidade nutricional das proteínas das leguminosas é influenciada pelo gênero, espécie, variedade botânica, concentração de fatores antinutricionais, tempo de estocagem, tratamento térmico e, em geral, é inferior àquela da proteína de origem animal. No entanto, o alto custo da proteína animal faz com que as proteínas vegetais sejam o principal componente da dieta de diversas populações (CODA et al., 2019).

### 2.2 Proteínas em leguminosas

As principais fontes de proteína vegetal são sementes de cereais e leguminosas. As leguminosas (e algumas oleaginosas) geralmente têm de 30 a 50% do seu peso seco de proteína, enquanto os cereais têm um pouco menos, cerca de 10%. O teor proteico e a produção são altos, porém, o valor nutritivo da proteína não é satisfatório por apresentar teores baixos de alguns aminoácidos essenciais limitantes. Esses aminoácidos são os sulfurados, a metionina, a cisteína e a cistina, além do triptofano. Também apresentam baixa digestibilidade, quando comparados às proteínas de origem animal (ALONSO et al., 2011).

Um dos fatores a interferir na baixa digestibilidade das proteínas do feijão cru é a presença dos inibidores de proteases. Embora estes pareçam ser geralmente inativados durante o

cozimento, há relatos na literatura de atividade residual após o processamento desta leguminosa (ANDRADE et al., 2018), e também um outro fator seria a composição de suas proteínas.

As variações no teor de proteína bruta em sementes de feijão encontradas situam-se na faixa de 25 a 40% (PHILLIPS *et al.*, 2013); no caso do feijão e da soja encontram-se valores superiores a 38% (ANDRADE et al., 2018). Entre as principais frações solúveis, as globulinas e as albuminas representam, em média, 75% do total, sendo que a proporção entre essas duas frações varia de acordo com a variedade cultivada e a qualidade protéica está relacionada ao teor relativo de cada uma delas (CRUZ et al., 2016). Em algumas situações, tem sido observada relação positiva entre a adubação nitrogenada e o acúmulo de proteínas na semente de feijão; plantas adubadas com altas doses de N produziram sementes com maior teor de proteínas em relação às plantas adubadas com baixas doses deste nutriente (GOMES et al., 2005).

As leguminosas com fins alimentares desempenham um papel importantíssimo, fornecendo, um ponto de vista global, cerca de 80% da energia e 65% das proteínas alimentares. São, cada vez mais, uma fonte alimentar a explorar, como suplemento na alimentação humana, ou mesmo como fonte alimentar principal. (IQBAL et al., 2013).

As proteínas de leguminosas não são apenas fonte de componente construtivo e energético (aminoácidos), mas também apresentam um papel bioativo, pois podem ser precursoras de peptídeos ativos biologicamente com várias funções fisiológicas (DURANTI, 2006).

A proteína é o nutriente mais caro em uma dieta, porém, comparado à proteína animal, a proteína vegetal é mais barata, se tornando uma maneira mais acessível de inclusão no plano alimentar. Desta forma, o feijão-caupi, por possuir em média 22% de proteína, é uma maneira em que populações podem suprir suas necessidades de proteína (PHILLIPS *et al.*, 2013).

As proteínas são necessárias em uma dieta saudável por permitir o crescimento e manutenção das proteínas codificadas pelo genoma, assim como os compostos nitrogenados, que também fazem parte da estrutura de um indivíduo (WHO et al, 2017). A ingestão de proteína inferior ao recomendado pode provocar diversas alterações fisiológicas no organismo, incluindo deficiência no metabolismo mineral, por exemplo a absorção gastrointestinal de cálcio, e retardo no crescimento corporal (ORWOLL *et al.*, 1992). Portanto, os indivíduos deverão consumir proteína suficiente para suprir sua demanda metabólica, que depende de vários fatores, como: idade, sexo, composição corporal, estilo de vida, entre outros (MAHAN, ESCOTT-STUMP, 2020).

Estruturalmente, as proteínas são moléculas formadas a partir da desidratação de aminoácidos. A classificação desses aminoácidos, bioquimicamente, se refere à estrutura química da cadeia lateral (NELSON; COX, 2019).

### 2.3 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. 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-manose, D-galactose, N-acetil-D-galactosamina, N-acetil-D-glicosamina (VAN DAMME et al., 2004).

A definição mais aceita de lectinas é que elas são proteínas ou glicoproteínas de origem não imune que têm no mínimo um sítio de ligação não catalítico, chamado domínio lectina, que reconhece de forma reversível e específica a mono- e oligossacarídeos sem alterar a estrutura covalente de quaisquer de seus ligantes. (NELSON; COX, 2019). 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 (NELSON; COX, 2019). 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., 2013), Euphorbiaceae (WITITSUWANNAKUL et al., 1998), Labiateae e Moraceae (MOREIRA et al., 1998) e outras.

Desde a sua descoberta, centenas dessas proteínas têm sido isoladas e caracterizadas em algum detalhe com respeito à sua especificidade de ligação a carboidratos, estrutura molecular e propriedades bioquímicas (PEUMANS et al., 1998) e até o ano de 1970 elas tinham atraído pouca atenção. Essa atitude mudou com a demonstração de que lectinas são ferramentas extremamente úteis para a investigação de carboidratos na superfície celular, em particular, nas células malignas (SHARON E LIS, 2004).

#### 2.3.1 Função e aplicações das lectinas

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, 2017).



As lectinas apresentam grande estabilidade estrutural em geral, resultado da estrutura globular compacta, agregação molecular e glicosilação. Para alterar estruturalmente estas proteínas é necessária a interferência de fatores como altas temperaturas, pH e ação de enzimas proteolíticas que alteram o seu desdobramento através da quebra de ligações de hidrogênio, iônicas e covalentes responsáveis pela manutenção da sua estrutura. Algumas lectinas quando submetidas ao aquecimento podem não perder suas propriedades biológicas (PAIVA et al., 2007).

Tem-se verificado diversas funções para as lectinas, como a ação inseticida (COELHO et al., 2010), fungicida e bactericidas (SITOHY et al., 2007), antitumoral (PETROSSIAN et al., 2017). 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; KAZEMI, 2010). Durante as duas últimas décadas, lectinas expressas abundante e constitutivamente vem sendo identificadas em muitas espécies vegetais e mostrando grande diversidade de estrutura molecular e especificidade a açúcares. As lectinas são, portanto, as proteínas de plantas de melhor estrutura tridimensional conhecida (PAIVA et al., 2007).

As lectinas vegetais são sintetizadas durante o desenvolvimento da semente juntamente com outras proteínas de estoque, e no decorrer do desenvolvimento são levadas para os corpos proteicos (TRINDADE, 2005). Dentro das células, foram identificadas no citoplasma e no núcleo (VAN DAMME et al., 2004), mas também verificadas no espaço extracelular (BATISTA, 2008).

Além das sementes, lectinas também podem ser isoladas em menores proporções de cascas, folhas, grãos de pólen, raízes, frutos, caules e rizomas (CHRISPEELS et al., 1991). A biossíntese das lectinas normalmente segue a via secretora onde sua síntese ocorre nos ribossomos, são direcionadas para o retículo endoplasmático, posteriormente são transportadas para o complexo de Golgi, seguindo para os vacúolos (CARNEIRO; HALLA, 2011). Comumente, elas sofrem modificações co-traducionais como N-glicosilação; e pós- traducionais tais como permutação e clivagem proteolítica para remoção de peptídeos-sinais e separação em cadeias (RUDIGER; GABIUS, 2001; TRINDADE, 2005; VAN DAMME et al., 2004).

#### **2.4.1 Classificação das lectinas vegetais**

Três sistemas de classificação das lectinas vegetais são utilizados atualmente levando-se em consideração a sua estrutura tridimensional, a especificidade a açúcares e

as relações evolutivas (HAJTÓ et al., 2015).

Quanto à estrutura tridimensional tem-se:

(A) **Merolectinas**, lectinas de pequeno tamanho e que possuem um único domínio reconhecedor de carboidrato sendo assim, incapazes de precipitar glicoconjugados ou aglutinar células.

(B) **Hololectinas** consistem de moléculas com no mínimo dois domínios idênticos ou bastante homólogos que ligam-se ao mesmo carboidrato ou à açúcares de estruturas bastante similares.

(C) **Quimerolectinas** possuem ao menos dois domínios com atividades distintas: um capaz de se ligar a carboidratos ou glicoconjugados e outro domínio distinto e bem definido, capaz de exercer uma atividade enzimática ou outra atividade biológica qualquer.

(D) **Superlectinas** correspondem a um tipo especial de quimerolectinas, onde ao menos dois domínios são ligantes de carboidratos, no entanto, apresentam especificidades distintas.

(E) **Multilectinas** possuem dois ou mais sítios idênticos de ligação a açúcares, mas que podem se ligar a carboidratos diferentes.

A classificação quanto à especificidade por açúcar é baseada no monossacarídeo que causa a maior inibição da aglutinação de eritrócitos induzida pela lectina (HAJTÓ et al., 2005).

As lectinas foram agrupadas primeiramente em ligantes L-fucose, D-glicose/D-manose, D-galactose/N-acetil-D-galactosamina. Posteriormente novos grupos foram criados levando-se em conta substituições no anel, como no caso de N-acetil-D-glicosamina e ácido N-acetilneuramínico (MOURA, 2007; RUDIGER, 1998).

Dependendo da especificidade, a lectina irá se ligar seletivamente a um desses açúcares citados, que são constituintes típicos de superfícies de células eucarióticas (LIS & SHARON, 1998; MOURA, 2007).

Lectinas ainda podem exibir dupla especificidade combinando-se simultaneamente com diferentes açúcares. Um pequeno número de lectinas interage com monossacarídeos de diferentes grupos de especificidade por meio do mesmo sítio ligante (VAN DAMME et al., 1998). A seletividade de ligação com o açúcar é conseguida através de pontes de hidrogênio, forças de van der Waals e interações hidrofóbicas entre o açúcar e o sítio de ligação da lectinas (PAIVA et al., 2017) podendo o açúcar ser componente de um glicoconjugado, tal como glicoproteína, glicolípídeo e polissacarídeo, que pode ser carboidrato proveniente da planta ou de exógenos.

Levando em consideração suas sequências de aminoácidos e semelhanças estruturais, foi possível subdividir as lectinas em sete famílias relacionadas estrutural e evolutivamente, o que indica que plantas desenvolveram um número limitado de motivos de ligação à carboidratos (PEUMANS, et al., 2000, citado por VAN DAMME et al., 2004):

(A) **Lectinas de leguminosas** encontradas em plantas leguminosas e são semelhantes quanto às características físico-químicas (DAMICO, 2002). São similares também no que diz respeito às estruturas primária e terciária sendo que, suas especificidades e estruturas quaternárias variam amplamente (LORIS et al., 1998).

(B) **Lectinas ligadoras de quitina** ligam-se à quitina e apresentam estrutura similar à heveína – proteína pequena, rica em resíduos de cisteína (PARIJS et al., 1990). São encontradas em cinco famílias não relacionadas taxonomicamente: Gramineae, Solanaceae, Urticaceae, Papaveraceae e Amaranthaceae. (DAMICO, 2002) e muitas apresentam atividade antifúngica. Exemplo: UDA – aglutinina de *Urtica dioica*. Vale destacar que há lectinas que se ligam à quitina, mas não são semelhantes à heveína. Deste modo, não são inseridas no grupo.

(C) **Proteínas inativadoras de ribossomos (RIP's) do tipo 2 e Lectinas relacionadas**, conhecidas por serem potentes agentes citotóxicos. Elas têm atividade catalítica e podem inativar os ribossomos eucarióticos pela clivagem de uma ligação N-glicosídica de um resíduo de adenina no RNA. Ricina e abrina são dois exemplos conhecidos (DAMICO, 2002).

(D) **Lectinas ligadoras de manose em monocotiledôneas** são encontradas em monocotiledôneas e se ligam apenas à manose. Têm sequência e estrutura tridimensional semelhantes (DAMICO, 2002).

(E) **Lectinas semelhantes à Jacalina** apresentam estrutura semelhante à jacalina – uma lectina isolada de *Artocarpus integrifolia*, a jaca. Essa família compreende dois subgrupos: as lectinas de sementes da família Moraceae - específicas para N-acetilglicosamina, e as lectinas da família Convolvulaceae - específicas para manose e maltose (ZANETTI, 2007).

(F) **Lectinas semelhantes à Amarantina**, presentes nas amarantáceas, apresentam homologia quanto à estrutura primária e são específicas para N-acetil-D-galactosamina e não são glicosiladas (ZANETTI, 2007).

(G) **Lectinas de Cucurbitáceas** que normalmente são glicosiladas e contêm um domínio específico para quitina, sem apresentar o domínio heveína (ZANETTI, 2010) característica de outras lectinas específicas para quitina.

#### **2.4.2 Lectina de semente de leguminosas**

Há muito tempo, sementes de plantas da família Leguminosae são conhecidas por serem uma fonte abundante de lectinas (CAVADA, 1996). As lectinas dessa família estão entre as proteínas vegetais mais estudadas, pois correspondem de 2 a 10% das proteínas solúveis de sementes maduras. (CHEVREUIL et al., 2019).

O termo 'lectinas de leguminosas' refere-se a um tipo particular de lectinas de plantas que são encontradas exclusivamente na família Leguminosae. Porém convém destacar que nem todas as lectinas encontradas em leguminosas pertencem a esse grupo (VACARI, 2020).

A partir da comparação de mais de 30 sequências completas de aminoácidos, foi estabelecido que as lectinas de leguminosas compõem uma família bem conservada de proteínas. Esta homologia é impressionante quando a estrutura tridimensional de algumas dessas lectinas são analisadas (CAVADA et al., 1996). ConBr, a lectina isolada das sementes de *Canavalia brasiliensis*, tem sua estrutura cristalográfica definida, apresentando 99% da sequência de aminoácidos idêntica a de ConA e a mesma especificidade por glicose/manose (RUSSI, 2010).

As lectinas de leguminosas normalmente são constituídas de duas ou quatro subunidades de 25 a 30 kDa (geralmente 220 a 250 resíduos de aminoácidos por monômeros) e a interação entre a proteína e o carboidrato geralmente se torna estável na presença de íons  $\text{Ca}^{++}$  e  $\text{Mn}^{++}$  ligados a lectina. Além disso, essas lectinas, embora com diferentes afinidades de reconhecimento a carboidratos, possuem propriedades bioquímicas e físico-químicas semelhantes apresentando um grau de homologia considerável entre as suas sequências de aminoácidos. Apesar das semelhanças estruturais, estas proteínas tem diferentes atividades biológicas, ou ainda para uma dada atividade, diferentes perfis de resposta (CAVADA et al. 2017). Outros metais de transição também podem contribuir para a estabilidade dos sítios de ligação da lectina a carboidrato sendo que a remoção dos íons causam mudanças conformacionais.

#### **2.4.3 Processos de extração e purificação de lectinas**

A separação e purificação de uma determinada proteína, pode ser feita com base em uma ou mais características da sua molécula que as diferenciem dos restantes constituintes da amostra. Assim, pode-se recorrer a diferentes métodos, tais como: precipitação com base em diferenças de solubilidade em função do pH, força iônica e constante dielétrica do solvente; filtração em gel e centrifugação em gradiente de densidade, com base em diferenças de dimensão molecular; cromatografia de troca iônica com base em diferenças de carga molecular;

cromatografia de afinidade, com base nas interações específicas entre as moléculas e utilização de íons metálicos (ACTAS BIOQUÍMICA, 1991).

O isolamento e purificação de proteínas é alicerçado pelos estudos das características físico-químicas, estruturais, bem como suas propriedades biológicas e é estimulado pela sua potencial utilização em diversas áreas da medicina clínica, bem como em pesquisa química e biológica (BANERJEE et al., 2004). Tratam-se de técnicas específicas, que devem ser projetadas para cada proteína individualmente, uma vez que se faz necessário aplicar estratégias cada vez mais sensíveis para alcançar a separação desejada em pequenas diferenças, a fim de se obter proteínas extremamente puras. (SANTANA et al., 2008),

A forma mais comum de efetuar separações biosseletivas é por cromatografia de afinidade, sendo esta, a segunda técnica de purificação mais usada, dentre os métodos cromatográficos existentes, devido ao alto grau de resolução, capacidade e seletividade que se pode obter. O princípio deste método consiste em melhorar a capacidade de separação de biomoléculas a partir de ligações específicas, não covalentes à suportes insolúveis, favorecendo a obtenção de biosseparações com elevada seletividade (NIVEN, 1995).

Cromatografia de afinidade é uma técnica que utiliza propriedades físico-químicas para separação dos componentes de uma mistura, a partir da distribuição destes em duas fases uma móvel e outra estacionária que se encontram em íntimo contato. Durante a passagem da fase móvel (extrato protéico) pela fase estacionária (sephadex G 50), os componentes da mistura são distribuídos de modo que uma parte dele são seletivamente retidos na fase estacionária (apresentam afinidade pela fase estacionária), enquanto outros migram de forma diferenciada. Para a separação de uma proteína em particular, é introduzida uma substância que se liga à fase estacionária removendo a da coluna. Essa prática tem como objetivo separar um grupo de proteínas (as lectinas) de um extrato vegetal, baseando-se na afinidade que elas têm por determinados monossacarídeos manose e glicose.

A técnica bioespecífica. consiste no processo de separação de biomoléculas com base nas suas interações específicas com ligantes acoplados a uma fase sólida (JANSON et al., 2011). Pesquisas sobre o isolamento e purificação de proteínas usaram cromatografia de partição como o último passo no processamento, no entanto, estratégias recentes mudaram esse padrão no sentido de usar a cromatografia de afinidade como um processo de etapa única, detecção e separação molecular (MOSER e et al., 2010).

A cromatografia de afinidade é ideal para a captura ou purificação intermediária de biomoléculas, podendo ser usada sempre que houver ligantes adequados para a proteína de interesse (PHARMACIA BIOTECH, 1999). A seletividade do método é garantida pela

especificidade única bioinerente à interação molécula e alvo. A dependência absoluta da interação de afinidade em reconhecimento biológico, em vez de propriedades físico-químicas, implica que esta técnica preserva as atividades biológicas e imunológicas dos produtos isolados (NARAYANAN, 1994).

## **2.5 Cromatografia de afinidade com íons metálicos**

A cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) foi descrita pela primeira vez por Porath et al. (1975), como uma das técnicas de separação de proteínas ou peptídeos. A partir de então, vários protocolos foram desenvolvidos e amplamente adotados para purificação de uma ampla gama de enzimas, tornando-se um procedimento fácil para separação analítica (EROL, et al, 2019). A IMAC é um método que explora a associação entre um íon metálico imobilizado na matriz sólida e certos grupamentos expostos na superfície de um analito em solução. (CARVALHO et al., 2014). Esta afinidade resulta de ligações de coordenação reversíveis formadas entre um íon metálico quelato (o centro de adsorção) e certos resíduos de aminoácidos, tais como o imidazol da histidina, e em menor extensão, o tiol da cisteína e indol do triptofano, os quais doam elétrons para o íon metálico (UYGUN et al., 2015).

A afinidade de uma proteína por um quelato metálico depende fortemente do íon envolvido na coordenação. Métodos de separação específicos podem ser desenvolvidos para cada proteína alvo, com a escolha adequada do íon metálico, do agente quelante e das condições cromatográficas. A estabilidade dos quelatos em uma ampla faixa de temperatura e condições da fase líquida é uma vantagem da técnica, pois, além de significar estabilidade operacional, propicia a reutilização dos mesmos, sem que haja perda de desempenho (CARVALHO et al., 2014).

Métodos de separação específicos podem ser desenvolvidos para cada proteína alvo, com a escolha adequada do íon metálico, do agente quelante e das condições cromatográficas tais como pH, força iônica, tipo de tampão, velocidade superficial, etc. (EROL, et al, 2019). Para purificação de proteínas, os íons metálicos mais utilizados em IMAC são  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$ . Proteínas introduzidas na fase móvel são adsorvidas principalmente pela formação de ligações de coordenação com sítios remanescentes dos íons metálicos quelatados, havendo também a possibilidade de outras forças envolvidas, tais como forças eletrostáticas, interações hidrofóbicas e forças de van der Waals.

## **2.6 Criogéis poliméricos**

Criogéis são monólitos poliméricos formados em meio congelado e que foram introduzidos como uma nova matriz de separação para aplicação em vários processos de

biosseparação (LOZINSKY et al., 2001). Possuem um sistema contínuo de macroporos interconectados com tamanho que varia de 10 a 100 $\mu$ m e se diferenciam das demais matrizes de separação por fornecer uma baixa resistência ao escoamento e uma difusão desobstruída de solução. (MENDES et al., 2011).

A superfície do monólito pode ser modificada a fim de funcionalizar a matriz produzida. Essa modificação pode ser obtida pela copolimerização de monômeros funcionais (WIEDER et al., 2006), pela modificação dos grupos funcionais da superfície (MENDES et al., 2011) ou imobilização de monômeros funcionais na superfície após a polimerização (YAO et al., 2007).

**Figura 1. Representação da Produção de um Criogel.**



Fonte: Adaptado de PLIEVA et al., 2004.

Na produção de géis poliméricos de poli(acrilamida), os componentes comumente utilizados para a construção das matrizes são acrilamida, N,N'-metileno-bis(acrilamida), tetrametilenodiamina, também chamado de TEMED, e persulfato de amônio, também conhecido por APS. (PLIEVA et al., 2004).

Para se utilizar uma matriz em IMAC é essencial a presença de grupos funcionais que possibilitem a modificação química (ativação) do material para imobilização de ligantes. É aconselhável que a matriz apresente também as seguintes características: alta resistência mecânica, área superficial e porosidade elevadas, estabilidade em uma ampla faixa de pH e na presença de sais e solventes orgânicos (WANG et al., 2018).

Para que ocorra a funcionalização desses adsorventes para o uso em IMAC é necessária a escolha de um agente quelante e posteriormente a coordenação com um íon metálico. (HAZIJADEH et al., 2012). Os agentes quelantes usualmente empregados são o ácido iminodiacético (IDA) e o ácido nitrilotriacético (NTA), capazes de fazer, respectivamente, três e quatro ligações coordenadas com os íons metálicos. Tais agentes são imobilizados covalentemente na matriz cromatográfica, utilizando-se ou não braços espaçadores que permitam maior acesso ao sítio de ligação. A escolha do íon metálico varia em função da biomoléculas alvo, variando de íons divalentes ( $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Ni}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ). (UYGUN et al., 2015). Diversos estudos vêm sendo feitos com a utilização de monólitos em IMAC na purificação de proteínas nativas e recombinantes. (CARVALHO et al., 2016).

### **2.6.1 Modificações nas superfícies dos criogéis poliméricos para o processo de purificação**

Uma ampla variedade de suportes monolíticos encontra-se à disposição para processos de purificação das mais diversas biomoléculas existentes. Porém, não há um que seja uma solução universal. Visando aperfeiçoar o processo de utilização dos leitos monolíticos como matrizes de imobilização e purificação de biomoléculas, diversas metodologias de funcionalização desses suportes têm sido reportadas (ANDAÇ et al., 2016; GONÇALVES et al., 2017; FONTAN et al., 2017; NASCIMENTO et al., 2019; FARIAS et al., 2020).

A funcionalização consiste na introdução de grupos funcionais na superfície do polímero. Tal modificação pode ser realizada pela circulação de agentes reticulantes através do suporte polimérico ou pela imersão da matriz (geralmente para criogéis em forma de discos) em uma solução contendo agentes ligantes (JIAN et al., 2015). As modificações estruturais do criogel podem ser químicas ou físicas. Na modificação química da superfície do material, grupos reativos como o radical epóxi, fornecido, por exemplo, pelo alil glicidil éter (AGE) ou glicidil meta acrilato (GMA), são introduzidos para permitir a ligação covalente entre o agente ativo funcional e o suporte cromatográfico, ou para melhorar propriedades como hidrofobicidade, pH ou temperatura de ativação. Além disso, os grupos epóxi são estáveis em valores de pH próximos ao neutro, o que permite o armazenamento dessas matrizes por um longo período (UYGUN ET al., 2015).

A inserção de novas estruturas químicas na superfície do criogel permite obter fases estacionárias que tenham relação mais específica com uma determinada proteína. Cada método de funcionalização apresenta uma diferente reação química para se atingir o máximo de imobilização da molécula de interesse (YAVUZ E DENIZLI, 2015).

Os protocolos de funcionalização existentes utilizando ligações covalentes incluem os métodos epóxi, base de Schiff e glutaraldeído. O método epóxi envolve o ataque nucleofílico



por radicais amina dos ligantes ao grupo epóxi presente no monólito, levando a formação de uma amina secundária estável. A desvantagem desse método é que nenhum braço espaçador é inserido entre o suporte e a molécula ligante, o que pode resultar em uma menor capacidade de imobilização (GONÇALVES et al., 2016).

No método do glutaraldeído, um adsorvente contendo grupos epóxi reativos (monólito epóxi-ativado) é inicialmente convertido na forma amina-ativada, por meio das reações do grupamento epóxi com reagentes contendo amina, como a etilenodiamina ou hexanodiamina. O monólito amina-ativado reage então com o glutaraldeído, formando um monólito aldeído-ativado capaz de reagir com grupamento amina das moléculas ativas de interesse (MALLIK E HAGE, 2006; GONÇALVES et al., 2016). Esse suporte é utilizado da mesma maneira que o produzido pelo método da base de Schiff. A principal vantagem desse método está na capacidade de formação de um longo braço espaçador entre o ligante e o criogel, evitando possíveis efeitos de impedimento estérico, o que pode acarretar uma maior capacidade de imobilização do ligante e de adsorção da molécula alvo (GONÇALVES et al., 2016).

Os protocolos para a imobilização da lectina diferem entre si, na modificação da superfície do suporte por meio das reações de ativação, na qual os grupos funcionais do suporte são modificados para produzir intermediários reativos (FERNÁNDEZ, 2012). Durante o processo de interação da lectina com o suporte pode acontecer da região do sítio ativo se tornar menos acessível ao ligante, ocasionando um impedimento estérico (MATEO et al., 2007), ou que a forte fixação da lectina ao suporte dificulte a ativação da mesma, caso essa possua conformações distintas quando ativada e não ativada (MATEO et al., 2007; MACARIO et al., 2009). Um suporte ideal deve imobilizar a lectina de forma que seja conservada sua estrutura secundária e terciária, além de apresentar um mínimo de dessorção das biomoléculas durante a reação (HENZLER et al., 2008). A eficiência da lectina imobilizada depende fortemente da estratégia de imobilização e do material utilizado como suporte. Nesse contexto, há um crescente interesse no entendimento e controle das estratégias de imobilização para purificação (ABBAS et al., 2009). Inúmeros métodos de imobilização têm sido reportados na literatura, dentre os quais se destacam: adsorção (KILONZO et al., 2011), imobilização por ligação covalente (KANNOUJIA et al., 2009), aprisionamento em géis poliméricos (NICHELE et al., 2011) e utilização de nanopartículas magnéticas como matrizes (SONG et al., 2011). Dentre esses, o método por adsorção tem sido considerado um dos mais simples e econômicos para a imobilização de proteínas. A imobilização de uma lectina por adsorção oferece uma enorme faixa de aplicabilidade em virtude de haver uma mínima perturbação na estrutura nativa da mesma (KUMAR et al., 2009).

### 3. REFERENCIAS

ABBAS, A.; VERCAIGNE-MARKO, M.; BOCQUET B.; VIVIEN, C.; GUILLOCHON, D. Covalent attachment of trypsin on plasma polymerized allylamine. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 73, p. 315–324, 2009.

AKDUMAN, B.; UYGUN, M.; UYGUN, D.A.; AKGÖL, S.; DENIZLI, A. Purification of yeast alcohol dehydrogenase by using immobilized metal affinity cryogels. *Materials Science & Engineering C*, v. 33, p. 4842-4848, 2013.

ALONSO, R.; GRANT, G.; MARZO, F. Thermal treatment improves nutritional quality of pea seeds (*Pisum sativum* L.) without reducing their hypocholesterolemic properties. *Nutr. Res.*, v. 21, p. 1067-1077, 2011.

ANDLAUER, W.; FÜRST, P. Nutraceuticals: a piece of history, present status and outlook. *Food Res. Internat.*, v. 35, p. 171-176, 2012.

ANDRADE, A. R.; . BEREZE, J.; SANTOS, R. M.; BEDNARZ, J. A. Disponibilidade térmica para diferentes culturas agrícolas em região de clima subtropical úmido obtida através da utilização de índice bioclimático. *Geosul*, Florianópolis, v. 32, n. 64, p. 66-83, set. 2018. ISSN 2177-5230. Disponível em: . Acesso em: 22 nov. 2021. doi:http://dx.doi.org/10.5007/2177-5230.2017v32n64p66.

antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. *Planta*, v.183, p. 258-264, Jul. 1990.

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, n. 1, p. 125-134, 2004.

BARRE, A.; PEUMANS, W. J.; ROSSIGNOL, M.; BORDERIES, G.; CULERRIER, R. et al. (2004). *Biochimie*, v.86, 685-691.

BATISTA, F.A.H. **Isolamento e caracterização da lectina camptosemina extraída das sementes de *Camptosema ellipticum***. 2008. 88f. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) – Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 2007.

BATISTA, H.L. **Atividade Antimicrobiana de extratos vegetais de plantas do estado do Tocantins**. 2008. 154f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia Clínica) – Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

**BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA**, v. 1383, n. 1. p. 9-33, 1998.

BOYE, J.; ZARE, F.; PLETCH, A. Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. *Food Research International*, v. 43, p. 414 - 431, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Coordenação-Geral da Política de Alimentação e Nutrição. **Guia alimentar para a população brasileira: Promovendo a alimentação saudável**. Brasília: Ministério da Saúde, 2017, 158p.

BROUGHTON, W. J.; HERNÁNDEZ, G.; BLAIR, M.; BEEBE, S.; GEPTS P.; VANDERLEYDEN, J. Beans (*Phaseolus* spp.) – **model food legumes**. *Plant and Soil*, v. 252, n. 1, p. 55-128, 2003.

CANDIDO, L. M. B.; CAMPOS, A. M. Alimentos funcionais. uma revisão. **Boletim da SBCTA.**, v. 29, n. 2, p. 193-203, 2015.

CARNEIRO, A.G.O.L.L.C.; HALLA, C. Lectinas, onde se obter, o que são e para que servem. **Revistas Eletrônicas Newton Paiva.** n.3, 2011. Disponível em <[http://revista.newtonpaiva.br/seer\\_3/index.php/RevistaPos/article/viewArticle/164](http://revista.newtonpaiva.br/seer_3/index.php/RevistaPos/article/viewArticle/164)> Acesso em 12 ago. 2022.

CARVALHO, A. F. F. U.; MOREIRA, R.A. Purification and partial characterization of a lectin from *Dioclea virgata* Benth seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 8, 37-42, 1996.

CAVADA, et al 2017. Effect of air classification and fermentation by *Lactobacillus plantarum* VTT E-133328 on faba bean (*Vicia faba* L.) flour nutritional properties. **International Journal Food Microbiology**.

CHRISPEELS, M.J.; RAIKHEL, N.V. Lectins, Lectin Genes, and Their Role in Plant defense. **The Plant Cell**, v. 3, p. 1-9, Jan.1991.

CODA, R.; MELAMA, L.; RIZZELLO, C.G.; CURIEL, J.A.; SIBAKOV, J.; HOLOPAINEN, U.; PULKKINEN, M.; SOZER, N. Effect of air classification and fermentation by *Lactobacillus plantarum* VTT E-133328 on faba bean (*Vicia faba* L.) flour nutritional properties. **International Journal Food Microbiology**, 193, p. 34-42, 2019.

COELHO, C.B.B. Antimicrobial activity of secondary metabolites and lectins from plants. **Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, Badajoz: Formatex**, p. 396-406, 2010.

CORREA, N; PALTRONIERI, F. 2016. **RASBRAN - Revista da Associação Brasileira de Nutrição**. São Paulo, SP, Ano 7, n. 2, p. 79-90, Jul-dez. 2016 - ISSN 2177-7527.

CRUZ, G. A. D. R. et al. Protein quality and in vivo digestibility of different varieties of bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 6, n. 2, p. 157-162, 2016.

DAMICO, C.D. **Purificação, Propriedades físico-químicas e estudo das atividades inseticida, fungicida e citotóxica de uma lectina presente em sementes de *Koeleria paniculata***. 2002. 129f. Dissertação (Mestrado em Biologia Funcional e Molecular) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2002.

DÍAZ, P.H.; GONZALEZ, O.M.; PABLO-VELEZ, Y.R.; BÁEZ, F.A.G. Aplicaciones de las Lectinas. **Rev Cubana Hematologia, Inmunologia y Hemoterapia**, v.15, n. 2, p. 91-5, 1999.

DURANTI M. Grain legume proteins and nutraceutical properties. **Fitoterapia.**, v.77, p. 6782, 2006. MEIO-NORTE. **Cultivo de feijão caupi**. Jul/2003. Disponível em: <<http://www.cpamn.embrapa.br/pesquisa/graos/FeijaoCaupi/referencias.htm>>. Acesso em: 22 nov. 2021.

EROL, B.; EROL, K.; GÖKMEŞE, E. The effect of the chelator characteristics on insulin adsorption in immobilized metal affinity chromatography. **Process Biochemistry**, v. 83, p. 104-113, 2019.

FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M.; SANROMÁN, M. Á.; MOLDES, D. Recent developments and applications of immobilized laccase. **Biotechnology Advances**, v., n. in press, p., 2012.

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.

FONTENELE, S.R. **Efeito vasodilatador das lectinas de Diocleinae *Canavalia gladiata* e *Canavalia brasilienses***. 2008. 85f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2008.

FREIRE FILHO F.R. **Feijão-caupi no Brasil: produção, melhoramento genético, avanços e desafios Teresina**: Embrapa Meio-Norte, 2011. 84 p. Disponível em: < <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/916831/1/feijaocaupi.pdf> >. Acesso em: 22. nov. 2021.

FREIRE FILHO, F. R. (1988). Origem, evolução e domesticação do caupi. In: Araújo. J. P. P. de, Watt. E. E. **O Caupi no Brasil**. Goiânia: Embrapa-CNPAF/Ibadan: ITTA. p26-46.

GERLACH, D.; WAGNWR, M.; SCHHLOTT, B. et al. (2002) Chemical and physicochemical characterization of the sialic acid-specific lectin from *cepaea hortensis*. **FEMS microbiology letters**. 10579: 61-68, 2002.

HAJIZADEH, S.; KIRSEBOM, H.; LEISTNER, A.; MATTIASSON, B. Composite cryogel with immobilized concanavalin A for affinity chromatography of glycoproteins. *Journal of Separation Science*, v. 35, n. 21, p. 2978-2985, 2012.

HAJTÓ, T. et al Sugar-lectin interactions investigated through affinity capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography B**, v.752, p.207-216, 2015.

HENZLER, K.; HAUPT, B.; BALLAUFF, M. Enzymatic activity of immobilized enzyme determined by isothermal titration calorimetry. **Analytical Biochemistry**, v. 378, p. 184–189, 2008.

IQBAL, A. et al. Nutritional quality of important food legumes. **Food Chemistry**, Oxford, v. 97, n. 2, p. 331-335, 2006.

IQBAL, A.; KHALIL, I. A.; SHAH, H. Nutritional yield and amino acid profile of rice protein as influenced by nitrogen fertilizer. **Sarhad Journal of Agriculture, Peshawar**, v. 19, n. 1, p. 127-134, 2013.

JANSON, H. W., PENELOPE J. E. DAVIES, AND H. W. JANSON. **JANSON'S History of Art: The Western Tradition**. Upper Saddle River, NJ: **Prentice Hall**, 2011.

JIAN, W.; QUIN-MEI, W.; LI-LI, T.; CHEN, Y.; SU-HUA, Y.; CHUN, Y. Research Progress of the Molecularly Imprinted Cryogel. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 43, p. 1777-1784, 2015.

KANNOUJIA et al., 2009. Cromatografia de afinidade com metal imobilizado e suas variantes. **Boletim de Biotecnologia** 1-7, 2009.

KILONZO, P.; MARGARITIS, A.; BERGOUGNOU, M. Effects of surface treatment and process parameters on immobilization of recombinant yeast cells by adsorption to fibrous matrices. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 3662-3672, 2011.

- KUMAR AK FAU - GOSWAMI, P.; GOSWAMI, P. Dissociation and reconstitution studies of a broad substrate specific multimeric alcohol oxidase protein produced by *Aspergillus terreus*. **J Biochem**, v. 145, n. p. 259-265, 2009.
- LIS, H.; SHARON, N. Lectins: Carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. **Chemicals Reviews**, v. 98, n. 2, p. 637-674, 1998.
- LORIS, R.; HAMELRYCK, T.; BOUCKAERT, J.; WYNS, L. Legume lectin structure.
- LOUREIRO, J. R. **ACTAS BIOQUÍMICA**. 1991, 5: 97-109.
- LOZINSKY, V.; PLIEVA, F.; GALAEV, I.; MATTIASSON, B. The potential of polymeric cryogels in bioseparation. **Bioseparation**, v. 10, n. 4, p. 163-188, 2001.
- MACARIO, A.; MOLINER, M.; CORMA, A.; GIORDANO, G. Increasing stability and productivity of lipase enzyme by encapsulation in a porous organic–inorganic system. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 118, n. 1–3, p. 334-340, 2009..
- MAHAN, L. K., ESCOTT-STUMP, S. **Krause, alimentos, nutrição e dietoterapia**. 12. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2020. 1355 p.
- MALLIK, R.; HAGE, D.S. Affinity monolith chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 29, p. 1686-1706, 2006.
- MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 6, p. 1451-1463, 2007.
- MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C. D.; CASTRO, H. F. D.; GIORDANO, R. D. L. C. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 831-840, 2011.
- MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments**, 5th edition. John Wiley & Sons, Inc., New York, 684p, 2001.
- MONTOYA; MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments**, 5th edition. John Wiley & Sons, Inc., New York, 684p, 2010.
- MOREIRA, R.A. Lectinas vegetais: uma abordagem química e físico-química. Tese para Professor Titular da Universidade Federal do Ceará – Fortaleza, 1998.
- MOSER, A. C.; HAGE, D.S. Cromatografia de imunoafinidade: uma introdução para aplicações e desenvolvimentos recentes. **Bioanalysis**. 2010 abril; 2 (4). 769-790 doi: 10,4155 / bio.10.3.
- MOURA, G.E.D.D. **Avaliação do efeito citotóxico da lectina da esponja marinha *Cliona varians* contra células da leucemia mieloide crônica**. 2007. 89f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2007.
- NARAYANAN, S. Preparative affinity chromatography of proteins. **Journal of Chromatography**. 658: 237-258, 1994.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2019, 1273 p.

NICHELE, V.; SIGNORETTO, M.; GHEDINI, E.  $\beta$ -Galactosidase entrapment in silica gel matrices for a more effective treatment of lactose intolerance. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 71, p.10-15, 2011.

NIVEN, G.W. Separation processes for biotechnology in the food industry. In: **Food processing: recent developments**. New York: Elsevier Science, p. 143-195, 1995.

OLIVEIRA et. al. Increased protein content of chickpea (*Cicerarietinum L.*) inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi and nitrogen-fixing bacteria under water deficit conditions. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, e. 97, p. 4370-4385, Society of Chemical Industry, 2017.

OLIVEIRA, D. K.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G. (2017). Different lectins in *Spondias tuberosa* (umbu). In: XXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq).

Oncopharmacological Perspectives of a Plant Lectin (*Viscum album* Agglutinin-I): Overview of Recent Results from *In vitro* Experiments and *In vivo* Animal Models, and Their Possible Relevance for Clinical Applications. **Advance Access Publication**, v. 2, n. 1, p. 59-67, Jan. 2005.

ORWOLL, E. *et al.* Effects of dietary protein deficiency on mineral metabolism and bone mineral density. **The American Journal Of Clinical Nutrition**, [s.l.], v. 56, n. 2, p. 314-319 Aug. 1992. Disponível em: <<http://ajcn.nutrition.org/content/56/2/314.full.pdf>>. Acesso em: 22 nov. 2021.

PADULOSI, S., NG, N. Q. (1997). Origin taxonomy, and morphology of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. In: Singh, B .B, Mohan. R, Dashiell. K. E. e Jackai. L. E. N. *Advances in Cowpea Research*. Copublication (IITA) e (JIRCAS), Ibadan, Nigeria.

PAIVA et al. **Imobilização de  $\beta$ -galactosidase em criogel supermacroporoso para hidrólise da lactose**. 72 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2017.

PERÇIN, I.; AKSÖZ, E. **Hacettepe Journal of Biology & Chemistry**, v.40, 303-308, 2012.

PETROSSIAN, K.; BANNER, L. R.; OPPENHEIMER, S. B. Lectin binding and effects in culture on human cancer and non-cancer cell lines: Examination of issues of interest in drug design strategies. *Acta Histochemica*, v.109, n.6, p.491-500, 2007.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Chapter 7: Plant lectins versatile proteins with important perspectives in biotechnology. In: **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v.15, 199-228, 1998.

PFAUNMILLER, E. L.; PAULEMOND, M. L.; DUPPER, C. M.; HAGE, D. S. Affinity monolith chromatography: a review of principles and recent analytical applications. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, p. 2133-2145, 2013.

PHARMACIA BIOTECH. **Protein purification handbook**. Sweden, P.97, 1999.

PHILLIPS, R. D. *et al.* Utilization of cowpeas for human food. **Field Crops Research**, [s.l.], v. 82, n. 2-3, p. 193-213. May 2013. Disponível

em<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378429003000388>>. Acesso em: 23 nov. 2021.

PORATIL, J et al. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. **Nature**. v. 258, p. 598-599, 1975.

RAHAIE, M.; KAZEMI, S. S. (2010). *Biotechnology*, v.9, 428-443.

RUDIGER, H.; GABIUS, H.J. Plants lectins: occurrence, biochemistry, functions and applications. **Glicoconjugate Journal**, v.18, p. 589-613, 2001.

RUSSI, M.A. **Avaliação do efeito neuroprotetor da lectina de *Canavalia brasiliensis* (Conbr) frente à neurotoxicidade glutamatérgica**. 2010. 60f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

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, et al . (2007). *Acta Histochemica*, v.109, 491- 500.

SANTOS, A.L.W. Atividade de Proteínas Hemaglutinantes em Sementes de Leguminosas Arbóreas da Flora Amazônica. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, supl. 2, p. 1020-1022,jul. 2008.

SAVINA, I.; MATTIASSON, B.; GALAEV, I. Y. Graft polymerization of acrylic acid onto macroporous polyacrylamide gel (cryogel) initiated by potassium doperiodatocuprate. **Polymer**, v.46, p. 9596-9603, 2005.

SHARON, N.; LIS, H. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. *Chemical Reviews*, v. 98, n. 2, p. 637-674, Jan.2004.

SILVA, J.F. Da; SILVA, D.L. Da; NASCIMENTO, R.G.; VERÍSSIMO, L.A.A.; VELOSO, C.M.; BONOMO, R.C.F.; FONTAN, R.C.I. Enhancements in sugar immobilization in polymeric macroporous matrices for affinity capture. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 136, p. 1-9, 2019.

Sitohy, M.; Doheim, M.; Badr, H. (2007). *Food Chemistry*, v.104, 971-979.

SONG, Y. S.; LEE, H. U.; LEE, J. H.; PARK, C.; KIM, S. W. Enzyme-catalyzed resolution of racemate using enzyme functionalized silica nanoparticles in the presence of surfactants.

**Process Biochemistry**, v. 46, p. 817–820, 2011.

TRINDADE, M.B. **Purificação, caracterização e estudos estruturais de duas novas lectinas ligantes de quitina das sementes do gênero *Artocarpus***. 2005. 127f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, SãoCarlos, 2005.

UYGUN D.A.; UYGUN, M.; AKGÖL, S. DENIZLI A. Reversible adsorption of catalase onto Fe<sup>3+</sup> chelated poly (AAm-GMA)-IDA cryogels. **Materials Science and Engineering C**, v. 50, p. 379-385, 2015.

UYGUN M.; AKDUMAN, B.; ERGÖNÜL, B.; UYGUN, D. A.; AKGÖL, S. DENIZLI A. Immobilization of Amyloglucosidase onto Macroporous Cryogels for Continuous Glucose Production from Starch. **Journal of Biomaterials Science**, v. 26, p. 1112-1125, 2015.

VACARI, F.C.M. **Cristalização e resolução de estrutura das proteínas Canavalia gladiatalectin (CGL) e Canavalia marítima lectin (CML) complexadas ao açúcar manose 1-6 manose**. 2010. 96f. Dissertação (Mestrado em Biofísica Molecular) – Programa de Pós- Graduação em Biofísica Molecular, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto, 2020.

VAN DAMME, E.J.M; BARRE, A.; ROUGE, P.; PEUMANS, W.J. Cytoplasmic/nuclearplant lectins: a new story. **TRENDS in Plant Science**, v. 9, n. 10, Oct 2004.

WANDER. A. L. (2017). Produção e consumo de feijão no Brasil, 1975–2005. **Informações Econômicas**, SP, v 37, n. 2, p. 7-21.

WANG, J.; ZHANG, R.; YANG, X.; LIU, X.; ZHANG, X. Facile synthesis of copper(II)-decorated functional mesoporous material for specific adsorption of histidine-rich proteins. *Talanta*. Volume 176, 1 January 2018, Pages 308-317.

WIEDER, W. et al. monolithic poly(glycidyl methacrylate-co-divinylbenzene) capillary columns functionalized to strong anion exchangers for nucleotide and oligonucleotide separation. **Journal of Separation Science**, v.29, n.16, p.2478-2484, 2006. ISSN 1615-9314.

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.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO); FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO); UNITED NATIONS UNIVERSITY (UNU) (Switzerland). **Protein and amino acid requirements in human nutrition**: Report of a joint FAO/WHO/UNU expert consultation. Geneva, 2017, 265 p, (935), Disponível em: <[http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO TRS 935\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_935_eng.pdf)>. Acesso em: 22 nov. 2021.

YAVUZ, H.; DENIZLI, A. A New Affinity Separation Medium: Supermacroporous Cryogels. **Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering**, 2015.

ZANETTI, G.D. **Lectina dos rizomas de *Arundo donax* L.: purificação, caracterização, propriedades, imunohistoquímica e separação das isoformas**. 2007. 262f. Tese (Doutorado em Botânica) – Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.



---

**ARTIGO**

**CARACTERIZAÇÃO DE MATRIZES DE AFINIDADE POR ÍONS METÁLICOS PARA A PURIFICAÇÃO PARCIAL DE LECTINAS DO FEIJÃO-DE-CORDA (*Vigna unguiculata* L).**

---

## RESUMO

SOUZA, M. K. L. **PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MATRIZES DE AFINIDADE POR ÍONS METÁLICOS PARA A PURIFICAÇÃO DE LECTINAS DO FEIJÃO-DE-CORDA** (*Vigna unguiculata L.*). Itapetinga – BA: UESB, 2023. Dissertação–Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) \*

Para a obtenção de lectinas numa forma mais pura, a cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados é considerada umas das técnicas mais eficientes. Assim, esse trabalho tem como objetivo purificar parcialmente lectinas do feijão-de-corda por adsorventes macroporosos de afinidade por íons metálicos ( $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ), e avaliar as condições de adsorção da lectina. Foram observadas diferenças no comportamento dos adsorventes funcionalizados com íons metálicos em comparação ao controle. De acordo com a análise de FTIR, foi observada uma alteração na intensidade das bandas na matriz funcionalizada, o que é atribuído à abertura do anel epóxi e alteração da conformação molecular com a inclusão dos braços espaçadores e posterior inclusão do ligantes metálicos. Foi feita a caracterização das matrizes produzidas, e verificou-se que para a matriz ativada com cobre uma capacidade de inchamento de  $11,15 \pm 0,90^b \text{ kg.kg}^{-1}$ , para a ativada com zinco,  $10,83 \pm 1,55^b \text{ kg.kg}^{-1}$  e para controle  $17,93 \pm 0,62^a \text{ kg.kg}^{-1}$ , havendo diferença estatística entre o controle comparado às matrizes funcionalizadas. Para o grau de expansão (ED), foi obtido para a matriz com cobre um valor de  $11,65 \pm 0,66^{ab} \text{ L.kg}^{-1}$ , para a matriz com zinco  $10,24 \pm 1,07^b \text{ L.kg}^{-1}$  e para o controle  $17,78 \pm 5,85^a \text{ L.kg}^{-1}$ . Na purificação em leito monolítico verificou-se a presença de um único pico de eluição e que entre as triplicatas o comportamento foi o mesmo, o que pode ser atribuído a especificidade do criogel IMAC imobilizado com cobre, além de demonstrar que a condição de eluição usada foi eficiente na obtenção da proteína desejada. Na análise de aglutinação verificou-se a presença de lectinas nos eluidos. As matrizes apresentaram características promissoras para a purificação em colunas, com fator de purificação para a matriz com cobre igual a 5,6, para a matriz com zinco igual a 4,1 e para o controle igual a 1,0, indicando que os funcionalizados obtidos apresentaram resultados satisfatórios.

**Palavras-chave:** Purificação, Criogel, Proteínas, lectinas, feijão-de-corda.

---

\* Orientador (a): Rafael da Costa Ilhéu Fontan, DSc., UESB

## ABSTRACT

SOUZA, M. K. L. **PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF METAL ION AFFINITY MATRICES FOR THE PURIFICATION OF CROW BEAN (*Vigna unguiculata* L) LECTINS.** Itapetinga – BA: UESB, 2023. Dissertation– Master in Food Science and Engineering) \*

To obtain lectins in a purer form, affinity chromatography using immobilized metal ions is considered one of the most efficient techniques. Thus, this work aims to partially purify cowpea lectins using macroporous adsorbents with affinity for metal ions ( $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ), and evaluate the lectin adsorption conditions. Differences were observed in the behavior of adsorbents functionalized with metal ions compared to the control. According to the FTIR analysis, a change in the intensity of the bands in the functionalized matrix was observed, which is attributed to the opening of the epoxy ring and change in the molecular conformation with the inclusion of the spacer arms and subsequent inclusion of the metallic ligands. The characterization of the matrices produced was carried out, and it was found that for the matrix activated with copper, a swelling capacity of  $11.15 \pm 0.90$  kg.kg<sup>-1</sup>, for the matrix activated with zinc,  $10.83 \pm 1.55$  kg.kg<sup>-1</sup> and for control  $17.93 \pm 0.62$  kg.kg<sup>-1</sup>, with a statistical difference between the control compared to the functionalized matrices. For the degree of expansion (ED), a value of  $11.65 \pm 0.66$  L.kg<sup>-1</sup> was obtained for the matrix with copper,  $10.24 \pm 1.07$  L.kg<sup>-1</sup> for the matrix with zinc and for the control  $17.78 \pm 5.85$  L.kg<sup>-1</sup>. During purification in a monolithic bed, the presence of a single elution peak was verified and that the behavior between the triplicates was the same, which can be attributed to the specificity of the IMAC cryogel immobilized with copper, in addition to demonstrating that the elution condition used was efficient in obtaining the desired protein. In the agglutination analysis, the presence of lectins in the eluates was verified. The matrices showed promising characteristics for purification in columns, with a purification factor for the matrix with copper equal to 5.6, for the matrix with zinc equal to 4.1 and for the control equal to 1.0, indicating that the functionalized obtained presented satisfactory results.

**Keywords:** Purification, Cryogel, Proteins, lectins, cowpea.

---

\* Advisor (a): Rafael da Costa Ilhéu Fontan, DSc., UESB

## 1. INTRODUÇÃO

Proteínas são as macromoléculas mais abundantes nas células. Elas ocorrem em todas as células vivas e em todas as partes das mesmas relacionando-se praticamente com todas as funções fisiológicas. Quimicamente, as proteínas são polímeros de alta massa molecular, cujas unidades básicas são os aminoácidos, ligados entre si por ligações peptídicas (CRUZ *et al.*, 2013).

Entre os milhares de tipos de proteínas encontram-se as lectinas, que são proteínas ou glicoproteínas de origem não imune, com pelo menos um domínio não catalítico, aglutinantes de células e glicoconjugados, com capacidade de ligar-se reversivelmente a mono e oligossacarídeos específicos através de ligações de hidrogênio e interações de Van der Waals sem alterar a estrutura covalente destes. (VAN DAMME, 1998). As proteínas dos alimentos não são apenas fonte de componente construtivo e energético (aminoácidos), mas também apresentam um papel bioativo, pois podem ser precursoras de peptídeos ativos biologicamente com várias funções fisiológicas (CARVALHO *et al.*, 2016).

A inovação de técnicas e metodologias para a separação e purificação de compostos de origem biológica, em especial proteínas, tem sido importante para os recentes avanços nas pesquisas de biotecnologia. (LYNCH *et al.*, 2019). Uma das alternativas de purificação de lectinas é a utilização de técnicas cromatográficas com criogéis. (KIRCHERT *et al.*, 2019). Os criogéis, são géis poliméricos formados em condições de congelamento moderado (temperatura entre  $-10^{\circ}\text{C}$  e  $-20^{\circ}\text{C}$ ). Estes foram introduzidos como nova matriz de separação para aplicação em vários processos de biosseparação no final da década de 90 (LOZINSKY *et al.*, 2001). Possuem um sistema contínuo de macroporos interconectados com tamanho que varia de 10 a 100  $\mu\text{m}$  e se diferenciam das demais matrizes de separação por fornecer uma baixa resistência ao escoamento e uma difusão desobstruída de solução. Em decorrência de possuir a parede dos poros mecanicamente fortes, os criogéis podem suportar altas vazões sem praticamente nenhuma compressão, permitindo assim o transporte de massa convectivo dos solutos e de partículas de pelo menos 10  $\mu\text{m}$  de tamanho (PLIEVA *et al.*, 2004 e PERSSON *et al.*, 2004).

Nos processos de purificação de proteínas/enzimas, a cromatografia de afinidade é uma das técnicas de cromatografia que vem sendo muito utilizada em purificação de proteínas de origem natural ou recombinante (CARVALHO *et al.*, 2016; LYNCH *et al.*, 2019).

Métodos de separação específicos podem ser desenvolvidos para cada proteína alvo, com a escolha adequada do íon metálico, do agente quelante e das condições cromatográficas. A estabilidade dos quelatos em uma ampla faixa de temperatura e condições da fase líquida é uma vantagem da técnica, pois, além de significar estabilidade operacional desejada em

aplicações rotineiras (analítica e larga escala comercial), propicia também a reutilização dos mesmos, sem que haja perda de desempenho (UYGUN et al., 2015; WANG et al., 2018).

Assim, o objetivo na realização deste trabalho foi produzir, funcionalizar e caracterizar os criogel com íons metálicos para o processo de purificação de lectina presente no feijão-de-corda.

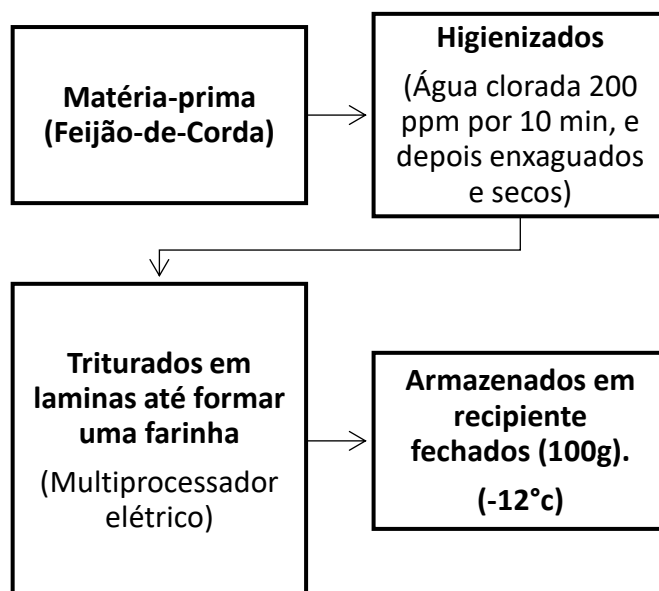
## 2. METODOLOGIA

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Engenharia de Processos (LEP), na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) – Campus Itapetinga – BA.

### 2.1 Feijão-de-Corda

No presente estudo foram utilizadas sementes da leguminosa *Vigna unguiculata* L, popularmente conhecida como feijão-de-corda ou feijão fradinho, compradas em supermercado na cidade de Itapetinga-BA. As sementes de *Vigna unguiculata* L, foram trituradas em um multiprocessador elétrico, obtendo-se uma farinha fina que foi armazenadas em recipientes hermeticamente vedado, a (-12°) e utilizada nas análises posteriores, de acordo com a figura 1.

### 2.2 Obtenção da farinha do feijão-de-Corda para extração de proteínas.



**Figura 1-** Fluxograma para obtenção da farinha do feijão-de-Corda.

Fonte: Próprio autor, 2022.

### 2.3 Obtenção do extrato do feijão-de-corda

O feijão-de-corda triturado (30 g) foi misturado a 300 mL de uma solução de NaCl 0,9 % m/v. A suspensão foi mantida sob leve agitação durante 2 horas, centrifugada a 5000 g,

durante 20 minutos a 4°C para retirada do sobrenadante, depois filtrada em papel-filtro. Em seguida o sobrenadante foi dialisado contra água destilada, durante 48 horas, para a retirada do sal.

#### **2.4 Determinação do teor de proteínas solúveis do Extrato**

O teor de proteínas solúveis presentes no extrato da farinha de sementes de *Vigna unguiculata* L, foi determinado utilizando-se o método descrito por Bradford (1976). Como padrão, utilizou-se a proteína albumina de soro bovino.

#### **2.5 Síntese dos criogéis monolíticos**

Para a purificação das lectinas do feijão-de-corda foram produzidos criogéis que serviram de suporte para os grupos de íons metálicos no momento da purificação das lectinas por cromatografia de afinidade.

Para a síntese dos Criogéis, foram adaptadas as metodologias propostas por Kumar et al. (2006) e Yao et al. (2006a). Uma solução contendo 7% (m/v) de monômeros Acrilamina (AAm) (4,4g) e (Bisacrilamida) (BAAm) (1,2 g) que foi preparada em banho de gelo. Adicionando então 1,4g de Alil glicídil Éter (AGE). Em seguida 140 µL de APS na concentração de 0,5g/mL e 91 µL de TEMED foram misturados. Após a homogeneização da solução, a mesma foi vertida em seringas plásticas e colocadas em banho termostático à temperatura de -12°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, 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 de íons metálicos (funcionalização). Os criogéis prontos apresentaram aspecto de um cilindro branco rígido e uniforme quando desidratados, com cerca de 4 cm de altura e 1 cm de diâmetro.

#### **2.6 Funcionalização dos criogéis com íons metálicos**

Nesta etapa os criogéis foram ativados, onde as matrizes foram funcionalizadas com íons de Cobre ( $\text{Cu}^{+2}$ ) e Zinco ( $\text{Zn}^{+2}$ ). Para isso foi adotado o sistema em batelada adaptado de Carvalho et al, 2019. Criogéis secos, com cerca de 4 cm de altura, 1cm de diâmetro e peso médio de 250 mg, foram colocados sob agitação rotativa à 25 rpm (em todas as etapas do processo), em seringas fechadas de 20 mL. A cada etapa realizada os criogéis foram suavemente comprimidos manualmente, para a retirada do excesso de solução da etapa anterior. Inicialmente os criogéis foram hidratados em 20 mL de água deionizada por cerca de 1h, depois colocados em 20 mL de álcool etílico por mais 1h, e logo após foi adicionado uma solução de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (20 mL, pH 9,5; 0,05 M) mantendo-se nessa condição por 1 hora. Posteriormente, os

criogéis foram colocados em uma solução de etilenodiamina (0,5 M em 0,05 M de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 9,5) Durante 14 h à temperatura ambiente. Após estas etapas, foram colocados em água deionizada por 30 min. Os criogéis foram lavados com Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,05 M (20 mL pH 9,5) por uma hora, e colocado 20 ml de tampão fosfato de sódio (pH 7,2; 0,1 M) por 1 h para equilibrar a matriz, foi adicionado uma solução de glutaraldeído diluído em tampão fosfato de sódio (pH 7,2; 0,1M), ficando em contato com os criogéis a 12°C por 5 h. Logo após foram lavados em 20 mL de água deionizada e em seguida tampão fosfato de sódio (pH 7,2; 0,1 M), ambos por 1 h. Foram colocados em 20 mL de solução de ácido iminodiacético (IDA) (pH 10; 0,5 M em 0,05 M de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) por 14 h a 40°C, em seguida adicionado 20 mL de ácido acético a 1% por 15 min, até baixar o pH para 7, conferido em pHmetro, e logo após foi feita a lavagem com água deionizada e em seguida tampão fosfato de sódio (pH 7,2; 0,1 M) para equilibrar a coluna, 1h cada etapa. Depois foi usada solução de borohidreto de sódio (0,1 M em 0,05 M de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Ph 9.5.) por cerca de 30 min, frascos abertos. Em seguida foi feita a lavagem com água deionizada por cerca de 1h. Então os criogéis foram postos em contato com uma solução de 0,1 M dos íons metálicos de interesse (Cu<sup>2+</sup> e Zn<sup>2+</sup>, obtidas a partir da dissolução de sulfato de cobre e zinco, respectivamente), durante 2 horas para a ligação do metal na matriz. Os criogéis foram lavados com água deionizada para remover o metal não ligado e, em seguida, com tampão de imidazol (15 mM em HEPES e 0,2 M de NaCl, pH 7,0) para remoção do metal fracamente ligado. Após a ativação os criogéis foram colocados em estufa a 60°C e após a secagem obtendo uma coluna adsorvente monolítica supermacroporosa de afinidade por íons metálicos imobilizados.

## 2.7 Caracterização dos criogéis

### 2.7.1 Capacidade de inchamento e grau de expansão

A capacidade de inchamento  $S$  (kg.kg<sup>-1</sup>) 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  $S$  será calculado utilizando-se a **Equação 1**, (SAVINA et al., 2005).

$$S = \frac{m_s - m_d}{m_d} \quad (01)$$

Sendo  $m_s$  (g) a massa do criogel hidratado e  $m_d$  (g) a massa do criogel seco.

O grau de expansão ED (L.kg<sup>-1</sup>) 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 terão 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 será calculado utilizando-se a Equação 2, (FONTAN, 2013).

$$ED = \frac{V_2 - V_1}{m_d} \quad (02)$$

Onde:  $V_1$  é o volume inicial da proveta (mL) e  $V_2$  é o volume lido na proveta após a colocação do criogel (mL).

A capacidade de inchamento e o grau de expansão foram avaliados para os criogéis sem modificação e funcionalizados com os diferentes íons metálicos. 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.

### 2.7.2 Porosidade dos criogéis

Para a determinação da porosidade, foi utilizado um método que se baseia na medida do conteúdo de água livre (PLIEVA et al., 2004a e 2004b). Criogéis sem modificação e funcionalizados com os dois diferentes íons metálicos, 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 ( $\phi_M$ ), com tamanho  $\geq 1\mu\text{m}$ , fração de meso e microporos ( $\phi_m$ ), com tamanho  $< 1\mu\text{m}$ , fração de água ligada ( $\phi_{wb}$ ), fração de polímero seco ( $\phi_d$ ) e porosidade total ( $\phi_T$ ) dos criogéis serão calculados utilizando-se 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).

$$\phi_M = \frac{m_s - m_e}{m_s} \quad (03)$$

$$\phi_m = \frac{m_e - m_{wb}}{m_s} \quad (04)$$

$$\phi_{wb} = \frac{m_{wb} - m_d}{m_s} \quad (05)$$



$$\varphi_0 = \frac{m_d}{m_s} \quad (06)$$

$$\varphi_m = \frac{m_s - m_{wb}}{m_s} + Q_m + Q_{m+} \quad (07)$$

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).

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.

## 2.8 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 30 infravermelha de 4000-500  $\text{cm}^{-1}$  em um espectrofotômetro (Cary 630 FTIR, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA), o software utilizado foi o Agilent MicroLab PC Software.

## 2.9 Estudos de adsorção

Estudos de adsorção com uma proteína modelo foram realizados em batelada nos criogéis funcionalizados e controle. Avaliou-se a capacidade adsortiva, a fim de se selecionar uma das matrizes funcionalizadas para prosseguir os estudos. Utilizou-se a albumina de soro bovino (BSA) a uma concentração de 1  $\text{mg.mL}^{-1}$  como proteína modelo em solução fosfato de sódio pH 7,2.

Os adsorventes produzidos foram cortados com uma lâmina de aço em pequenos cubos com cerca de 1,5 mm de aresta. Pesou-se lotes de 30 mg, que foram colocados em tubos de centrífuga, em que foram adicionados 4 mL da solução de BSA na condição desejada, com três repetições. Os tubos foram mantidos sob agitação a 25 rpm por cerca de 14 horas à temperatura ambiente ( $25 \pm 2$ ) °C. Posteriormente, retirou-se o líquido sobrenadante, e a concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976) à 595 nm. A quantidade de proteína adsorvida foi determinada de acordo com a Equação 8:

$$q = \frac{(C_o - C_e)V}{m}$$

Em que  $q$  é a capacidade adsorptiva do adsorvente ( $\text{mg}_{\text{proteína}}/\text{g}_{\text{criogel}}$ );  $C_o$  e  $C_e$  são respectivamente as concentrações inicial e final de proteínas em solução ( $\text{mg}/\text{mL}$ );  $V$  é o volume de solução ( $\text{mL}$ );  $m$  é a massa de criogel seco utilizado.

## 2.10 Purificação em batelada

A purificação com os adsorventes de afinidade por íons metálicos imobilizados produzidos foi conduzida em batelada, utilizando-se tubos Falcon de 50 mL. Nos tubos, 450 mg da matriz funcionalizada com íons de cobre, cortados em discos com cerca 1,7 mm de espessura, foram colocados em contato com 40 mL do extrato bruto do feijão-de-corda, mantidos sob agitação a 25 rpm por cerca de 2 horas à temperatura ambiente ( $25 \pm 2$ ) °C. Após esse período, o sobrenadante foi retirado e avaliada a concentração de proteína (Bradford, 1976). As matrizes foram colocadas em contato com solução tampão fosfato de sódio  $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$  pH 7,0 por 30 min sob agitação constante para remoção das proteínas não adsorvidas. Para a eluição da proteína capturada foi utilizado tampão Glicina-HCL (pH 2,5 0,1 M) sob as mesmas condições de tempo e agitação das outras etapas. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

As soluções eluídas foram avaliadas quanto à concentração de proteínas, teste aglutinante e eletroforese em gel SDS-PAGE.

## 2.11 Purificação em leito monolítico

O uso potencial da matriz produzida na purificação das lectinas também foi avaliado em leito monolítico. Os ensaios de purificação foram realizados utilizando-se um sistema cromatográfico Äkta Pure 25 L (GE Healthcare, Upsalla, Suécia), a uma vazão de  $2 \text{ mL.min}^{-1}$  a 25°C, utilizando-se uma coluna de 11,1 cm de altura e 2 cm de diâmetro da matriz funcionalizada com cobre. A coluna foi equilibrada com quatro volumes de coluna (VC) de tampão fosfato de sódio  $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$  pH 7,0. A solução de alimentação (extrato bruto) foi filtrada e passada através da coluna criogel (7 VC) e a curva de ruptura monitorada utilizando-se um detector UV a 280 nm. Após isso, a coluna foi lavada com cerca de 4 VC do tampão de equilíbrio para retirada do material não-adsorvido. A eluição do material adsorvido foi realizada utilizando-se 5 VC de solução-tampão glicina-HCL pH 2,5  $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ . O pico de eluição observado foi coletado manualmente, logo após o detector, determinando-se o seu início e fim no valor de 0,060 de  $\text{Abs}_{280\text{nm}}$  (60 mAU). Terminada a eluição, a coluna foi lavada com 4 VC de água deionizada e novamente equilibrada com tampão fosfato de sódio pH 7,2. Todo o experimento foi realizado em triplicata. Os picos coletados na etapa de eluição foram dialisados.

## **2.12. Avaliação do extrato e frações eluídas em batelada e em leito monolítico**

### **2.12.1 Determinação da concentração de proteína**

A concentração de proteínas foi determinada de acordo o método descrito por Bradford (1976), utilizando a albumina sérica bovina como proteína padrão para a construção da curva de calibração

### **2.12.2 A atividade aglutinante**

A atividade aglutinante do extrato bruto e dos extratos purificados foi avaliada com base na capacidade de aglutinação de sangue de coelho, de acordo com a metodologia proposta por Dunbar (1987).

O sangue de coelho utilizado nos ensaios de identificação e caracterização das lectinas, foi obtido por secção da veia marginal da orelha dos mesmo, em condições de completa assepsia, seguindo todos os cuidados .

Todas as amostras de sangue coletadas foram misturadas a uma solução de 1,0 mL de uma solução de EDTA a 8%. Depois, foram diluídas em 1 mL de NaCl 0,15 M e centrifugadas a 2000 x g por cinco minutos. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado resuspenso em NaCl 0,15 M para nova centrifugação. O procedimento foi realizado em um total de cinco vezes sendo que, da última suspensão de eritrócitos, uma alíquota de 300 µL foi retirada para a determinação do percentual dos eritrócitos – 3% (v/v).

A determinação da atividade hemaglutinante dos diferentes extratos proteicos obtidos com as diferentes soluções foi determinada por meio de diluições duplo-seriada com NaCl 0,15 M onde, a cada 100 µL de cada diluição, foi adicionado igual volume de uma suspensão de hemácias nativas de coelhos a 3% em NaCl 0,15 M. Os tubos com as diluições foram incubados em estufa a 37 °C durante 20 minutos.

A presença da atividade hemaglutinante foi determinada macroscopicamente sendo os resultados calculados como sendo o inverso do título da maior diluição na base que apresenta nítida aglutinação e da atividade específica da lectina obtida pelo cálculo da UH/mg.

### **2.13. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

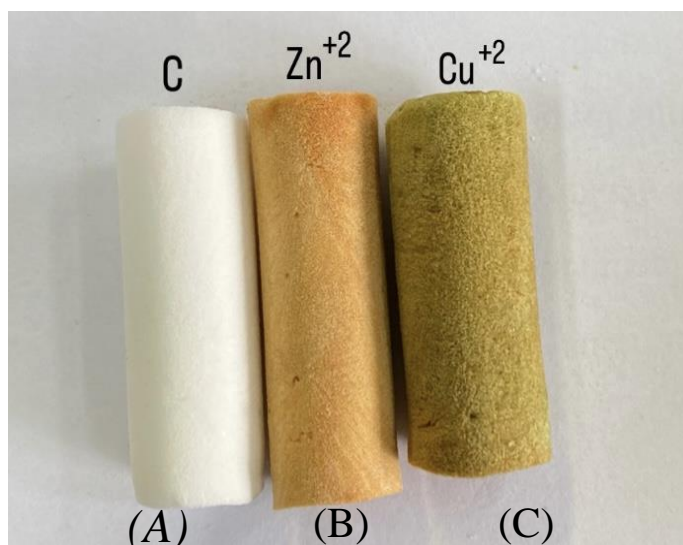
A análise de eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE) foi realizada segundo metodologia proposta por Egito et al. (2006), com modificações.

Para isso, utilizou-se gel de separação com 12% de concentração e gel de empilhamento com 5% de concentração de poliacrilamida. Alíquotas de 30  $\mu\text{L}$  das amostras desnaturadas foram transferidas para cada poço do gel, de modo que a quantidade de proteína aplicada fosse de aproximadamente 10  $\mu\text{g}$ , e as corridas realizadas a uma tensão constante de 100 V (Loccus, LPS 300V, Brasil). Foram usados como padrões de peso molecular: Ovalbumina (45 kDa), lisozima (14,5 kDa,) e BSA (57 kDa,). Após a corrida, o gel foi colocado em uma solução fixadora (10% metanol (v.v<sup>-1</sup>), 5% de ácido acético (v.v<sup>-1</sup>)) por 4 h, e posteriormente as proteínas foram coradas usando solução de 0,1% (m.v<sup>-1</sup>) de Coomassie Blue G-250 e descorado com solução 30% (v.v<sup>-1</sup>) de álcool etílico e 7,5% (v.v<sup>-1</sup>) de ácido acético.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Funcionalização dos adsorventes produzidos

Imagens do criogel controle e dos funcionalizados com diferentes íons metálicos (cobre e zinco) são apresentadas na Figura 2. Os monólitos funcionalizados apresentaram coloração escura proveniente da combinação da presença do íon metálico (azul para o cobre e incolor para o zinco) e da reação de Maillard ocorrida pela presença do glutaraldeído, submetidos à temperaturas moderadas ( $\sim 60^\circ\text{C}$ ) por longo tempo de exposição.



**Figura 2-** Imagens dos Criogéis produzidos. (A) controle sem ativação, (B) Funcionalizado com zinco (C) Funcionalizado com cobre.

Os adsorventes apresentaram estrutura cilíndrica, rígida quando desidratados, uniforme e porosa. Quando umedecidos apresentaram-se esponjosos, elásticos e de aspecto macio. Tais características vêm sendo descritas como características dos monólitos de poliacrilamida, como relatado por diversos autores (MÓL et al., 2019; NASCIMENTO et al., 2019; FARIAS et al., 2020; YANG et al., 2020).

### 3.2 Caracterização dos criogéis produzidos

A capacidade de inchamento (S) nos criogéis produzidos funcionalizados com íons metálicos não apresentaram diferenças estatísticas entre si ( $p > 0,05$ ), mas houve diferença em relação ao controle, como mostrado na Tabela 1.

**Tabela 1-** Caracterização dos criogéis não funcionalizados e os modificados com cobre ( $\text{Cu}^{+2}$ ) e zinco ( $\text{Zn}^{+2}$ ).

Parâmetros	Controle	Modificados	
		$\text{Cu}^{+2}$	$\text{Zn}^{+2}$
Capacidade de inchamento (S) ( $\text{kg.kg}^{-1}$ )	17,93±0,62 <sup>a</sup>	11,15±0,90 <sup>b</sup>	10,83±1,55 <sup>b</sup>
Grau de expansão (ED) ( $\text{L.kg}^{-1}$ )	17,78±5,85 <sup>a</sup>	11,63±0,66 <sup>ab</sup>	10,24±1,07 <sup>b</sup>
Fração de macroporos	0,72±0,07 <sup>a</sup>	0,68±0,03 <sup>a</sup>	0,50±0,08 <sup>b</sup>
Fração de meso/microporos	0,33±0,07 <sup>a</sup>	0,18±0,02 <sup>b</sup>	0,17±0,06 <sup>b</sup>
Fração de água ligada	0,041±0,00 <sup>b</sup>	0,046±0,00 <sup>ab</sup>	0,062±0,00 <sup>a</sup>
Fração de polímero seco	0,05±0,001 <sup>b</sup>	0,08±0,005 <sup>a</sup>	0,09±0,01 <sup>a</sup>
Porosidade total	0,91±0,003 <sup>a</sup>	0,87±0,01 <sup>b</sup>	0,84±0,02 <sup>b</sup>

As médias seguidas pela mesma letra em cada linha não diferem estatisticamente, entre si pelo teste Tukey ( $p > 0,05$ ). Valores médios  $\pm$  desvio padrão

Os valores obtidos demonstram que os adsorventes ocupam um grande volume quando hidratado e reforçam a natureza porosa, conforme descrito por Fontan et al. (2017). Os valores obtidos estão de acordo com o reportado para criogéis de poliacrilamida em diversos estudos da literatura em que os autores relatam valores que variam entre 3,6 a 21,66  $\text{kg.kg}^{-1}$  para a capacidade de inchamento, e uma faixa de 12,7 a 25,30  $\text{L.kg}^{-1}$  para o grau de expansão (CARVALHO et al., 2014; FONTAN et al., 2017; GONÇALVES et al., 2017; FARIÁS et al., 2020).

Observou-se uma pequena redução nos valores dos parâmetros avaliados, exceto para as frações de água ligada e polímero seco. Para a capacidade de inchamento (S) e o grau de expansão (ED) os criogel funcionalizados não apresentaram diferença estatística, já em relação ao controle houve diferença estatística ( $p < 0,05$ ), entretanto os adsorventes funcionalizados não

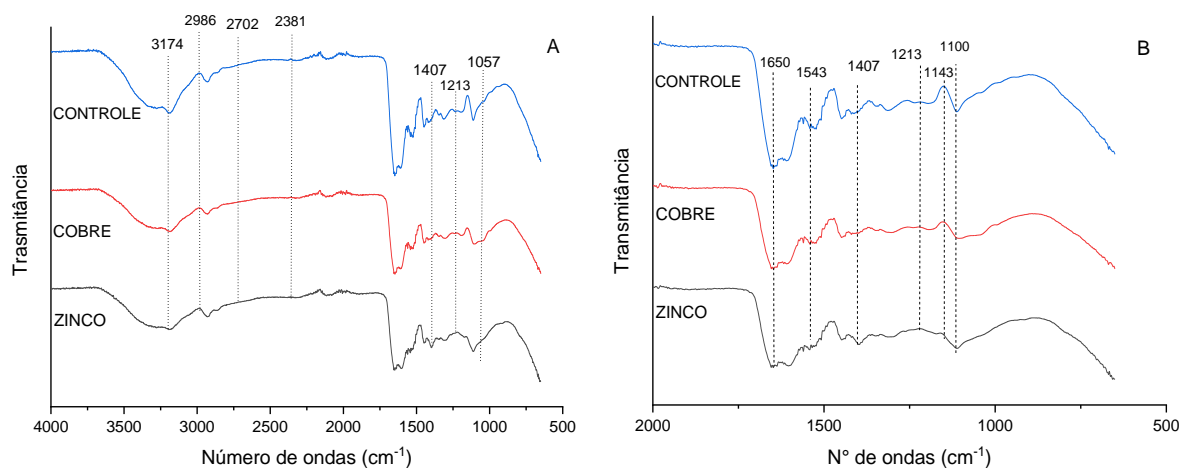
diferiram estatisticamente entre si, o que indica que os íons metálicos interferiram nas propriedades físicas do criogél comparado ao controle.

A capacidade de inchamento é a medida de expansão do criogel e quanto maior o seu valor, mais flexíveis são as matrizes e menos resistentes a pressões antes de sofrerem deformações. Os menores valores obtidos para os criogéis modificados podem ter ocorrido devido a redução do espaço entre os poros e o fortalecimento das ligações cruzadas após a funcionalização, tornando-os menos maleáveis, devido ao glutaraldeído (GONÇALVES et al., 2016). A menor capacidade das matrizes funcionalizadas beneficia o suporte cromatográfico referente a sua resistência mecânica, principalmente em pressões elevadas de escoamento, além de facilitar o manuseio. O grau de expansão é importante, pois fornece uma relação entre a massa do criogel seco e o volume que o mesmo ocupa quando hidratado em condições operacionais (GONÇALVES et al., 2016).

Os criogéis sintetizados ao serem umedecidos com água, permaneceram com uma estrutura consistente, cilíndrica e esponjosa, características também comprovadas por outros autores (ARVIDSSON et al., 2002a; YAO et al., 2007). Além disso, ao serem imersos em água os mesmos voltaram a sua forma original, e ao serem moderadamente espremidos, removendo o excesso de água livre no interior dos poros, não tiveram sua estrutura danificada. A partir das análises realizadas, verificou-se que as matrizes apresentaram elevada porosidade, possuindo em sua estrutura poros grandes, uma vez que sua fração de macroporos variou entre 0,87 e 0,91, característica desejável para o mesmo, uma vez que, são utilizados para o processo de purificação de biomoléculas que em sua maioria possuem tamanhos grandes, facilitando o escoamento de fluídos e o não entupimento das colunas devido a presença de impurezas nas amostras utilizadas. O processo de funcionalização não proporcionou variações bruscas nas estruturas das colunas, não influenciando assim nos processos cromatográficos.

### **3.3 Espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)**

A análise de espectroscopia FTIR foi utilizada para obter informações sobre os grupos funcionais inseridos durante o processo de funcionalização, esses resultados obtidos são apresentados na Figura 3.



**Figura 3-** Espectros de FTIR dos Criogéis produzidos. (A): 500-4000  $\text{cm}^{-1}$ ; (B): 500-2000  $\text{cm}^{-1}$

Em ambas as matrizes (Figuras A e B) foi observada uma banda de vibração na região de  $1650 \text{ cm}^{-1}$  atribuída ao grupamento carbonila ( $\text{C}=\text{O}$ ), proveniente da amida presente nos monômeros (AAM e BAAM) utilizada no processo de síntese do criogel (GONÇALVES et al., 2017).

Foram observados na figura B, na banda de  $1100 \text{ cm}^{-1}$ , que é uma banda acentuada para baixo em  $1100$  no controle, que nos outros é menor, o acontece que nos criogéis funcionalizados o AGE tem o anel epóxi aberto e usado em reações, então é esperado que o sinal do epóxi diminua neles.

Observa-se uma alteração na intensidade dessas bandas na matriz funcionalizada, o que é atribuído à abertura do anel epóxi e alteração da conformação molecular com a inclusão dos braços espaçadores e posterior inclusão do ligantes metálicos. As bandas observadas na matriz funcionalizada em torno de  $1213 \text{ cm}^{-1}$  e  $1407 \text{ cm}^{-1}$  são características de funcionalização com íons metálicos, indicando que a inclusão na matriz polimérica foi bem-sucedida. (DHAFINA et al., 2020).

Em ambas as matrizes se verifica uma banda de vibração na região  $1650 \text{ cm}^{-1}$ , apresentando um maior pico para baixo. característica do grupamento amida existente nas moléculas de AAM e BAAM utilizadas no processo de síntese dos criogéis. (GONÇALVES et al., 2017). Observa-se que há a ocorrência dessa banda em criogéis de poliácridamida (GONÇALVES et al., 2017; NASCIMENTO et al., 2019). Foi verificada na mesma região proveniente dos grupos ésteres no criogel controle, uma diminuição dessa banda quando comparado com o adsorvente funcionalizado, o que pode indicar a interação dos grupamentos carbonilas com a superfície aminada do criogel (KANG et al., 2019; ZHANG et al., 2019).

Mais uma banda importante é observada em torno de  $1143\text{ cm}^{-1}$  que indica o estiramento do grupo C-O devido à presença do grupamento éter e dos radicais epóxi, respectivamente, provenientes do AGE (MÓL et al., 2017; SILVA et al., 2019). Uma redução nessa banda foi observada para as matrizes funcionalizadas indicando a interação do anel epóxi com grupamentos metálicos dos compostos utilizados na ativação, e a alteração da estrutura molecular com a inclusão dos braços espaçadores. É possível verificar bandas referentes ao estiramento C-O em regiões próximas em torno de  $1013\text{ cm}^{-1}$ , entretanto é observado que com a inclusão dos íons de cobre essa banda sofreu um deslocamento para  $1143\text{ cm}^{-1}$ , o que pode justificar o fato da redução dessa banda ter sido mais intensa no criogel imobilizado com Cobre (DHAFINA et al., 2020).

Estes resultados indicam a diferença entre a matriz controle e funcionalizada, onde as matrizes funcionalizadas possuem uma característica de funcionalização para purificação mais bem-sucedida.

### 3.4. Ensaios de adsorção

A capacidade de adsorção das matrizes controle e funcionalizadas com cobre e zinco são apresentadas na Tabela 2. Observa-se que as matrizes funcionalizadas apresentaram uma capacidade de adsorver a proteína modelo (BSA) maior que a matriz controle. Isso pode ser explicado porque a adsorção irá ocorrer a depender do número e tipo de grupos de aminoácidos que podem interagir com um metal específico. Assim sendo, os criogéis funcionalizados com íons de  $\text{Cu}^{+2}$  apresentaram mais afinidade de interação com os resíduos de histidina, triptofano e cisteína.

**Tabela 2-** Análise de adsorção com BSA.

Parâmetros	Controle	Cobre	Zinco
Capacidade adsortiva (mg/g <sub>criogel seco</sub> )	24,72±0,9 <sup>c</sup>	47,6±0,8 <sup>a</sup>	39,97±0,08 <sup>b</sup>

As médias seguidas pela mesma letra em cada linha não diferem estatisticamente, entre si pelo teste Tukey ( $p > 0,05$ ). Valores médios ± desvio padrão

Fonte: Próprio autor, 2022.

Nos processos de cromatografia IMAC, a adsorção ocorre principalmente por meio da afinidade mais forte dos resíduos de histidina pelos íons metálicos, entretanto, a cisteína e resíduos adjacentes dos aminoácidos podem contribuir para a retenção da proteína (Acet et al., 2018).



De modo geral, qualquer íon metálico que apresente a capacidade de interagir com proteínas pode ser utilizado em IMAC. Porém o  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$  e outros são utilizados na purificação de proteínas que possuam resíduos de histidina, triptofano e cisteína, pois os íons metálicos interagem com o nitrogênio aromático dos grupamentos imidazol, indol e com o enxofre do grupamento tiol, respectivamente, de cada aminoácido. No entanto, pode ser observado que neste experimento, a coluna funcionalizada com cobre imobilizado apresentou uma capacidade adsortiva média de 47,6 mg de BSA / g de criogel seco. Esse valor foi superior às outras colunas ativadas com cobre, que tiveram capacidade adsortiva variando de 34,72 a 39,07 mg de BSA/ g de criogel seco. (MOSER et al., 2011).

### 3.5. Estudo da purificação parcial em batelada

A partir dos testes de purificação em batelada com extrato do feijão-de-corda verificou-se que os adsorventes apresentaram capacidade seletiva para a adsorção de lectinas, conforme verifica-se na Tabela 3. Observou-se que os criogéis funcionalizados apresentaram diferença significativa para o fator de purificação comparado com o controle, obtendo os melhores resultados nos funcionalizados.

Houve reação positiva para aglutinação em todas as frações do extrato purificado como mostra a Tabelas 3, comprovando a presença de lectinas nas mesmas, uma vez que, as lectinas possuem a habilidade de ligar-se com açúcares presentes na membrana de hemácias, e formar uma rede, que é então denominada de aglutinação. (Kabir et al., 1998; Roy et al., 2005), o que pode sugerir a presença da mesma nos eluídos obtidos.

**Tabela 3:** Resultados do teste de hemaglutinação realizado em extratos eluídos com Glicina-HCL pH 2,5 em batelada.

<b>Matriz usada</b>	<b>CP (mg/ml)</b>	<b>FR</b>	<b>AHE (HU/mg/mL)</b>	<b>FP</b>
Cobre	0,69±0,04	512	742,0	5,6
Zinco	0,47±0,05	256	544,7	4,1
Controle	0,24±0,03	32	133,3	1,0
Ext. Bruto:	7,67±0,15	1024	133,5	-

CP – Concentração de proteína, AHE – atividade específica hemaglutinante, FR – fator de diluição da atividade, FP- Fator de purificação.

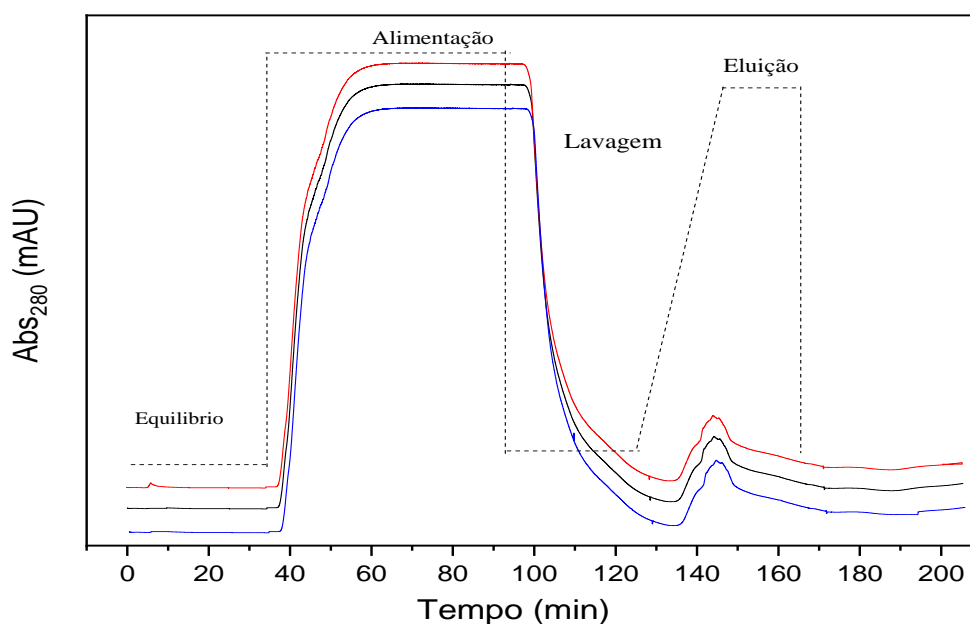
Os criogéis ativados exerceram sua função, que é possibilitar uma maior quantidade de lectina adsorvida. Melhores resultados foram obtidos com criogel funcionalizado com cobre, utilizando-se apenas ele para purificação em leito monolítico, como mostra o resultado na Tabela 4.

Os resultados positivos de hemaglutinação foram detectados visualmente através da formação de uma rede ou malha de hemácias no fundo dos tubos. Foram considerados negativos os tubos onde era possível visualizar um compacto homogêneo de células. A interação das lectinas com eritrócitos ocorre devido estes possuírem receptores similares àqueles contra qual a lectina foi desenvolvida, tendo mais de uma função em uma denominada espécie ou tendo função diferente em diferentes espécies (TOMS, 1971). Os resultados encontrados neste trabalho demonstraram que a lectina de feijão-de-corda aglutina eritrócitos de coelho.

### 3.6. Purificação parcial de lectinas do extrato do feijão-de-corda em leito monolítico

Após a obtenção dos resultados da purificação parcial em batelada, realizou-se a captura das proteínas utilizando-se um leito monolítico, em um sistema cromatográfico Akta Pure, utilizando o extrato bruto do feijão-de-corda.

O perfil de captura e eluição na purificação das proteínas obtidas a partir do extrato bruto do feijão-de-corda é apresentado na Figura 4. Foram observadas três etapas principais: o equilíbrio da coluna, lavagem e eluição da matéria-prima.



**Figura 04-** Perfil de adsorção da purificação do extrato de feijão-de-corda com criogel de cobre por IMAC em sistema cromatográfico Akta Pure.

Verificou-se a presença de um único pico de eluição e que entre as triplicatas o comportamento foi o mesmo, o que pode ser atribuído a especificidade do criogel IMAC imobilizado com cobre, além de demonstrar que a condição de eluição usada foi eficiente na obtenção da proteína desejada.

Os valores obtidos para as concentrações de proteína total de alimentação e pico coletado, bem como o fator de purificação são apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4:** Resultados do teste de aglutinação realizado em extratos eluídos com Glicina-HCL pH 2,5 nos ensaios em coluna.

<b>AMOSTRAS</b>	<b>CP (mg/ml)</b>	<b>FR</b>	<b>AHE (HU/mg/mL)</b>	<b>FP</b>
Eluído cobre	0,51±0,03	512	1003,9	7,5
Ext. Bruto:	7,67±0,15	1024	133,5	-

CP – Concentração de proteína, AHE – atividade específica hemaglutinante, FR – fator de diluição da atividade, FP- Fator de purificação.

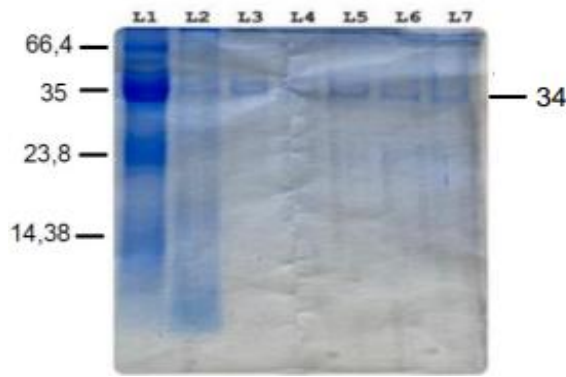
O fator de purificação obtido indica que se conseguiu um produto final 7,5 vezes mais puro que a alimentação, com apenas uma etapa de purificação.

O fator de purificação obtido no presente trabalho foi satisfatório. Resultados estes, demonstram o potencial do método empregado na purificação da lectina do feijão-de-corda. Quando interagem com glicoconjugados, no caso das hemácias, as lectinas promovem a formação de ligações entre a superfície de células adjacentes através de pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas, entre outras, acarretando na aglutinação das mesmas (PEUMANS & VAN DAMME, 1995). Deste modo, esta característica típica das lectinas, foi utilizada para a identificação da presença da mesma em sementes de feijão-de-corda.

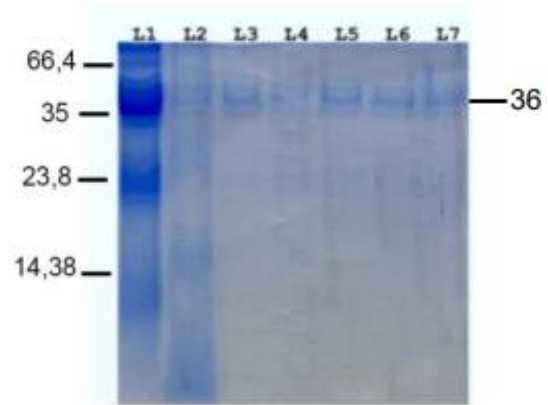
### 3.7. Eletroforese SDS-PAGE dos extratos obtidos

O perfil eletroforético do extrato bruto e dos extratos parcialmente purificados em batelada e em leito monolítico obtidos, são apresentados na Figura 5. 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 em todos os extratos parcialmente purificados (L2 a L7) verifica-se uma banda dominante correspondentes a massa molecular próxima a 35 kDa. Observa-se também nas frações purificadas outras bandas fracas indicando que a purificação foi parcial.

**Figura 5-** Imagem dos géis de eletroforese SDS-PAGE em batelada e Leito monolítico.



**Imagem A:** Eluição em leite monolítico: L1= Marcador molecular (Lisozima 14,38 kDa, Tripsina 23,8, kDa, Pepsina 35 kDa; Albumina (BSA) 66,4 kDa) L2= Extrato Bruto, L3 a L7= Eluidos com



**Imagem B:** Eluição em batelada: L1= Marcador molecular (Lisozima 14,3; Tripsina 23,8 kDa, Pepsina 35 kDa Albumina (BSA) 66 kDa; L2= Extrato Bruto, L3 a L5= Cobre e L6 e L7=

Essa banda proteica principal em torno de 35 kDa, nos extratos eluídos, é perfil proteico comum observado para outras lectinas do feijão. Essas proteínas ocorrem nas sementes e resultam do processamento de um precursor glicosilado complexo durante a maturação da semente, como relatado para a ConA (Bowles et al., 1986). A subunidade principal da ConA compreende 237 resíduos de aminoácidos e duas outras subunidades,  $\beta$  e  $\gamma$ , são fragmentos naturais da subunidade  $\alpha$ , as quais ocorrem na estrutura quaternária dessas lectinas (Richardson et al., 1984). A lectina ConBr, apresenta três subunidades com 12, 30 e 36 kDa, e são encontradas na maioria dos feijões. (GRANGEIRO et al., 1997) assim como a de *Dioclea lasiocarpia* (NASCIMENTO et al., 2012), *D. virgata* e a lectina P4 de *D. sericia* (SIERRA; PEREZ, 1999) que também apresentam três subunidades e ConBr II, a qual apresenta quatro subunidades com pesos estimados em 25, 34, 41, e 45 kDa muito encontradas nas leguminosas. Esse mesmo padrão é visualizado indicando que o evento é comum de lectinas de feijões, é um dos acontecimentos que tem sido descrito para as lectinas de *Dioclea* e *Canavalia*, uma vez que lectinas de leguminosas têm sido isoladas de várias espécies. (Grangeiro et al., 2007).

#### **4. CONCLUSÕES**

Neste estudo observou-se a purificação parcial de lectinas obtidas a partir do extrato do feijão-de-corda, utilizando um adsorvente monolítico de afinidade por íons metálicos produzido no próprio laboratório. Os resultados indicaram que a utilização do extrato bruto como solução de alimentação e a realização da eluição com tampão glicina-HCL, pH 2,5, foram satisfatórios, verificando-se um fator de purificação superior a 5 vezes. Por meio da análise de SDS-PAGE, identificou-se banda forte em toda as frações coletadas, indicando a presença da lectina. Assim, é possível dizer que as colunas monolíticas supermacroporosas funcionalizado com cobre ( $\text{Cu}^{+2}$ ), que obtiveram melhores resultados, são capazes de purificar a lectinas presentes nos extratos de feijão-de-corda.

## 5. REFERÊNCIAS

ACET, O.; ÖNAL, B.; SANZ, R.; SANZ-PÉREZ, E.S.; ERDÖNMEZ, D.; ODABAŞI, M. Preparation of a new chromatographic media and assessment of some kinetic and interaction parameters for lysozyme. **Journal of Molecular Liquids**, v. 276, p. 480-487, 2019.

ARVIDSSON, P, ET AL. (2003). *Journal of Chromatography A*, v.986, 275-290.

BOWLES, D.J.; MARCUS, S.E.; PAPPIN, D.J.C.; FINDLAY, J.B.C.; ELIOPOULOS, E.; MAYCOX, P.R. and BURGESS, J. 1986. Posttranslational processing of Concanavalin A precursors in Jack bean cotyledons. *The Journal of Cell Biology*, 102, 1284-1297.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 27, p. 248-254, 1976.

CARVALHO, B. M. A.; SILVA JÚNIOR, W. F. ; CARVALHO, L. M. ; MINIM, L. A. ; CARVALHO, G. G. P. . Steric mass action model for lactoferrin adsorption in cryogel with immobilized copper ions. *Brazilian Journal of Chemical Engineering (Online)*, v. 33, p. 215-223, 2016.

CARVALHO, B.M.A.; CARVALHO, L.M.; SILVA Jr., W.F.; MINIM, L.A.; SOARES, A.M.; CARVALHO, G.G.P.; Da SILVA, S.L. Direct capture of lactoferrin from cheese whey on supermacroporous column of polyacrylamide cryogel with copper ions. **Food Chemistry**, v. 154, p. 308-314, 2014.

CARVALHO, B.M.A.; SILVA JÚNIOR, W.F.; CARVALHO, L.M.; MINIM, L.A.; CARVALHO, G.G.P. Steric mass action model for lactoferrin adsorption in cryogel with immobilized copper ions. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.33, p. 215-223, 2016.

CAVADA, B.S.; MOREIRA-SILVA, L.I.M.; GRANGEIRO, T.B.; SANTOS, C.F.; PINTO, V.P.T.; BARRAL NETTO, M.; ROQUE-BARREIRA, M.C.; GOMES, J.C.; MARTINS, J.L.; OLIVEIRA, J.T.A. & CAVADA, B.S. 2012. Purification and biological properties of a lectin from *Canavalia bonariensis* Lind. Seeds.

CRUZ, G. A. D. R.; OLIVEIRA, M. G. A.; PIRES, C. V.; GOMES, M. R. A.; COSTA, N. M. B.; BRUMANO, M. H. N.; MOREIRA, M. A. Protein quality and *in vivo* digestibility of different varieties of bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Braz. J. Food Technol.**, v. 6, n. 2, p.157-162, 2013.

DHAFINA, W. A.; DAUD, M. Z.; SALLEH, H. The sensitization effect of anthocyanin and chlorophyll dyes on optical and photovoltaic properties of zinc oxide based dye-sensitized solar cells. *Optik*, n. September, p. 163808, 2020.

DURANTI M. Grain legume proteins and nutraceutical properties. **Fitoterapia.**, v.77, p. 67-82, 2006.

EGITO, A.S.; ROSINHA, G.M.S.; LAGUNA, L.E.; MICLO, L.; GIRARDET, J. M.; GAILLARD, J.L. Método eletroforético rápido para detecção da adulteração do leite caprino com leite bovino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 5, p. 932-939, 2006.

EMBRAPA MEIO NORTE. **Cultivo de feijão caupi**. Jul/2013. Disponível em: <http://www.cpamn.embrapa.br/pesquisa/graos/FeijaoCaupi/referencias.htm>. Sistema de Produção, 2 ISSN 1678-8818. Acesso em: 22 ago.2022.

EROL, B.;EROL, K.;GÖKMEŞE, E. The effect of the chelator characteristics on insulin adsorption in immobilized metal affinity chromatography. *Process Biochemistry*. Volume 83, August 2019, Pages 104-113.

FARÍAS, T.; HAJZADEH, S.; YE, L. Cryogels with high cisplatin adsorption capacity: Towards removal of cytotoxic drugs from wastewater. **Separation and Purification Technology**, v. 235, p. 116203, 2020.

FONTAN, R.C.I.; BONOMO, R.C.F.; GONÇALVES, G.R.F.; MINIM, V.P.R.; MINIM, L.A. Alternatives for Characterizing Macroporous Polyacrylamide Monolithic Ion Exchanger Columns. **Polymer Engineering and Science**, v. 85, p. 1717-1725, 2017.

GONÇALVES, G. R. F. **Desenvolvimento de adsorventes supermacroporosos para a purificação de lectinas por afinidade com açúcares. 91 p.** Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, 2016

GONÇALVES, G. R. F.; GANDOLFI, O. R. R.; SANTOS; C. M. S.; BONOMO, R. C. F.; VELOSO, C. M.; FONTAN; R. C. I. Development of supermacroporous monolithic adsorbents for purifying lectins by affinity with sugars. **Journal of Chromatography B**, v. 1033-1034, p. 406-412, 2016.

GONÇALVES, G.R.F.; GANDOLFI, O.R.R.; SANTOS, L.S.; BONOMO, R.C.F.; VELOSO, C.M.; VERÍSSIMO, L.A.A.; FONTAN, R.C.I. Immobilization of sugars in supermacroporous cryogels for the purification of lectins by affinity chromatography. **Journal of Chromatography B**, v.1068-1069, p. 71-77, 2017.

GRANGEIRO, T. B; GATEHOUSE, J. A PEREIRA, M. N.; CAVADA, B. S. 2007. Investigation on the origin of the naturally occurring fragments of Cratylia floribunda lectin. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, Brasil, 9, 1, 9-13.

GRANGEIRO, T.B.; SCHRIEFER, A.; CALVETE, J.J.; RAIDIA, M.; URBANKE, C.; BARRAL-NETTO, M.; CAVADA, B.S. Molecular cloning and characterization of ConBr, the lectin of *Canavalia brasiliensis* seeds. *European Journal of Biochemistry*, v. 248, p. 43- 48, 1997

HAN, J. CAI, Y. WANG, L. MAO, Y. NI, L. WANG, Y. A high efficiency method combining metal chelate ionic liquid-based aqueous two-phase flotation with two-step precipitation process for bromelain purification. *Food Chemistry*, 309, 2020.

IQBAL, A.; KHALIL, I. A.; ATEEQ, N.; KHAN, M. S. Nutrition quality of important food legumes. **Food Chem.** v. 97, p. 331-335, 2006.

KABIR, S. (1995). *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, v.27, 147-156.

KHANG, N. Q.; JEAN-LUC, G ; JOHAN H. A blood group A specific lectin from the seeds of *Crotalaria striata*. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1033, p.210-213, 1990.

KIRCHERT, S.; KAISERB, R.E. MORLOCK, G.E. In-process quality control of wine by planar chromatography versus micro planar chromatography, *Journal of Chromatography A*, v. 1588, 15, p. 137-149, 2019.

KUMAR, A.; BANSAL, V.; ANDERSSON, J.; ROYCHOUDHURY, P. K.; MATTIASSON, B. Supermacroporous cryogel matrix for integrated protein isolation immobilized metal affinity 35 chromatographic purification of urokinase from cell broth of a human kidney cell line. **Journal of Chromatography A**, v.1103, 35-42, 2006.

- LOZINSKY, V.; PLIEVA, F.; GALAEV, I.; MATTIASSON, B. **The potential of polymeric cryogels in bioseparation. Bioseparation**, v. 10, n. 4, p. 163-188, 2001.
- LYNCH, K.B.; REN, J.; BECKNER, M.A.; HE, C.; LIU, S. Monolith columns for liquid chromatography separations of intact proteins: A review of recent advances and applications. *Analytica Chimica Acta*. Volume 1046, 10 January 2019, Pages 48-68.
- MÓL, P.C.G.; VERÍSSIMO, L.A.A.; ELLER, M.R.; MINIM, V.P.R.; MINIM, L.A. Development of an affinity cryogel for one step purification of lysozyme from chicken egg White. **Journal of Chromatography B**, v. 1044, p. 17-23, 2017.
- MÓL, P.C.G.; VERÍSSIMO, L.A.A.; MINIM, L.A.; BOSCOLO, M.; GOMES, E.; Da SILVA, R. Production and capture of  $\beta$ -glucosidase from *Thermoascus aurantiacus* using a tailor made anionic cryogel. **Process Biochemistry**, v.89, p.75-83, 2019.
- MONTOYA, C.A.; LALLÈS, J.-P.; BEEBE, S.; LETERME, P. Phaseolin diversity as a possible strategy to improve the nutritional value of common beans (*Phaseolus vulgaris*). **Food Research International**, 43, p.443–449, 2010.
- MOREIRA, R.A, et al . Isolation and partial characterization of a lectin from *Dioclea rostrata* Benth seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 8, p. 31-36, 1996.
- MOSER, A. C.; HAGE, D.S. Cromatografia de imunoafinidade: uma introdução para aplicações e desenvolvimentos recentes. *Bioanalysis*. 2011 abril; 2 (4). 769-790 doi: 10.4155/bio.10.3. Disponível em PMC 2011 01 de fevereiro;
- NASCIMENTO, A.S. F.; GONDIM, A.C.S.; CAJAZEIRAS, J.B.; CORREIA, J.L.A.; PIRES, A.; NASCIMENTO, K.S.; SILVA, A.L.C.; NAGANO, C.S.; ASSREY, A.M.S.; CAVADA, B.S. Purification and partial characterization of a novel lectin from *Dioclea lasiocarpa* Mart seeds with vasodilator effects. *Journal of Molecular Recognition*, v. 25, n.12, p. 657-664, 2012.
- NASCIMENTO, I.S.; SILVA, D.L.; PEREIRA, T.B.; GONÇALVES, G.R.F.; VERÍSSIMO, L.A.A.; VELOSO, C.M.; BONOMO, R.C.F.; FONTAN, R.C.I. Capture of Lectins from jackfruit (*Artocarpus integrifolia*) seeds in a single step using a supermacroporous ion exchange cryogel. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, v. 18, p. 313-324, 2019.
- NASCIMENTO, R.F; DE LIMA, A.C.A.; VIDAL, C.B. Adsorção: aspectos teóricos e aplicações ambientais. - Fortaleza: Imprensa Universitária, 2014. 256 p. : il. ; 21 cm. (Estudos da Pós - Graduação) ISBN: 978-85-7485-186-0
- PANDO, L. A.; Caracterização físico-química e biológica de proteínas isoladas de sementes de leguminosas: lectinas e inibidores de proteinases. Campinas, São Paulo, 2001.
- PERSSON, P., BAYBAK, O., PLIEVA, F.M., GALAEV, I.Y., MATTIASSON, B., NILSSON, B., AXELSSON, A. Characterization of a continuous supermacroporous monolithic matrix for chromatographic separation of large bioparticles. **Biotechnology and Bioengineering** 88, 224, 2004.
- PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Plant lectins: versatile proteins with
- PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E.J.M. Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiol.*, v.109, p.347-352, 1995
- PLIEVA, F. M, ET AL. (2002). *Journal of Chromatography A*, v.977, 27-38.



PLIEVA, F. M.; SAVINA, I. N.; DERAZ, S.; ANDERSSON, J.; GALAEV, I. Y.; MATTIASSON, B. Characterization of supermacroporous monolithic polyacrylamide based matrices designed for chromatography of bioparticles. **Journal of Chromatography B**, v. 807, n. 1, p. 129-137, 2004a.

PLIEVA, F.M, SAVINA, I.N, DERAZ, S, ANDERSSON, J, GALAEV, I.Y, MATTIASSON, B, Characterization of supermacroporous monolithic polyacrylamide based matrices designed for chromatography of bioparticles, **Journal of Chromatography B** 807 129–137, 2004b.

RICHARDSON, M.; CAMPOS, F.D.A.P.; MOREIRA, R.A.; AINOUS, I.L.; BEGBIE, R.; WATT, W.B. & PUSZTAI, A. 1984. The complete amino acid sequences of the major a-subunit of the lectin from the seeds of *Dioclea grandiflora* (Mart). *European Journal Biochemistry*, 144, 101-111.

ROY, I.; SARDAR, M.; GUPTA, M. N. (2005). *Biochemical Engineering Journal*, v.23, 193-198.

SIERRA, A.; Y, PÉREZ, G. Extracción, purificación, caracterización de dos lectinas em semillas de *Dioclea sericia*. *Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, v. 23, n. 88, p. 445-454, set 1999.

TOMS, G.C.; WESTERN, A. Phytoemagglutinins. In: HARBONE, J.B.; BOUTLER, D.; TURNER, B.L. (eds). *Chemotaxonomy of Leguminosae*. Academic press, London, 1971.

UYGUN M.; AKDUMAN, B.; ERGÖNÜL, B.; UYGUN, D. A.; AKGÖL, S. DENIZLI A. Immobilization of Amyloglucosidase onto Macroporous Cryogels for Continuous Glucose Production from Starch. *Journal of Biomaterials Science*, v. 26, p. 1112-1125, 2015.

VAN DAMME, E.J. M.; PEUMANS, W. J.; BARRE, A.; ROUGE P. Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. *Crit. Rev. Plant. Sci*; 17:575–692, 1998.

VAN DRIESCHE, E.; FISHER, J.; BEECKMANS, S. & BOG-HANSEN, T.C. (Ed) *Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*. Denmark, Textop, 11, 74-80.

WANG, J.; ZHANG, R.; YANG, X.; LIU, X.; ZHANG, X. Facile synthesis of copper(II)-decorated functional mesoporous material for specific adsorption of histidine rich proteins. *Talanta*. Volume 176, 1 January 2018, Pages 308-317.

YANG, X.; DEBELI, D.K.; SHAN, G.; PAN, P. Selective adsorption and high recovery of  $\text{La}^{3+}$  using graphene oxide/poly (N-isopropyl acrylamide-maleic acid) cryogel. **Chemical Engineering Journal**, v. 379, p. 122335, 2020.

YAO, K.; SHEN, S.; YUN, J.; WANG, L.; CHEN, F.; YU, X. Protein adsorption in supermacroporous cryogels with embedded nanoparticles. **Biochemical Engineering Journal**, v. 36, n. 2, p. 139-146, 2007b. ISSN 1369-703X.

YAO, K.; SHEN, S.; YUN, J.; WANG, L.; HE, X.; YU, X. Preparation of polyacrylamide-based supermacroporous monolithic cryogel beds under freezing-temperature variation conditions. **Chemical engineering science**, v. 61, n. 20, p. 6701-6708, 2006<sup>a</sup>.

YAO, K.; YUN, J.; SHEN, S.; CHEN, F. (2007). *Journal of Chromatography A*, v.1157, 246-251.