

PAULA PERAZZO DE SOUZA BARBOSA

**“PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE
LECTINAS DO EXTRATO DE SEMENTES DE *Canavalia brasiliensis* (FEIJÃO-
BRAVO-DO-CEARÁ)”**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

**JOÃO PESSOA - PB
2013**

PAULA PERAZZO DE SOUZA BARBOSA

**“PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE
LECTINAS DO EXTRATO DE SEMENTES DE *Canavalia brasiliensis* (FEIJÃO-
BRAVO-DO-CEARÁ)”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Ciências Exatas e da Natureza, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de **MESTRE EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**.

Orientadora: Profa. Dra. Tatiane Santi Gadelha

JOÃO PESSOA - PB
2013

PAULA PERAZZO DE SOUZA BARBOSA

Dissertação de Mestrado avaliada em 24/05/2013

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Tatiane Santi Gadelha
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Universidade Federal da Paraíba
Orientadora

Profa. Dra. Rita de Cássia Ramos do Egypto Queiroga
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição
Universidade Federal da Paraíba
Examinadora Externa

Profa. Dra. Darlene Camati Persuhn
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Universidade Federal da Paraíba
Examinadora Interna

Profa. Dra. Marciane Magnani
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos
Universidade Federal da Paraíba
Suplente Externo

Profa. Dra. Naila Francis Paulo de Oliveira
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Universidade Federal da Paraíba
Suplente Interno

DEDICATÓRIA

Ao nosso Deus, pelo dom da vida e da convivência.

Aos meus pais, Adriano e Elizabeth; e à minha irmã Marilda.

Dedico este trabalho com todo amor e carinho.

“A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido e não na vitória propriamente dita.”

Mahatma Gandhi

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus pela oportunidade de conquistar essa vitória tão importante na minha vida.

À minha orientadora, a professora Dra. Tatiane Santi Gadelha, pela confiança, apoio e dedicação depositados em mim durante o desenvolvimento desse trabalho. Obrigado por ter aceitado me orientar nesse curso.

Aos meus pais Adriano Perazzo Barbosa e Maria Elizabeth de Souza Barbosa por me ajudarem e confiarem em mim nessa caminhada tão importante. Amo vocês.

Aos tios Normando Perazzo Barbosa e Yolanda Wanderley por toda a assistência e incentivo durante o meu período em João Pessoa.

Aos tios Alessandra Perazzo Barbosa e Francisco Ocian Mota; aos meus primos e à minha avó paterna Sílvia Perazzo Barbosa por toda ajuda e estímulo.

À minha irmã Marilda Perazzo por todo auxílio, em especial pela revisão final do texto desse trabalho.

Aos coordenadores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – PGBCM durante o meu período de curso; e à secretária do PGBCM, Ludmilla Maull por toda a atenção concedida sempre que solicitada.

Aos professores do mestrado que muito contribuíram na minha formação acadêmica durante o primeiro ano do curso, bem como aos demais funcionários do DBM por serem tão atenciosos, em especial Geralda.

Às professoras que aceitaram participar da Banca Avaliadora do meu trabalho.

Ao professor Dr. Carlos Alberto de Almeida Gadelha por todo o auxílio.

À professora Dra. Darlene Camati Persuhn pela orientação no REUNI e pelas lições.

À professora Dra. Hilzeth de Luna Freire Pessoa pela boa convivência.

Aos colegas da turma do mestrado de 2011: Danielle Vasconcelos, Cynthia Farias, Daniel Lima, Emanuelle Batista, Fernando Queiroga, Germana Rêgo, Gilmara Araújo, Guilherme Batista, Isabela Arruda, Jonathas Diego, Juarez Nóbrega, Nureyev Ferreira, Sarah Gurgel, Suellen Menezes, Tarcísio Coutinho, Vanessa Abrantes e Yara Rodrigues pelo bom convívio durante as aulas no primeiro ano de curso.

A todos os estudantes que fizeram parte do BioGeR - Lab durante o meu curso:

João Vítor Pires “Juru” pelo auxílio na pesquisa sempre que solicitado mesmo com seu tempo limitado por causa da graduação e é claro, pelas risadas proporcionadas. Tá vendo aí como eu cumpro o que prometo: o maior parágrafo dos meus agradecimentos foi para você Pires.

Daniel “Piancó” Lima de Farias, colega de turma cujas origens estão lá no Sertão parabaino, por proporcionar sempre boas risadas e é claro, por toda a ajuda fornecida. Valeu pela amizade.

Maria Emília Evaristo, que me ajudou nos meus primeiros dias de laboratório. Adorei ter te conhecido Milhinha!!!

Rayane Delfino, que me acompanhou durante boa parte da realização desse trabalho e me ajudou no início dos experimentos.

Juarez Nóbrega, também colega de turma. Valeu pelas conversas, pela a ajuda que me deu no laboratório sempre que eu precisava e é claro, pela amizade.

Rodrigo Lacerda, responsável por 99,999% dos momentos de descontração, pela amizade e ajuda concedida;

Whyara Almeida, Gracy Vasconcelos, Carolina Leal, Alana Braga e Ednamarah Luana pelas sugestões, conversas e ajuda nos experimentos; Elba Ferreira pelos diálogos que tínhamos no laboratório quando ficávamos até mais tarde trabalhando lá; Amanda Florentino e Júlia Martini, meninas muito legais que adorei ter conhecido. Obrigada pela amizade e muito sucesso para todas vocês!

Luciana Maria pelos momentos hilários e por toda ajuda concedida; Paulo Jota pela amizade; Hellane Palmeira, quem sempre me estimulou a seguir em frente; e Maria Rita Toledo, funcionária muito competente que me falou muitas palavras de apoio.

Guga (Gregório) – sempre muito prestativo e brincalhão. Valeu pela atividade antibacteriana! E João Ricardo que sempre dava boas sugestões e ajudava nos ensaios quando solicitado.

Aos demais companheiros: Andressa Lira, Rayane Maciel, Ingrid Louise, Sâmia Duarte, Andreia Rolim, Andreia Gadelha, Segundo Chaves, Sandro Mascena, Vinícius de Moraes, Joana Leite, Neto Viana, Amanda França, Rainner Magalhães, Normando Costa, Maria Clara Ventura e Mayza Neves.

E para concluir:

Aos amigos que estavam em Catolé do Rocha/PB; e aos vizinhos de apartamento com os quais tive um pouco mais de contato durante esse período apesar do tempo deles ser bem limitado: Eugênio Patrício, Pollyana Ribeiro e Mojtaba Armandei. Vocês três também tiveram participação no desenvolvimento do meu trabalho com as dicas que me davam.

Àqueles que eu não citei aqui, mas que de alguma maneira me ajudaram.

Muito obrigada e que Deus os abençoe sempre!!!

Paula Perazzo

RESUMO

Canavalia brasiliensis pertence à família Leguminosae e sendo conhecida como feijão-bravo-do-Ceará, é uma espécie predominante do Continente Americano. No Brasil pode ser encontrada nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste. Muitas espécies de plantas contêm proteínas de ligação a carboidratos as quais são comumente chamadas de lectinas ou aglutininas as quais são distribuídas em praticamente todos os organismos vivos. O referido trabalho objetivou detectar, purificar e caracterizar físico-quimicamente uma nova lectina ConBr do extrato das sementes de *C. brasiliensis* e avaliar sua relação com bactérias patogênicas e processos inflamatórios. A lectina com afinidade por eritrócitos de coelho foi isolada através de cromatografia de afinidade em matriz de sephadex G-50 seguida de quitina; e exclusão molecular em sistema HPLC. O grau de pureza e o peso molecular da lectina foram determinados por eletroforese SDS-PAGE. A proteína foi caracterizada quanto à natureza glicoproteica, especificidade a açúcares e glicoproteínas, resistência ao pH, temperatura, agentes desnaturantes, redutores, oxidantes e quelantes. A lectina apresentou na SDS-PAGE duas bandas de 25 e 45 kDa e um teor de 47 µg de carboidratos. Foi específica para manose, frutose e maltose. Foi inativada quando aquecida a 90 °C e 100 °C durante 10 minutos e em pH 5,0 e 13,0. Teve sua atividade reduzida na presença de ureia 4 e 8 M e do metaperiodato de sódio; e aumentada com o β-mercaptoetanol; é uma metaloproteína dependente de Mg^{2+} para a estabilização do seu sítio de ligação a carboidratos. Não apresentou atividade frente às bactérias *Bacillus subtilis* ATCC 0516, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 8027, *P. aeruginosa* ATCC 25619, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *S. aureus* ATCC 25925 e no modelo de peritonite induzido por carragenina em camundongos, a lectina não se mostrou tóxica para os animais e exibiu efeito antiinflamatório através da redução da permeabilidade dos vasos sanguíneos e da migração dos neutrófilos no peritônio dos animais.

Palavras-chave: Lectinas vegetais. Leguminosae. *Canavalia brasiliensis*.

ABSTRACT

Canavalia brasiliensis belongs to the family of Leguminosae and known as feijão-bravo-do-Ceará, it's a species from Americas. In Brazil it can be found in the North, Northeast, Midwest and Southeast. Many species of plant contain carbohydrate-binding proteins which are commonly called lectins or agglutinins which are distributed in virtually all living organisms. That study aimed to detect, purify and characterize physico-chemically a ConBr new lectin from extract of the seeds of *C. brasiliensis* and to evaluate its relationship with pathogenic bacteria and inflammatory processes. The lectin, with affinity for rabbit erythrocytes, was isolated by affinity chromatography on matrix Sephadex G-50 followed by chitin, and molecular exclusion in HPLC system. The purity and the molecular weight of the lectin were determined by SDS-PAGE. The protein was characterized as to the nature glycoprotein, the specific sugars and glycoproteins, resistance to pH, temperature, denaturing agents, reducing, oxidizing and chelating agents. The lectin on SDS-PAGE showed two bands of 25 and 45 kDa and a content of 47 µg of carbohydrates. It was specific for mannose, fructose and maltose. It was inactivated when heated to 90 °C and 100 °C for 10 minutes and at pH 5,0 and 13,0. It had reduced their activity in the presence of urea 4 and 8 M and sodium metaperiodate, and increased with β-mercaptoethanol. It's a metalloprotein which depend of Mg^{2+} for stabilizing its carbohydrate binding site. It didn't present activity against *Bacillus subtilis* ATCC 0516, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 8027, *P. aeruginosa* ATCC 25619, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *S. aureus* ATCC 25925 and in the carrageenan-induced peritonitis model in mice, the lectin didn't have toxicity to animals and showed anti-inflammatory effect reducing the blood vessel permeability and migration of neutrophils in the peritoneum of mice.

Keywords: Plant lectins. Leguminosae. *Canavalia brasiliensis*.

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC	American Type Culture Collection
°C	Graus Célcus
µL	Microlitro
BSA	Soro albumina sérica
ConA	Concanavalina A
CIM	Concentração inibitória mínima
ConBr	Lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i>
CRD	Domínio reconhecedor de carboidrato
e.v.	Via endovenosa
HLO	Lectina da esponja <i>Halichondria okadai</i>
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Pressão
i.p.	Via intraperitoneal
kDa	Kilodáton
M	Concentração de solução expressa em molaridade (molar)
m/v	Relação massa/volume
MAC	Concentração aglutinante mínima
mgP/gF	Miligrama de proteína por grama de farinha
Mm	Concentração de solução expressa em milimolar
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PHA	Fitohemaglutinina de <i>Phaseolus vulgaris</i>
PP1	Proteína principal do floema
RIP	Proteína inativadora de ribossomos
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TEMED	N – N' – N'' – N''' - tetrametiletilnodiamina
TRIS	Hidroximetil – aminometano
UDA	Aglutinina de <i>Urtica dioica</i>
UH/mL	Unidades de hemaglutinação por mililitro
v/v	Relação volume/volume
WGH	Aglutinina de germe de trigo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	<i>C. brasiliensis</i> Mart. ex Benth mostrando as estruturas principais.....	30
Figura 2	Distribuição geográfica de <i>C. brasiliensis</i> no Brasil.....	30
Figura 3	Fluxograma representativo das análises realizadas no extrato de <i>C. brasiliensis</i>	33
Figura 4	Fluxograma representativo das análises realizadas com as lectinas do extrato de sementes de <i>C. brasiliensis</i>	34
Figura 5	Perfil Cromatográfico das colunas de afinidade em matriz de sephadex G-50 e quitina; e eletroforese SDS-PAGE.....	44
Figura 6	Padrão cromatográfico da coluna de exclusão molecular.....	45
Figura 7	Efeito da temperatura sobre a atividade específica das lectinas de sementes de <i>C. brasiliensis</i> (ConBr e ConBr II).....	47
Figura 8	Efeito do pH sobre a atividade específica das lectinas de sementes de <i>C. brasiliensis</i> (ConBr e ConBr II).....	48
Figura 9	Efeito do EDTA e de cátions divalentes sobre ConBr II.....	52
Figura 10	Influência de ConBr II na permeabilidade vascular em camundongos.....	55
Figura 11	Influência de ConBr II na migração de neutrófilos	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Resumo dos primeiros estudos envolvendo lectinas.....	16
Tabela 2	Resistência das lectinas frente ao β -mercaptoetanol.....	50
Tabela 3	Efeito do EDTA e de cátions divalentes sobre ConBr II.....	52
Tabela 4	Efeito de ConBr II sobre o peso corporal e o peso úmido dos órgãos de camundongos.....	54
Tabela 5	Avaliação da função renal e hepática em camundongos através de parâmetros bioquímicos após o tratamento com ConBr II.....	54
Tabela 6	Leucograma dos camundongos após tratamento com ConBr II.....	55

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 CONCEITO DE LECTINAS.....	14
1.2 HISTÓRICO DO ESTUDO DAS LECTINAS.....	14
1.3 PROPRIEDADES GERAIS DAS LECTINAS.....	18
1.4 LECTINAS VEGETAIS.....	19
1.4.1 Biossíntese e Funções.....	19
1.4.2 Classificação das Lectinas Vegetais.....	21
1.5 APLICAÇÕES DAS LECTINAS.....	23
1.5.1 Atividade Antibacteriana.....	23
1.5.2 Atividade Anti-inflamatória.....	24
1.5.3 Outras Aplicações das Lectinas.....	24
1.6 A FAMÍLIA LEGUMINOSAE.....	25
1.7 LECTINAS DE LEGUMINOSAS.....	27
1.8 <i>Canavalia brasiliensis</i>	29
2 OBJETIVOS.....	32
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	32
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1 PREPARO DO MATERIAL VEGETAL.....	33
3.2 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS SOLÚVEIS DA AMOSTRA.....	33
3.3 COLETA DE SANGUE.....	34
3.4 PREPARO DE ERITRÓCITOS.....	34
3.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE.....	35
3.6 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNAS SOLÚVEIS.....	35
3.7 ESPECIFICIDADE POR AÇÚCARES E GLICOPROTEÍNAS.....	35
3.8 ISOLAMENTO DA PROTEÍNA.....	36
3.9 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA E SDS.....	36
3.10 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA.....	37
3.10.1 Presença de Carboidratos.....	37
3.10.2. Teste de Termoestabilidade.....	37

3.10.3. Efeito do pH.....	38
3.10.4. Efeito dos Agentes Desnaturantes.....	38
3.10.5. Efeito dos Agentes Redutores.....	38
3.10.6. Efeito dos Agentes Oxidantes.....	38
3.10.7. Efeito dos Agentes Quelantes e Cátions Divalentes.....	39
3.11. ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	39
3.11.1 Atividade Antibacteriana.....	39
3.11.2 Atividade Anti-inflamatória.....	40
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
4.1 ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE E TEOR DE PROTEÍNAS SOLÚVEIS DO EXTRATO DE SEMENTES DE <i>Canavalia brasiliensis</i>.....	43
4.2 ISOLAMENTO DA LECTINA DE SEMENTES DE <i>C. brasiliensis</i>.....	43
4.3 ESPECIFICIDADE A AÇÚCARES E GLICOPROTEÍNAS.....	45
4.4 NATUREZA GLICOPROTEICA.....	45
4.5 EFEITO DA TEMPERATURA.....	46
4.6 EFEITO DO pH.....	47
4.7 EFEITO DOS AGENTES DESNATURANTES.....	48
4.8 EFEITO DOS AGENTES REDUTORES.....	49
4.9 EFEITO DOS AGENTES OXIDANTES.....	50
4.10 EFEITO DOS AGENTES QUELANTE E CÁTIONES DIVALENTES.....	51
4.11 ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	53
4.11.1 Atividade Antibacteriana.....	53
4.11.2 Atividade Antiinflamatória.....	53
5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	58
REFERÊNCIAS	
ANEXOS	

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONCEITO DE LECTINAS

Comumente, os organismos vivos contêm proteínas de ligação a carboidratos as quais são comumente chamadas de lectinas ou aglutininas (PEUMANS et al., 1995) e essa afinidade por carboidratos permite que essas proteínas se liguem a glicoconjugados na superfície das células promovendo a aglutinação das mesmas.

A definição mais aceita de lectinas é que elas são proteínas ou glicoproteínas de origem não imune (vegetais) que têm no mínimo um sítio de ligação não catalítico, chamado domínio lectina, que reconhece de forma reversível e específica a mono- e oligossacarídeos (BEUTH et al.; PEUMANS et al., 1995; VASCONCELOS et al., 2009) sem alterar a estrutura covalente de quaisquer de seus ligantes (GOLDSTEIN et al., 1980; KOKOUREK & HOREJSE, 1983; LIENER et al., 1986; MOREIRA et al.; 1991).

As interações entre o domínio lectina com seus ligantes glicanos são semelhantes às interações estabelecidas entre os anticorpos e seus antígenos. Sua habilidade de reconhecer e se ligar reversivelmente a carboidratos específicos sem qualquer modificação química destes distingue as lectinas de outras proteínas de ligação a carboidratos e enzimas (DHUNA et al., 2005). Apesar de terem sido descobertas através da observação de aglutinação de hemácias, as lectinas podem aglutinar também outros tipos de células tais como linfócitos, espermatozoides, plaquetas e bactérias (DÍAZ et al., 1999).

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., 1995) 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; LIS, 2004).

1.2 HISTÓRICO DO ESTUDO DAS LECTINAS

A presença de lectinas em um extrato proteico geralmente é identificada através da aglutinação de eritrócitos e o primeiro relato dessa atividade promovida por elas data de 1860, por S. Weir Mitchell, , constatou que o veneno de cascavel aglutinava eritrócitos de pombo (KILPATRICK; GREEN, 1992 apud SHARON; LIS, 2007). Vinte e oito anos depois, Peter

Hermann Stillmark obteve a primeira aglutinação de células por extratos vegetais. Ele observou que extratos tóxicos de *Ricinus communis* (mamona) aglutinavam hemácias de animais de espécies diferentes (SELL et al., 2000) hipotetizando a presença de uma proteína no extrato a qual nomeou de ricina.

Pouco tempo depois, H. Hellin relatou que a abrina - uma proteína das sementes de *Abrus precatorius* (jequiriti) - exercia efeitos hemaglutinantes similares aos da ricina. Depois, numerosas substâncias aglutinantes tóxicas e não tóxicas foram sendo descobertas em outras plantas (CAJAZEIRAS, 2009) e também em outros tipos de organismos. Essa última identificação fez com que se descartasse a ideia de que essas proteínas fossem exclusivas de vegetais. A partir desses primeiros registros, as substâncias responsáveis pela aglutinação das hemácias - ricina, abrina e outras, receberam a designação geral de hemaglutininas ou fitoaglutininas – pelo fato de aglutinar hemácia e/ou estarem sendo identificadas quase que exclusivamente em vegetais, marcando o início de uma nova disciplina: a Lectinologia.

Karl Landsteiner e H. Raubitishek identificaram diferenças nas atividades hemaglutinantes em vários extratos de sementes, frente a hemácias de diversas espécies, evidenciando a seletividade das aglutininas vegetais (SELL et al., 2000). Nesses estudos, eles utilizaram extratos de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris*), ervilha (*Pisum sativum*) e lentilha (*Lens culinaris*). Inclusive, os trabalhos com as lectinas de ervilha e lentilha mudaram o pensamento de que a toxicidade era propriedade geral dessas substâncias.

Em 1919, James B. Summer, da Universidade de Cornell (Ithaca, Nova York), conhecido por ser o primeiro a cristalizar uma enzima, a urease, pela qual ele foi agraciado com o prêmio Nobel vinte e um anos depois, isolou do feijão *Canavalia ensiformis* uma proteína cristalina que ele chamou de concanavalina A (Con A). Deste modo, foi obtida uma hemaglutinina pura pela primeira vez. No entanto, quase duas décadas se passaram antes de Summer e S. F. Howell relatarem que a Con A aglutina células como eritrócitos e leveduras e que também precipita glicogênio em solução. Eles ainda mostraram que a hemaglutinação pela Con A foi inibida por sacarose, demonstrando pela primeira vez a especificidade das fitoaglutininas por açúcares. Summer e Howell também sugeriram que a hemaglutinação promovida pela Con A poderia ser consequência de uma reação entre a proteína vegetal e carboidratos na superfície de células vermelhas (SHARON; LIS, 2004).

No fim dos anos 40, William C. Boyd e Rose M. Reguera observaram que certas sementes continham aglutininas específicas para antígenos dos grupos sanguíneos humanos (DÍAZ et al., 1999). Essa especificidade também fora descrita por Karl O. Renkonen (1948) e Walter J. T. Morgan e Winifred M. Watkins (1952 e 1953); e em 1954, Boyd e Elizabeth

Shapleih sugeriram que essas fitoaglutininas fossem denominadas de lectinas, do latim *legere*, que significa escolher, selecionar, para destacar a habilidade de algumas destas em diferenciar células sanguíneas do sistema ABO quando testadas contra esses: eles descobriram que extratos brutos de *Phaseolus limensis* e *Vicia cracca* aglutinavam eritrócitos de sangue do tipo A, mas não células de sangue do tipo B ou O (SHARON; LIS, 2004). Em 1972 o termo lectina foi generalizado para todas as proteínas que possuísem a capacidade de aglutinar células ou precipitar polissacarídeos e glicoproteínas (KASSAB, 1999 e SHARON, 1972).

A tabela 1 identifica alguns dos principais estudos feitos com lectinas, desde a sua descoberta até os dias atuais.

Tabela 1 - Resumo dos primeiros estudos envolvendo lectinas (Adaptado de LIS & SHARON, 2007).
(continua)

Ano	Estudo
1860	Primeiro relato da aglutinação de sangue pelo veneno de cascavel por S. Weir Mitchell.
1888	Stillmark observa que a ricina aglutina hemácias: início da Lectinologia;
1898	Elfstrand propõe o termo aglutinina para as proteínas que aglutinam células.
1891	H. Hellin observa que a abrina tem efeitos hemaglutinantes similares aos da ricina;
1902	Simon Flexner e H. Noguchi confirmam as observações de Mitchell e descrevem aglutininas no veneno de cobra.
1908	Karl Landsteiner e H. Raubitishek identificam diferenças nas atividades hemaglutinantes de vários extratos de sementes com relação a hemácias de diferentes espécies de seres vivos;
1902	Descrição de atividade hemaglutinante por cultura de bactérias.
1919	James B. Summer isola da <i>Canavalia ensiformis</i> a proteína concanavalina A (ConA);
1936	Summer e S. F. Howell relatam que a ConA aglutina eritrócitos e leveduras e que também precipita glicogênio em solução; É demonstrada pela primeira vez a especificidade das fitoaglutininas por açúcares: Con A é inibida por sacarose;
1941	George K. Hirst e Ronald Hare, independentemente, observam que o vírus influenza aglutina eritrócitos.

Tabela 1 - Resumo dos primeiros estudos envolvendo lectinas (Adaptado de LIS & SHARON, 2007).
(continuação)

Ano	Estudo
1950?	Alfred Gottschalk e Elisa Hall demonstram que uma lectina no vírus influenza está envolvida no processo de reconhecimento durante a infecção e aglutinação dos eritrócitos.
1952	Walter J. T. Morgan e Winifred M. Watkins descobrem que N-acetil-D-galactosamina e L-fucose são os açúcares que conferem especificidades
1953	aos tipos sanguíneos A e O através de estudos de inibição com lectinas da fava e de <i>Lotus tetragonolobus</i> .
1954	William C. Boyd e Rose M. Reguera observam que algumas sementes contêm aglutininas específicas para os antígenos dos grupos sanguíneos humanos.
1954	William C. Boyd e Elizabeth Shapleih sugerem que as fitoaglutininas sejam chamadas de lectinas.
1960	Peter C. Nowell demonstra a atividade mitogênica da lectina de <i>Phaseolus vulgaris</i> (PHA) sobre linfócitos. Mitchel isola primeira lectina animal do veneno de <i>Crotalus durissus</i> .
1963	Joseph C. Aub e colaboradores demonstram a capacidade das lectinas em aglutinar células neoplásicas utilizando a lectina do gérmen do trigo (WGH).
1965	Bipin B. L. Agraw e Irwin J. Goldstein descrevem um método de purificação de aglutininas com base na especificidade de ligação aos carboidratos: cromatografia de afinidade;
1968	Doods, MacLennan e Hawkin descrevem pela primeira vez lectinas em esponjas marinhas.
1972	O termo lectina é generalizado para todas as proteínas que possuem a capacidade de aglutinar células ou precipitar polissacarídeos e glicoproteínas.
1972	Edelman e, independentemente, Karl Hardman com Clinton F. Ainsworth resolvem a estrutura 3D da Con A.
1974	A primeira lectina de mamífero (da enguia elétrica) é isolada por Gilbert Ashwell e Anatol G. Morell.

Tabela 1 - Resumo dos primeiros estudos envolvendo lectinas (Adaptado de LIS & SHARON, 2007).
(conclusão)

<i>Ano</i>	<i>Estudo</i>
1984	Paroutaud et al. determinam a sequência de aminoácidos da lectina do amendoim revelando homologia entre suas sequências aminoterminais com a lectina da fava e a da soja.
1986	Chapot et al. identificam homologia nas sequências de aminoácidos de lectinas de plantas de diferentes famílias.
1988	Assim como em plantas relacionadas taxonomicamente, similaridades entre lectinas de animais tais como galectinas e Tipo-C também são identificadas.
1994	Parijs et al descrevem a atividade antifúngica da heveína, lectina extraída do látex de <i>Hevea brasiliensis</i> .
2004	É demonstrada atividade antiviral das lectinas de <i>Galanthus nivalis</i> e <i>Hippeastrum hybrid</i> contra as linhagens HIV-1 e HIV-2.
2005	A lectina de <i>Arisaema tortuosum</i> Schott é descrita como tendo atividade contra algumas linhagens de células humanas cancerosas por Dhuna et al.
2010	Swanson et al demonstram a atividade anti-HIV da lectina isolada da banana – BanLec.

1.3 PROPRIEDADES GERAIS DAS LECTINAS

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., 2010). A maioria das lectinas são estáveis à variação de pH e resistentes a uma grande variedade de enzimas proteolíticas (LEITE, 2010; PEUMANS; VAN DAMME, 1995).

As lectinas são proteínas de origens e estruturas distintas sendo que algumas são metaloproteínas por necessitarem a presença de cátions metálicos localizados em sítios de ligação específicos - diferentes dos sítios para carboidratos, onde a presença de íons é necessária para o encaixe do carboidrato no CDR – domínio de reconhecimento a carboidratos (PEDROSO, 2006).

Essas proteínas também possuem uma ampla capacidade de agir como reconhecedores de moléculas dentro de células, na superfície celular e em fluidos fisiológicos - servem como meio de fixação de diferentes tipos de células e vírus por meio do reconhecimento dos carboidratos de superfície, permitindo o estabelecimento de relações como parasitismo, mutualismo e até mesmo predatismo: a bactéria *Escherichia coli* é capaz de aderir a células do trato gastrointestinal de animais porque lectinas presentes nas suas fímbrias reconhecem unidades oligossacarídicas nas superfícies dessas células (BERG et al., 2004);

Em alguns casos, lectinas da superfície das células se ligam particularmente a glicoproteínas, enquanto que, em outros casos, o carboidrato de glicoproteínas da superfície celular ou de glicolípídios é utilizado como sítio de ligação de lectinas (CAJAZEIRAS, 2009). Essas lectinas de superfície ainda podem desempenhar um papel no tráfego extracelular de glicoproteínas e adesão celular e lectinas extracelulares podem estar envolvidas na organização da matriz extracelular e funcionar como sinais para o crescimento e desenvolvimento celular (VAN DAMME et al., 2004).

1.4 LECTINAS VEGETAIS

1.4.1 Biossíntese e funções

Durante as duas últimas décadas, lectinas expressas abundante e constitutivamente veem 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 (RAMOS et al., 1996).

Nas plantas, a maioria dessas moléculas encontra-se nos cotilédones e endospermas das sementes e podem constituir de 2 a 10% do total de proteínas (DÍAZ et al., 1999). À medida que a semente vai germinando, proteínas de reserva e lectinas vão sendo metabolizadas para fornecer aminoácidos e assim, a planta poder se desenvolver (CHRISPEELS et al., 1991).

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, 2007; ETZLE et al., 1984).

Além das sementes, lectinas também podem ser isoladas em menores proporções de cascas, folhas, grãos de pólen, raízes, (KUKU et al., 2007) frutos, flores (RATAPANO et al., 2001; SANTOS, 2007), 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., 1998).

O papel fisiológico das lectinas vegetais ainda é bem discutido entre os pesquisadores (FONTENELE, 2008). Apesar de contribuírem como reservatório de aminoácidos durante o desenvolvimento das mudas acredita-se que elas também tenham um papel na defesa de plantas. Um argumento para isso é a verificação de que essas lectinas se ligam a glicoconjugados de outros organismos (PEUMANS; VAN DAMME, 1995). Estudos com lectinas purificadas e experimentos com plantas transgênicas indicaram que algumas lectinas aumentam a resistência da planta contra animais herbívoros ou fitopatógenos (KUKU et al., 2009; VAN LEUVEN et al., 1993).

De acordo com RAVEN et al. (2006), é possível também que lectinas secretadas por células de raízes das leguminosas interajam com as bactérias fixadoras de nitrogênio, facilitando sua ligação às paredes celulares dos pelos radiculares.

Nas curcubitáceas e no *Amaranthus hypochondriacus*, os estudos têm demonstrado que quando o floema é danificado, lectinas se associam à proteína principal do floema (PP1) formando agregados que protegem a região lesionada e ainda fornece proteção contra a invasão de fungos (VAN DAMME et al., 2004).

Lectinas extraídas de plantas em geral também podem funcionar como mitógenos (KUKU et al., 2009) e apresentar outras propriedades tais como citotóxica (DRESH et al. 2004; PAJIC et al., 2002), hemolítica, antibacteriana e demonstram um grande número de aplicações biológicas, tecnológicas e inclusive terapêuticas (DRESH et al., 2004).

1.4.2 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.

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 se ligam ao mesmo carboidratos 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 lectina

(PAIVA et al., 2010) 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;

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

1.5 APLICAÇÕES DAS LECTINAS

1.5.1 Atividade antibacteriana

Microrganismos de importância médica só começaram a ser efetivamente estudados a partir de 1978, graças a trabalhos de Pasteur, Robert Koch e de seus contemporâneos (BATISTA, 2008). No entanto, com novas tecnologias apresentadas associadas à problemática da resistência antimicrobiana a medicamentos, a necessidade de novos compostos alavancou as pesquisas na busca de substâncias que apresentem eficácia superior ou igual aos medicamentos utilizados na terapêutica habitual com efeitos colaterais reduzidos (BATISTA, 2008; OESTERHELT, 2005).

Os vegetais apresentam-se como uma fonte promissora de compostos com propriedades terapêuticas e entre estes podemos destacar as lectinas de *Griffonia simplicifolia*, *Canavalia ensiformis* e *Lens culinaris* que aglutinam a bactéria *Pseudomonas syringae*. Lectinas de *Dolichos biflorus* reagem especificamente com estreptococos do grupo C. Essas lectinas provavelmente afetam essas bactérias pela interação com resíduos de N-acetil-D-galactosamina presentes em suas estruturas externas (OLIVEIRA et al., 2007). Os estudos mostram que a lectina extraída de sementes de *Labramia bojeri* inibiu a formação de biofilmes por estreptococos cariogênicos – formadores da cárie dentária (OLIVEIRA et al., 2005).

Essas proteínas também podem apresentar atividade antibacteriana através do bloqueio dos movimentos normais da bactéria (DAMICO, 2002). Estudos de Liao et al. (2003), com algas vermelhas, demonstraram que suas lectinas podem inibir o crescimento de bactérias como *Vibrio vulnificus*, habitante de ambientes marinhos e que pode causar gastroenterite após o consumo de frutos do mar crus; Schröder et al. (2003) demonstraram que uma lectina purificada da esponja *Suberites domuncula* (Desmospongiae) apresentou atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e *E. coli*; e a HOL-30 (lectina da esponja *Halichondria okadai*) mostrou inibição significativa contra o crescimento micelial de *Botryodiplodia theobromae*, um fitopatógeno (KAWSAR et al., 2010).

1.5.2 Atividade antiinflamatória

A inflamação é um fenômeno biológico que consiste em uma sequência de eventos gerados por uma resposta das células aos variados estímulos externos como infecção por microrganismos, agentes físicos ou químicos, tecido necrótico ou reações imunológicas, apresentando na verdade, um papel protetor.

A reação inflamatória é didaticamente separada em aguda ou crônica dependendo da duração e das características. A primeira tem curta duração - horas a dias, apresentando inicialmente a vasodilatação, o extravasamento de líquido proteico, formação do edema, migração de células para o sítio agredido podendo em alguns casos ocorrer a ativação da cascata de coagulação. A segunda apresenta duração maior - semana a meses, ocorre a presença de macrófagos e linfócitos, proliferação celular, fibrose e necrose tecidual, onde destruição tecidual e tentativa de reparação ocorrem simultaneamente, muitas vezes, de forma assintomática (BEZERRA, 2012).

O processo normalmente leva à recuperação e à cura sempre que o estímulo nocivo que desencadeou o processo é suprimido (FIGUEIREDO et al., 2009), porém a reparação do tecido agredido ocorrerá em maior ou menor magnitude, dependendo do dano causado pelo fator agressor, poderá ser nociva ao organismo sendo necessário o uso de substâncias anti-inflamatórias, que controlem esses eventos e assim, a busca daquelas provenientes de fontes naturais (BORGES, 2010).

Já ficou evidenciado que as lectinas podem apresentar atividade anti-inflamatória como, por exemplo, a de *Clitoria fairchildiana* R. Howard (LEITE et al., 2012) e algumas da subtribo Diocleinae tais como a lectina de *Dioclea grandiflora*, que diminuiu a migração de neutrófilos em ratos durante o processo inflamatório induzido (NUNES et al., 2009)

1.5.3 Outras aplicações das lectinas

Durante muitos anos, as lectinas foram usadas para investigar a composição de açúcares de glicanos e glicoconjugados de lipopolissacarídeos bacterianos (KAWSAR et al., 2010) e até mesmo na identificação de grupos sanguíneos. As lectinas de *Lotus tetragonolobus* e *Ulex europaeus*, ambas específicas para fucose, são empregadas para identificar eritrócitos do tipo O; a lectina de *Dolichos biflorus* é usada para distinguir subgrupos A1 e A2. (TRINDADE, 2005)

Dubois et al. (1998) demonstraram que a ConA induz a produção da MMP-9 por linfócitos *in vitro*; essa protease, em associação com a MMP-2, é fundamental para o processo de cicatrização (SILVA et al., 2009).

Joseph C. Aub e seus colaboradores descreveram que as lectinas de plantas podem distinguir células normais de células malignas. Diferentes estudos *in vivo* e *in vitro* com lectinas de plantas demonstram que elas possuem atividade antitumoral exercendo efeito inibitório no crescimento do tumor e atividade anticarcinogênica - efeito inibitório na indução do câncer por carcinógenos (VILLANUEVA; ABDULLAEV, 2005).

Em análises de Parijs e colaboradores (1990), a heveína, lectina de *Hevea brasiliensis*, apresentou atividade antifúngica contra *Botrytis cinerea*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*, *Phycomyces blakesleeana*, *Pyrenophora tritici-repentis*, *Pyricularia oryzae*, *Septoria nodorum* e *Trichoderma hamatum*, chegando a ser para alguns fungos um inibidor mais potente do que as quitinases.

As hemaglutininas são ferramentas confiáveis usadas como biomarcadores para alterações patobioquímicas do epitélio gástrico durante a infecção por *Helicobacter pylori* bem como durante o mapeamento do glicocálice de *H. pylori* durante os estágios da infecção (MELO-JÚNIO et al., 2008).

Entre as lectinas mais estudadas de plantas, estão principalmente as da família Leguminosae. Lectinas dessa família representam um grupo de proteínas similares estruturalmente, porém com diferenças na especificidade a carboidratos (SILVA et al., 2009).

1.6 A FAMÍLIA LEGUMINOSAE

Leguminosae consiste em uma das maiores famílias de angiospermas e apresenta ampla distribuição biogeográfica. A família está dividida em três subfamílias e 36 tribos e atualmente são atribuídos a ela 727 gêneros e cerca de 19.325 espécies (LEWIS et al., 2005 e MIOTTO et al., 2008), sendo que no Brasil ocorrem cerca de 200 gêneros e 1500 espécies (RODRIGUES; MACHADO, 2006; SOUZA; LORENZI, 2005).

Muitas leguminosas úteis e diversas são cultivadas desde a antiguidade como alimentícias (lentilha, ervilha, feijão), forrageiras (alfafa, trevos, ervilhacas), oleaginosas (soja, amendoim), adubo verde (tremoços), tintóreas (índigo, pau-brasil), tânicas (acácia-negra), fornecedoras de celulose (bracatinga), melíferas (alfafa, trevos-de-cheiro), medicinais (pata-de-vaca, erva-de-touro), florestais (canafístula, angico), ornamentais (guapuruvú, corticeiras), etc. Ainda, algumas são tóxicas para o homem ou para o gado, pela presença de

princípios nocivos (tremoços, timbó) e outras são prejudiciais por seus acúleos (maricá, unha-de-gato);

A família é bem conhecida por constituir o maior grupo de plantas que estabelece associação com bactérias simbióticas, rizóbios - gênero *Rizobium* (PEUMANS & VAN DAMME, 1995) e *Bradyrhizobium* (BARBERI et al., 1998) que fixam o nitrogênio atmosférico, um processo essencial para todos os seres vivos.

A subfamília *Caesalpinioideae* apresenta aproximadamente 170 gêneros e 3000 espécies. Em *Mimosoideae* ocorrem aproximadamente 77 gêneros e 3000 espécies; e em *Papilionoideae*, cerca de 478 gêneros e de 13805 espécies, sendo assim, a maior das três subfamílias.

Na subfamília *Papilionoideae* existem plantas do tipo ervas, subarbustos, arbustos, árvores, trepadeiras e lianas. Essa subfamília é dividida em 28 tribos.

A tribo *Phaseoleae*, apresentando o maior número de exemplares e maior importância econômica para o homem, é dividida em oito subtribos - *Cajaninae*, *Phaseolinae*, *Clitoriae*, *Ophrestiinae*, *Kennediinae*, *Erythrinae*, *Diocleinae* e *Glycininae*. A subtribo *Diocleinae* abrange treze gêneros: *Canavalia*, *Cleobulia*, *Pachyrhizus*, *Collea*, *Camptosema*, *Dioclea*, *Cratylia*, *Galactia*, *Cymbosema*, *Herpiza*, *Calopogonium*, *Macropsicanthus* e *Luzonia*. Essa subtribo é amplamente distribuída pelas zonas neotropicais. (MELGAREJO et al., 2005)

O gênero *Canavalia* foi dividido em quatro subgêneros: *Catadonia*, *Wenderothia*, *Canavalia* e *Maunaloa* (LACKEY, 1977; LACKEY, 1981; MOREIRA, et al., 1995; SAUER, 1964) e tem aproximadamente 60 espécies pantropicais (MAXWELL, 1998 citado por MATOS et al., 2004) com concentração neotropical, já que cerca de 37 espécies se distribuem em área neotropical e cerca de 15 espécies em área paleotropical, principalmente na área oriental do Oceano Índico e porção ocidental do Oceano Pacífico (MATOS et al., 2004).

Há pelo menos quatro espécies que foram cultivadas para forragem e alimento. *Canavalia ensiformis*, por exemplo, foi cultivada na América como alimento na etapa pré-colombiana (AYMARD; CUELLO, 1991; MATOS et al., 2004).

Algumas das espécies de *Canavalia* estão incluídas entre as poucas que possuem sementes que contêm toxinas tais como alcaloides e aminoácidos não proteicos. Nenhum desses cultivos é de importância econômica fundamental. Os mesmos servem apenas como forragem, adubação verde e só em casos de extrema pobreza que são usados na alimentação humana (MATOS et al., 2004).

1.7 LECTINAS DE LEGUMINOSAS

Há muito tempo, sementes de plantas da família Leguminosae são conhecidas por ser 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 e dentre as funções das lectinas destaca-se a toxicidade destas proteínas contra várias espécies de fungos fitopatogênicos e insetos (CHEVREUIL et al., 2007).

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, 2010).

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., 1993; 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; SANZ-APARICIO et al., 1997).

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 Ca^{++} e 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 elicitam diferentes atividades biológicas, ou ainda para uma dada atividade, diferentes perfis de resposta (CAVADA et al., 1993; 2001; FONTENELE, 2008). 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.

As lectinas de leguminosas podem assumir duas conformações quanto à presença dos íons cálcio e manganês. Na presença destes assumem a conformação ‘locked’ e na ausência ‘unlocked’. Portanto, a conformação mais favorável do sítio de ligação a carboidratos das lectinas de leguminosas ocorre exclusivamente pela presença dos íons (BOUCKAERT et al., 1999; VACARI, 2010).

As lectinas pertencentes a esta classe podem ser glicosiladas, apresentando uma ou duas cadeias de açúcares covalentemente ligados à cadeia lectínica (BATISTA, 2007; VAN DAMME et al., 2008) e são constituídas principalmente por folhas β .

O sítio de ligação a carboidratos das lectinas de leguminosas apresenta uma região na superfície da molécula composta por quatro loops que formam uma cavidade na sua superfície. Nestes loops encontram-se os resíduos de Asp, Asn e Gly/Arg que se ligam através de quatro ligações de hidrogênio às hidroxilas dos carbonos três e quatro presentes em monossacarídeos como manose ou glicose. Além dessas ligações ocorrem também interações hidrofóbicas com os resíduos de aminoácidos como Phe, Tyr, Trp ou Leu auxiliando a estabilidade com o monossacarídeo. As variações evolutivas observadas nas lectinas de leguminosas ocorrem especificamente no sítio de ligação a carboidratos e na maneira como essas proteínas formam oligômeros. Se existirem variações no sítio primário de ligação haverá provavelmente alteração na especificidade da lectinas pelo seu respectivo monossacarídeo.

Caso essas variações sejam observadas na forma de oligomerização haverá mudanças na forma como essas proteínas interagem com oligossacarídeos complexos presentes em membranas celulares. Ou seja, lectinas contendo a mesma especificidade por monossacarídeos podem desempenhar atividades biológicas distintas e vice-versa (MORENO, 2008).

Essas lectinas são similares entre si quando comparadas em relação às suas estruturas primárias e terciárias, porém diferem admiravelmente quanto à estrutura quaternária (BRINDA et al., 2005; MORENO, 2008). Essas moléculas raramente ocorrem na forma monomérica, sendo mais comum encontrá-las nas formas dimérica e tetramérica, onde os tetrâmeros são formados a partir de arranjos espaciais entre dímeros. Cada interação dimérica distinta gera uma forma tetramérica específica (MORENO, 2008).

A conservação dessas proteínas durante a evolução das espécies de leguminosas é uma evidência de que elas provavelmente desempenham um papel similar nessas plantas e que esse papel pode conferir algumas vantagens desconhecidas a essas espécies. A toxicidade de muitas lectinas de leguminosas sobre predadores importantes de plantas tais como insetos e mamíferos, juntamente com a sua abundância nas sementes, sugerem um papel protetor para essas proteínas (CAVADA et al., 1993; 1996; CHRISPEELS; RAIKHEL, 1991). Por exemplo, estudos com plantas de tabaco transgênicas, expressando o gene da lectina de ervilha, demonstraram que ela exibiu aumento da resistência ao verme do tabaco *Heliothis virescens*.

Em tecidos periféricos os efeitos biológicos da ConBr incluem a estimulação da produção de NO (óxido nítrico) por macrófagos (ANDRADE et al., 1999; RUSSI, 2010), ativação ou produção de apoptose em linfócitos (BARBOSA et al., 2001; RUSSI, 2010) e estimulação da liberação de histamina em mastócitos (LOPES et al., 2005).

Lectinas dos gêneros *Canavalia*, *Cratylia* e *Dioclea* são as mais estudadas. Diversas espécies de *Dioclea* mostraram possuir uma lectina intimamente relacionada com ConA. (MELGAREJO et al., 2005) e apresentam cerca 78% de homologia no que diz respeito a sua estrutura primária comparada com a ConA (OLIVEIRA et al., 1990).

As lectinas melhor caracterizadas são aquelas de sementes de *Dioclea grandiflora* (MOREIRA et al., 1986; RICHARDSON et al., 1984), *Dioclea lehmanni* Diels (PEREZ et al., 1990; 1991), *Dioclea sericea* Kunth (SIERRA; PÉREZ, 1999), *Dioclea altissima* Rock (MOREIRA et al., 1997). Inclusive, os estudos têm demonstrado que duas lectinas podem estar presentes simultaneamente nas sementes como é o caso dessas três primeiras e as de *C. ensiformis* (MELGAREJO et al., 2005).

Lectinas de sementes de outras espécies têm sido apenas parcialmente caracterizadas (MELGAREJO et al., 2005) e dentre as isoladas da tribo *Diocleinae*, apenas as lectinas de sementes de *C. ensiformis*, *C. brasiliensis*, *Canavalia maritima*, *D. grandiflora*, *Dioclea guianensis* e *Cratylia mollis* têm a estrutura tridimensional resolvida por cristalografia de raios X (CALVETE et al., 1999; DELATORRE et al., 2007). Essas lectinas mostraram respectivamente 98%, 98%, 99%, 84%, 82% e 81% de similaridade com as sequências de aminoácidos quando comparadas com a lectina de *Canavalia gladiata* (DELATORRE et al., 2007).

1.8 *Canavalia brasiliensis*

A espécie *C. brasiliensis* (Figura 1), conhecida no Brasil como feijão bravo – do - Ceará, pertence ao domínio Eukarya (WOESE et al., 1990), reino Plantae (Metaphyta), divisão (filo) Magnoliophyta (angiospermas), classe Magnoliopsida (Eudicotiledôneas), ordem Fabales, família Leguminosae (Fabaceae), subfamília Papilionoideae (Faboideae), tribo *Phaseoleae*, subtribo *Diocleinae* e gênero *Canavalia*.

Ela é uma trepadeira cujos indivíduos podem atingir de 0,5 a 5 metros, dependendo do porte (arbustivo ou arbóreo) da espécie. Suas raízes são amarelas; as folhas alternadas, trifolioladas; as flores apresentam coloração roxa ou branca com pétalas perfumadas e

reunidas em inflorescências do tipo paniculada terminal, com escapo floral de coloração verde-arroxeadada (GUEDES et al., 2009).

Suas sementes geralmente apresentam dimensões de 18 x 12 x 9 mm e coloração verde-oliva, marrom ou marrom-avermelhado, com manchas que variam em cor dependendo da idade (MATOS et al., 2004). A planta cresce bem em solos ácidos e alcalinos, e de baixa fertilidade e nos locais mais pobres do Nordeste brasileiro, a semente é utilizada como alimento em períodos de baixa disponibilidade. (Disponível em <http://www.tropicalforages.info/key/Forages/Media/Html/Canavalia_brasiliensis.htm> Acesso em 30 jun 2012).

Figura 1 - *C. brasiliensis* Mart. ex Benth mostrando as estruturas principais.



Fonte: www.tropicalforages.info.

C. brasiliensis é uma espécie do Continente Americano e no Brasil (Figura 2) é encontrada nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste (Disponível em <<http://flora.jbrj.gov.br/jabot/listaBrasil/ConsultaPublicaUC/BemVindoConsultaPublicaConsultar.do>> Acesso em: 04 de abril de 2013).

Figura 2: Distribuição geográfica de *C. brasiliensis* no Brasil. Em verde, região Norte; em laranja, região Nordeste; em amarelo, região Centro-Oeste; em vermelho, região Sudeste.



Fonte: www.floradobrasil.jbrj.gov.br

A lectina extraída das sementes de *C. brasiliensis*, ConBr, caracteriza-se por se ligar a D-glucose/D-manose (SILVA et al., 2009) e sua atividade biológica tem sido investigada em diversos modelos experimentais (CAVADA et al., 2001; SILVA et al., 2009) tais como ferramenta biotecnológica na estimulação do crescimento do *Rhizobium tropici*, fungo que estabelece relação simbiótica com leguminosas (VASCONCELOS et al., 2012), proliferação de células do sistema imunológico e citocinas em ratos (SILVA et al., 2011), indução de apoptose celular (BARBOSA et al., 2001) e do processo cicatrial através da produção de proteases com atividade colagenolítica (SILVA et al., 2009), entre outras.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAIS

Purificar e caracterizar uma nova lectina ConBr do extrato de sementes de *C. brasiliensis*.

2.2 ESPECÍFICOS

- Realizar *screening* da presença de lectinas através de ensaios de atividade hemaglutinante em extratos de sementes;
- Extrair as proteínas das sementes de *C. brasiliensis* com soluções em diferentes valores de pH e quantificar o seu teor nos extratos utilizando o método de Bradford;
- Determinar a especificidade da lectina por carboidratos por meio de testes de inibição por açúcares simples e glicoproteínas;
- Isolar a lectina utilizando cromatografias de afinidade em matriz de sephadex G-50 e quitina, e exclusão molecular em sistema HPLC;
- Avaliar o grau de pureza e estimar o peso molecular aparente da lectina isolada através de eletroforese em gel de poliacrilamida;
- Caracterizar físico-quimicamente as lectinas ConBr e ConBr II, quanto à sua estabilidade frente à variações de temperatura e de pH, agentes desnaturantes, oxidantes, redutores e quelantes;
- Investigar a atividade antibacteriana da nova lectina em cepas de *Bacillus subtilis* ATCC 0516, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 8027, *P. aeruginosa* ATCC 25619, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *S. aureus* ATCC 25925;
- Estudar a toxicidade e a atividade antiinflamatória da nova lectina em camundongos através do modelo de peritonite induzida por carragenina;

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no laboratório de Bioquímica, Genética e Radiobiologia (BioGeR-Lab), do Departamento de Biologia Molecular (DBM), Centro de Ciências Exatas e Naturais – CCEN, Universidade Federal da Paraíba (UFPB) – Campus I, João Pessoa – PB, e na Universidade de São Paulo (USP).

3.1 PREPARO DO MATERIAL VEGETAL

No presente estudo foram utilizadas sementes da leguminosa *C. brasiliensis*, popularmente conhecido como feijão-bravo-do-Ceará, coletadas no campus I da UFPB, João Pessoa/PB. As sementes de *C. brasiliensis* foram trituradas em moinho elétrico do tipo Willey, obtendo-se uma farinha fina que foi estocada em recipientes hermeticamente vedados e utilizada nas análises posteriores.

3.2 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS SOLÚVEIS DA AMOSTRA

Para a extração das proteínas solúveis da farinha de sementes de *C. brasiliensis*, foram testadas diferentes soluções extratoras na proporção 1:10 (m/v): Tris-HCl 0,1 M a pH 7,4; Glicina 0,1 M pH 2,6 e Glicina 0,1 M pH 9,0, ambos contendo NaCl 0,15 M; e NaCl 0,15 M; submetidos a agitação constante, durante 3 horas, à temperatura de 37°C.

O extrato obtido foi centrifugado a 5.000 x g a 4 °C por 30 minutos e o precipitado, descartado. O sobrenadante, denominado extrato, foi filtrado em papel-filtro e utilizado para análises posteriores (Figuras 3 e 4).

Figura 3 – Fluxograma representativo das análises realizadas no extrato de *C. brasiliensis*.

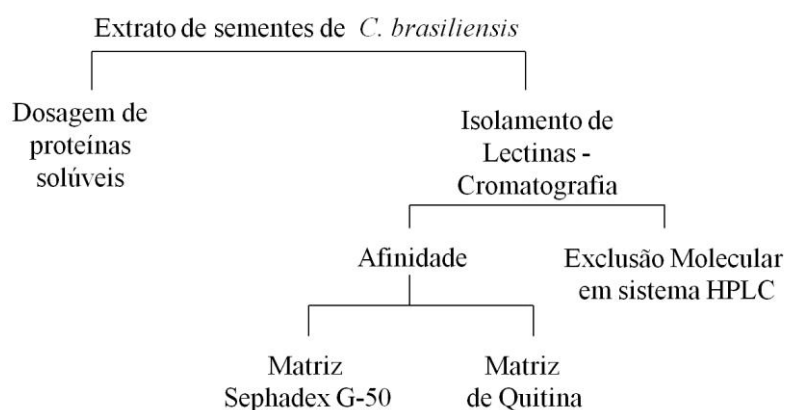
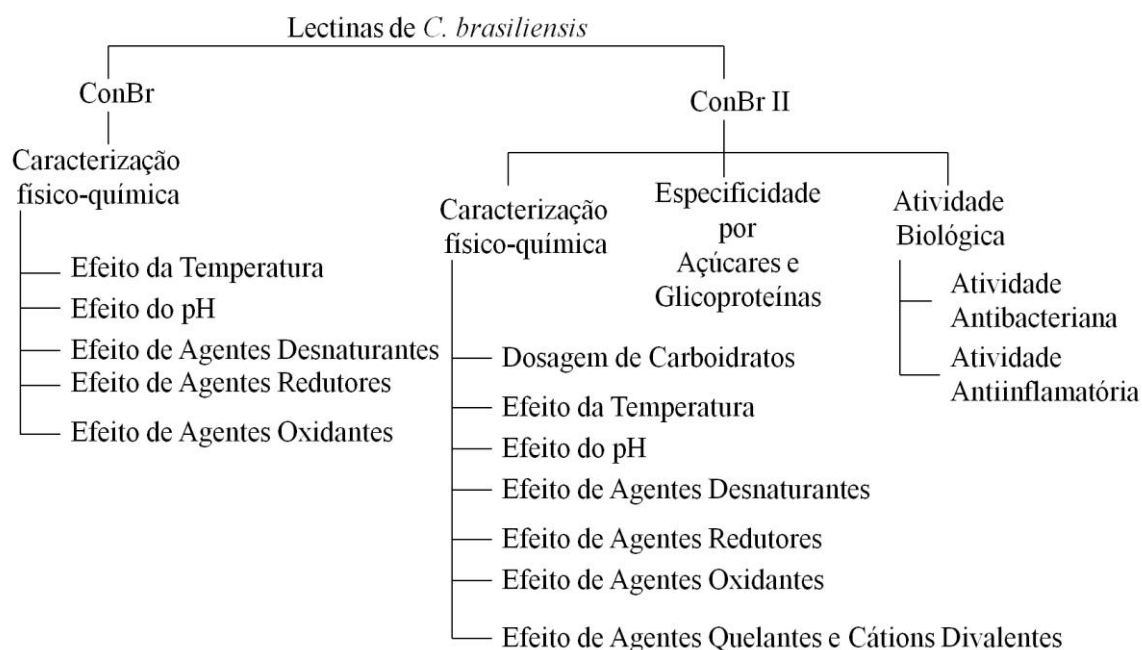


Figura 4 – Fluxograma representativo das análises realizadas com as lectinas do extrato de sementes de *C. brasiliensis*.



3.3 COLETA DE SANGUE

Para a obtenção do sangue utilizado nos ensaios de identificação e caracterização das proteínas foram utilizados coelhos adultos, albinos machos provenientes do Biotério Prof. Thomas George do Centro de Biotecnologia (CBioTec) da UFPB. Os procedimentos foram analisados e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFPB (Certidão/CEPA nº 0309/12).

O sangue foi obtido por secção da veia marginal da orelha dos coelhos, em condições de completa assepsia, seguindo os cuidados e a metodologia descrita por Dunbar (1987).

3.4 PREPARO DE ERITRÓCITOS

Todas as amostras de sangue coletadas dos coelhos sobre solução de EDTA a 8% foram diluídas em 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).

3.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE

A 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 μ L de cada diluição, foi adicionado igual volume de uma suspensão de hemácias nativas de coelho 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 2 que apresentou nítida aglutinação e da atividade específica da lectina obtida pelo cálculo da UH/mgP.

3.6 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNAS SOLÚVEIS

O teor de proteínas solúveis presentes nos extratos da farinha de sementes de *C. brasiliensis* foi determinado segundo o método descrito por Bradford (1976) onde a cada 100 μ L de amostra em diferentes concentrações diluída em diferentes concentrações de NaCl 0,15 M, foram adicionados 2,5 mL de reagente de BRADFORD. Após a homogeneização e repouso por 10 minutos, a leitura foi feita a 595 nm em espectrofotômetro. Como padrão, utilizou-se uma curva de BSA – Soro albumina bovina.

3.7 ESPECIFICIDADE POR AÇÚCARES E GLICOPROTEÍNAS

A especificidade da lectina por açúcares e glicoproteínas foi determinada segundo descrito por Ramos et al., (1999) onde a cada 25 μ L de uma solução de NaCl 0,15 M, foi adicionado igual volume de uma solução de açúcar e desta solução foram realizadas diluições seriadas. Nas diluições do glicano foram adicionados 25 μ L da amostra de proteína e a mistura incubada a 37 °C por 30 minutos. Após esse tempo, foram adicionados 50 μ L de uma suspensão de hemácias a 3%, e a mistura, novamente, incubada a 37 °C por 20 minutos. Os açúcares utilizados foram manose, frutose, maltose, glicose, xilose, sorbose, N-acetilglicosamisa, sacarose e as glicoproteínas carragenina e mucina. A presença de atividade hemaglutinante foi determinada macroscopicamente.

3.8 ISOLAMENTO DA LECTINA

Para o isolamento da lectina foram utilizadas cromatografias de afinidade - matriz Sephadex G-50 e matriz de quitina, e cromatografia de exclusão molecular em sistema HPLC.

O extrato proteico obtido a partir da farinha das sementes de *C. brasiliensis* foi submetido à coluna cromatográfica de afinidade matriz Sephadex G-50 (40 cm x 2 cm). No processo, a coluna foi equilibrada com NaCl 0,15 M contendo CaCl_2 e MnCl_2 a 5 mM, de acordo com Cavada, (1990) e um volume aplicado de 74 mL, deixado em refluxo por 17 horas. Após a eluição do pico não retido com o tampão de equilíbrio da coluna, os picos retidos foram eluídos com glicina 0,1 M - pH 2,6 e glicina 0,1 M - pH 9,0, ambos com NaCl 0,15 M.

O pico não retido na matriz Sephadex G-50, 150 mL, foi submetido à coluna cromatográfica de afinidade em matriz de quitina - polímero natural de N-acetilglicosamina-GlcNAc (23 cm x 3,6 cm), equilibrada com NaCl 0,15 M. A amostra foi colocada em refluxo por 17 horas. O pico não retido foi eluído com a mesma solução de equilíbrio da coluna e o pico retido, com glicina 0,1 M com NaCl 0,15 M - pH 2,6. As frações eluídas que apresentaram atividade hemaglutinante foram dialisadas contra água destilada e liofilizadas.

O pico retido na cromatografia por afinidade em matriz de quitina foi submetido à cromatografia de exclusão molecular em coluna Sephacryl S-200 HR (26 mm x 600 mm) de 320 mL acoplada ao HPLC. No procedimento, 40 mg da amostra foi solubilizada em 800 μL da solução de fosfato de sódio bibásico 0,05 M com NaCl 0,15 M, pH 7,2, tampão de equilíbrio da coluna e de eluição dos picos, e passada através de filtro de membrana polietersulfônica (PES), com poros de 0,22 μm . O volume de 500 μL da amostra foi aplicado ao looping da coluna e a eluição dos picos foi feita sob fluxo constante de 1,3 mL/min.

Todas as trocas de soluções em todos os procedimentos respeitaram a obtenção da absorbância abaixo de 0,050, medidas a 280 nm.

3.9 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA EM PRESENÇA DE SDS E β -MERCAPTOETANOL

Para determinar o grau de pureza e estimar o peso molecular da proteína isolada, o extrato total e as amostras dos picos ativos, obtidas através das cromatografias de afinidade em matriz de Sephadex G-50 e quitina, e exclusão molecular em sistema HPLC, foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS e β -mercaptoetanol.

O procedimento foi realizado através da técnica descrita por Laemmli (1970). O gel de concentração foi preparado na concentração de 3,5% de poliacrilamida em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 e SDS a 1%, e o gel de separação em tampão Tris-HCl 3 M, pH 8,8 e SDS a 1%. As amostras, dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,625 M, pH 6,7, contendo SDS a 2%, glicerol a 10% e β -mercaptoetanol 5%, foram aquecidas em estufa a 100 °C durante 10 minutos, centrifugadas por 5 minutos e em seguida adicionados 300 μ L de azul de bromofenol 0,02%. Alíquotas de 7,5 μ L foram aplicadas nos poços do gel de concentração e as corridas ocorreram sob amperagem constante (25 mA). O tampão de corrida, com pH 8,3, foi preparado com glicina 0,2 M; tris 0,025 M e SDS 10%.

Ao final das corridas, o gel foi corado com Coomassie brilliant blue R-250 a 0,005%. A remoção do excesso de corante foi realizada com o auxílio de uma solução descorante de metanol, ácido acético e água destilada (1:3, 5:8, v/v/v).

Os marcadores proteicos utilizados foram fosforilase b (97 kDa), BSA (45 kDa), ovoalbumina (66 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina de soja (20,1 kDa) e α -lactoalbumina (14,4 kDa).

3.10 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO – QUÍMICA

3.10.1 Presença de carboidratos

Os glicídios solúveis foram determinados através do método colorímetro fenol-ácido sulfúrico, usando glicose como padrão (DUBOIS, 1956). O ensaio consistiu em diferentes diluições das amostras protéicas de ConBr II ou da solução padrão. Alíquotas de 500 μ L das diluições do extrato total liofilizado e das amostras proteicas foram retiradas e acrescentadas 500 μ L de fenol 5% e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Depois do resfriamento do sistema, já que a reação é exotérmica, a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 490 nm. Como padrão, utilizaram-se soluções com diferentes concentrações de glicose.

3.10.2 Teste de termoestabilidade

A estabilidade das lectinas ConBr e ConBr II frente a diferentes temperaturas foi determinada pela atividade hemaglutinante, por diluição seriada, usando eritrócitos de coelho a 3%. Previamente à diluição, as amostras foram submetidas à ação do calor nas temperaturas

de 40 a 100°C em termociclador, durante 10 minutos. A presença da atividade hemaglutinante foi verificada macroscopicamente.

3.10.3 Efeito do pH

A estabilidade das lectinas ConBr e ConBr II frente a diferentes valores de pH foi determinada pela atividade hemaglutinante, por diluição seriada, usando eritrócitos de coelho a 3%. As proteínas foram diluídas em solução tampão Tris 0,02 M, com diferentes valores de pH e depois foi realizada a diluição seriada com o mesmo tampão. A presença da atividade hemaglutinante foi verificada macroscopicamente.

3.10.4 Efeito dos agentes desnaturantes

ConBr e ConBr II foram diluídas em NaCl 0,15 M contendo ureia a 4 e 8 M incubadas por 30 minutos, na proporção de 1 mg/mL. Após a incubação, a atividade da lectina foi avaliada através de diluição duplo-seriada com eritrócitos de coelhos a 3%. A presença da atividade hemaglutinante foi verificada macroscopicamente. O branco positivo das amostras foi realizado utilizando eritrócitos a 3% e as lectinas.

3.10.5 Efeito dos agentes redutores

As proteínas foram diluídas em NaCl 0,15 M contendo β -mercaptoetanol a 5 e 20 mM, na proporção de 1 mg/mL e incubadas por 30 minutos, na proporção de 1 mg/mL. Após a incubação, a atividade da lectina foi avaliada através de diluição duplo-seriada com eritrócitos de coelhos a 3% e o branco positivo das amostras foi realizado utilizando eritrócitos a 3% e a lectinas.

3.10.6 Efeito dos agentes oxidantes

Para o teste da resistência a agentes oxidantes foi utilizado o metaperiodato de sódio (NaIO_4) 10 mM - em tampão acetato de sódio 10 mM, pH 5,5. As lectinas, na proporção de 1 mg/mL, foram diluídas em metaperiodato de sódio 10 mM e em seguida, incubadas em ambiente desprovido de luz por 10 minutos. Logo após, cada amostra foi dialisada contra NaCl 0,15 M durante 16 horas. Decorrido esse tempo, realizou-se o ensaio de

hemaglutinação. A presença da atividade hemaglutinante foi verificada macroscopicamente. O branco positivo das amostras foi realizado utilizando eritrócitos a 3% e as lectinas.

3.10.7 Efeito dos agentes quelantes e cátions divalentes

A dependência de cátions divalentes sobre a atividade lectínica foi determinada apenas em ConBr II, através da atividade hemaglutinante usando EDTA como agente quelante. A lectina foi diluída em EDTA 250 mM em NaCl 0,15 M, na concentração de 1 mg/mL e incubada por 30 minutos. Após esse período, foi adicionado cloreto de cálcio, cloreto de manganês e cloreto de magnésio, na concentração final de 40 mM, com nova incubação de 30 minutos. As amostras assim tratadas foram diluídas serialmente em NaCl 0,15 M quando eritrócitos foram acrescentados.

A presença da atividade hemaglutinante foi verificada macroscopicamente e o branco positivo da amostra foi realizado utilizando eritrócito a 3% e a lectina.

3.11 ATIVIDADE BIOLÓGICA

3.11.1 Atividade antibacteriana

O potencial citotóxico para bactérias foi avaliado através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pela técnica de microdiluição.

Para isso, diluições seriadas à metade de uma solução da nova lectina isolada de *C. brasiliensis* (1024 µg – 1 µg) foram adicionadas a uma suspensão de bactérias (1×10^2 UFC/mL). As linhagens bacterianas, oriundas da ATCC – American Type Culture Collection, utilizadas foram: *Bacillus subtilis* ATCC 0516, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 8027, *P. aeruginosa* ATCC 25619, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *S. aureus* ATCC 25925, em meio luria-bertani (LB) e em seguida incubadas a 37 °C por 24h. Foi considerada como CIM a menor concentração da solução de lectina que inibiu completamente o crescimento bacteriano (DAVIENNE; RADDI, 2002).

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e expressos como a média mais ou menos o erro padrão da média.

3.11.2 Atividade anti-inflamatória

3.11.2.1 Animais de experimentação

Nos ensaios da atividade anti-inflamatória foram usados dois grupos de camundongos (n=6) suíços e machos (*Mus musculus*, com massa corporal entre 25 e 35 g). Para isso, os animais foram mantidos em quarentena nos dias que antecederam o experimento e depois, levados ao laboratório para um período de adaptação de pelo menos uma hora antes dos testes. Os camundongos foram mantidos com água e alimentos - *ad libitum* e sob condições adequadas de luz e temperatura. Os testes foram realizados no período entre as 7 e 16 horas a 20 ± 3 °C.

Todos os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da USP, sob Nº 183-2011.

3.11.2.2 Avaliação da toxicidade após tratamento com ConBr II

Para avaliação de possíveis efeitos tóxicos da lectina, foram utilizados dois grupos experimentais de camundongos, cada um composto por 6 animais. Um grupo recebeu uma solução de lectina (1mg/kg) diluída em solução salina durante quatorze dias por via e.v., obedecendo uma posologia de tomada diária única. O outro, recebeu a mesma quantidade de solução salina pela mesma via e posologia.

Após os quatorze dias, os animais foram pesados e sua massa corporal comparada com a massa anterior (antes do tratamento) e o resultado sendo expresso como variação de massa corpórea antes e após os tratamentos. Em seguida, foi coletado sangue dos animais de ambos os grupos pelo plexo orbital para avaliação do leucograma e dosagens bioquímicas, sendo estes então sacrificados, e seus órgãos (fígado, coração, rim) removidos ainda úmidos e pesados. O peso de cada órgão foi expresso por cada 20 g de massa corporal e comparado ao grupo controle. O estômago dos animais foi também removido para avaliação macroscópica da possível presença de úlceras (SANTUCCI et al., 1994).

Na avaliação do leucograma, uma gota de sangue foi colocada sobre lâminas para a confecção de esfregaços, corados pelo método da hematoxilina-eosina (HE), e destinados à contagem diferencial das células em microscópio óptico, utilizando a objetiva de imersão (aumento de 100 vezes). A contagem total foi feita de acordo com o método de Souza &

Ferreira (1985). Após este procedimento, obteve-se então o número de células $\times 10^6/\text{mL}$ de sangue.

O restante da amostra de sangue foi centrifugado, e o plasma removido para realização das dosagens bioquímicas de ureia e creatinina como indicador de função renal e avaliação da atividade das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), como indicadores da função hepática.

3.11.2.3 Verificação da atividade antiinflamatória por meio da migração de neutrófilos e da permeabilidade vascular

Nesse teste, os camundongos receberam carragenina (Cg; 500 $\mu\text{g}/\text{cav.}$) dissolvida em 0,5 mL de salina estéril por via intraperitoneal (i.p.). A lectina de *C. brasiliensis* (ConBr II), na concentração de 1 mg/Kg, foi administrada por via endovenosa (e.v.) em 0,1 mL de salina, 15 minutos antes da injeção da Cg. Como controle negativo, foram utilizados camundongos que receberam salina estéril e.v.

A migração de neutrófilos foi avaliada após 4 horas da injeção de Cg. Para tanto, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. Em seguida, as células presentes na cavidade peritoneal foram coletadas por meio da lavagem do local injetando-se 3,0 mL de salina contendo 5 UI/mL de heparina. Os abdômens dos animais foram levemente massageados, e através de uma incisão, foram coletados os fluidos peritoneais.

A contagem total e diferencial dos leucócitos foi realizada conforme metodologia descrita por Souza e Ferreira (1985). Neste procedimento, 20 μL do fluido coletado de cada animal foram diluídos em 380 μL do reagente de Turk e posteriormente usados para a contagem total de leucócitos em câmara de Neubauer. A contagem diferencial das células foi realizada por meio de esfregaços corados em lâminas, para tanto, 50 μL do exsudato foram centrifugados em citocentrífuga a 400 x g, durante 10 minutos. Após este processo, os esfregaços foram corados pelo método da hematoxilina-eosina (HE) e as células contadas através de microscópio óptico, sendo os resultados expressos como a média $\pm$ erro padrão médio (E.P.M.) do número de células $\times 10^6/\text{mL}$ de fluido peritoneal.

Para a avaliação da permeabilidade vascular, os camundongos receberam a lectina ConBr II na dose de 1 mg/Kg e.v., 15 minutos antes da administração do estímulo Cg (500 $\mu\text{g}/\text{cav.}$). O grupo controle recebeu somente salina i.p. e uma hora antes do sacrifício, os animais receberam azul de Evans (50 mg/kg) pelo plexo ocular (THURSTON et al., 1999). Os

animais foram sacrificados por deslocamento cervical três horas após a administração de Cg e em seguida, o fluido presente na cavidade peritoneal foi coletado através da lavagem desta injetando-se 3,0 mL de salina contendo 5 UI/mL de heparina. Os abdômens dos animais foram levemente massageados, e através de uma incisão, foram coletados cerca de 1,0 mL de fluido peritoneal. A quantificação do azul de Evans extravasado para a cavidade peritoneal foi realizada por espectrofotometria a um comprimento de onda de 610 nm. Os dados obtidos em absorbância foram convertidos em μg de azul de Evans por meio de regressão linear baseado em uma curva padrão de azul de Evans. Os resultados foram calculados em μg de azul de Evans/mL de fluido peritoneal e expressos como média $\pm$ EMP.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE E TEOR DE PROTEÍNAS SOLÚVEIS DO EXTRATO DE SEMENTES DE *C. brasiliensis*

O extrato das sementes de *C. brasiliensis* foi obtido com diferentes soluções extratoras por meio de agitação magnética durante 3 horas e apresentou atividade hemaglutinante quando testado contra eritrócitos de coelhos não tratados com enzimas proteolíticas.

As sementes de *C. brasiliensis* mostraram alto conteúdo proteico, propriedade característica das leguminosas (MOREIRA et al., 1996) que varia entre as diferentes espécies da família Diocleinae.

O maior teor de proteínas solúveis por grama de farinha 107,19 mgP/gF foi obtido com NaCl 0,15 M com atividade específica de 762,25 UH/ mgP. A quantidade de proteínas solúveis por grama de farinha extraídas com glicina 0,1 M- pH 2,6 com NaCl 0,15M - 36,6 mgP/gF se aproxima do que foi descrito por MOREIRA et al, 1993 para *C. brasiliensis* - 34.34 mgP/gF o que significa que esse tampão extraiu mais proteínas totais do que o tampão glicina pH 9,0 - 0,1 M com NaCl 0,15 M, (19,20 mgP/gF) e o Tris-HCL 0,1 M com NaCl 0,15 M pH 7,4 (12,20 mgP/gF) porém o melhor teor de lectina ficou evidenciado quando a extração foi realizada com Tris-HCL 0,1 M com NaCl 0,15 M - pH 7,4 o que pode ser confirmado pelo valor da atividade específica de 107436,06 UH/ mgP.

4.2 ISOLAMENTO DA LECTINA DE SEMENTES DE *C. brasiliensis*

O extrato da farinha de sementes de *C. brasiliensis* obtido da extração com NaCl 0,15 M foi submetido a cromatografia de afinidade em Sephadex G-50 apresentando um pico não retido (PI) e um pico retido (PII) com atividades específicas para eritrócitos de coelhos a 3%. de 179,38 e 8104,10 UH/mgP respectivamente (Figura 3A). O PI foi recromatografado em coluna de quitina onde apresentou um pico não retido (PI) e um retido (PII) no qual a atividade específica foi de 248,32 UH/mgP e apresentou atividade hemaglutinante frente a hemácias de coelho a 3% (Figura 3B), que após diálise e liofilização, foi submetido a cromatografia de exclusão molecular onde apresentou um perfil cromatográfico com três distintos pesos moleculares (Figura 4) no qual apenas um, com atividade específica de 236,69 UH/mgP, apresentou atividade hemaglutinante. A cromatografia por exclusão molecular tem sido constantemente utilizada na purificação de lectinas vegetais, principalmente em etapas

intermediárias do processo, como no isolamento da Curcina, uma lectina tóxica das sementes de *Jatropha curcas* (LIN et al., 2010), na purificação de uma lectina manose-específica das sementes de *Treulia africana* (ADENIRAN et al., 2009) e no isolamento de uma lectina antifúngica presente nas sementes egípcias de *Pisum sativum* (SITOHY et al., 2007).

O extrato das sementes de *C. brasiliensis*, obtido a partir da agitação da farinha com NaCl 0,15 M, e os picos ativos obtidos através das cromatografias por afinidade em matriz Sephadex G-50 e quitina; e por exclusão molecular em sistema HPLC foram submetidos à eletroforese SDS-PAGE para observação do perfil proteico das proteínas em questão.

A lectina ConBr, apresenta três subunidades com 30, 16 e 12 kDa (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 diferencia da nova lectina isolada, denominada ConBr II, a qual apresenta duas subunidades com pesos estimados em 45 e 25 kDa (Figura 3C).

Figura 5 - Em A: perfil da cromatografia de afinidade do extrato bruto das sementes de *C. brasiliensis* em matriz sephadex G-50 (40 cm x 2 cm). Foram eluídas frações de 10 mL, monitoradas em 280 nm. PII – Pico ativo; **Em B:** perfil da cromatografia de afinidade - PI sephadex em matriz de quitina (23 cm x 3,6 cm). Foram eluídas frações de 10 mL, monitoradas em 280nm. PII – Pico ativo. **Em C:** eletroforese SDS-PAGE. A-Marcadores moleculares; B: Extrato liofilizado (7,5µL); C: PI cromatografia por afinidade matriz sephadex G-50 (7,5µL); D: PII cromatografia por afinidade matriz sephadex G-100 – ConBr (7,5µL); E: PII cromatografia por afinidade matriz de quitina (7,5µL); F: PI cromatografia por exclusão molecular em sistema HPLC - ConBr II (7,5µL); G: PI liofilizado da cromatografia por exclusão molecular em sistema HPLC - ConBr II (7,5µL);

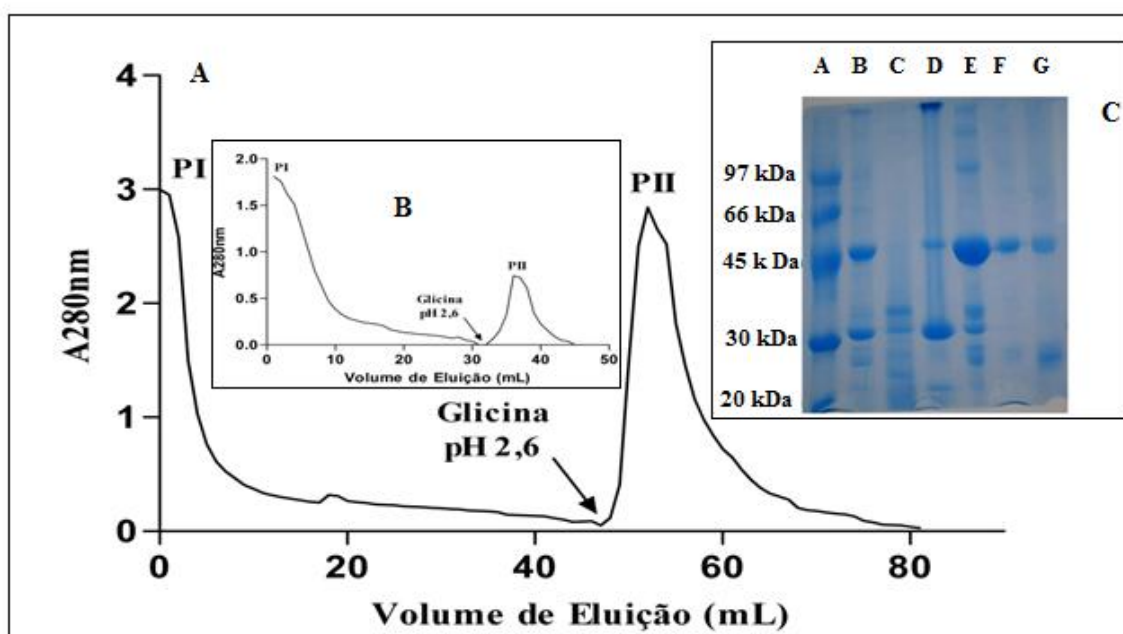
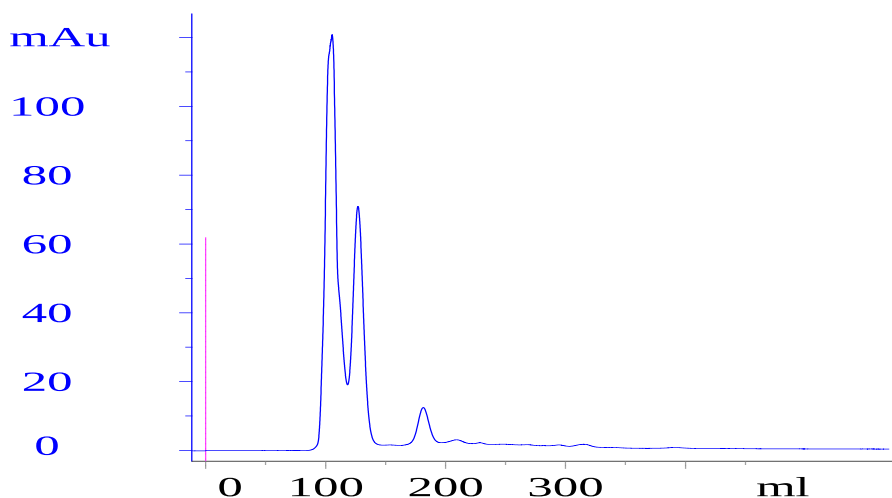


Figura 6 - Padrão cromatográfico da coluna de exclusão molecular. A coluna foi equilibrada com Tris-HCl 0,025 M pH 7,6 e eluída em modo gradiente com Tris-HCl 0,025 M pH 7,6 com NaCl 0,15 M. Frações de 6 mL foram coletadas e monitoradas em 280 nm.



4.3 ESPECIFICIDADE A CARBOIDRATOS E GLICOPROTEÍNAS

O ensaio de inibição da atividade hemaglutinante da lectina de ConBr II, proveniente da coluna de quitina, por açúcares e glicoproteínas mostra que somente os açúcares manose, frutose e maltose foram capazes de inibir a atividade hemaglutinante da lectina com CIM de 6,25, 12,5 e 12,5 mM respectivamente, diferindo de ConBr a qual é inibida por glicose e manose assim como outras da mesma tribo tais como *D. grandiflora* (MOREIRA et al., 1983), *Canavalia dictyota* (MONTEIRO et al., 1998), *Dioclea violacea* (MOREIRA et al., 1996) e *D. virgata* (CAVADA et al., 1996).

Lectinas tipo-2 de *C. ensiformis* e *D. grandiflora*, inibidas por lactose, melezitose e sacarose também exibiram diferenças na especificidade por carboidratos em relação às do tipo-1, específicas para glicose e manose (MELGAREJO et al., 2005). *Dioclea sericia* também apresenta duas lectinas, P₂ e P₄ onde a primeira é inibida por lactose, melibiose e sacarose, e a segunda por glicose e manose (SIERRA; PÉREZ, 1999).

4.4 NATUREZA GLICOPROTEICA

As lectinas podem apresentar glicídios associados a sua estrutura sendo exemplos a de *Zea mays* L. (MARTÍNEZ-CRUZ, 2001), *C. fairchildiana* R. A. HOWARD (LEITE et al., 2012) e a de *Canavalia gladiata* (LAIJA et al., 2010).

A lectina de *C. brasiliensis* (ConBr II) foi investigada quanto a presença de carboidratos em sua constituição e o teor de carboidrato ligado a proteína foi quantificado pelo método colorimétrico do fenol-sulfúrico (DUBOIS, 1956) que demonstrou um valor de 47 µg de carboidrato, indicando que a mesma é uma glicoproteína. Resultados semelhantes foram encontrados para DGL II e CEL II – lectinas tipo 2 de *D. grandiflora* e *C. ensiformis* respectivamente (MELGAREJO et al., 2005) e para as lectinas de *D. sericia* (SIERRA; PÉREZ, 1999) e de *D. lehmani*, onde nessa última as duas proteínas apontaram carboidratos, sendo o conteúdo de carboidratos em DLL-II maior do que em DLL-I (PÉREZ, 1997). Os resultados em ConBr II diferem dos encontrados para a ConBr, já descrita como lectina não – glicosilada, e de outras lectinas tipo 1 da tribo Diocleinae como por exemplo a de *D. violacea* (MOREIRA et al., 1996) e *D. virgata* (CAVADA et al., 1996). Lectinas isoladas de *Bauhinia Monandra* (SOUZA et al., 2011) e de *Luetzelburgia auriculata* (OLIVEIRA et al., 2002) também são classificadas como glicoproteínas.

4.5 EFEITO DA TEMPERATURA

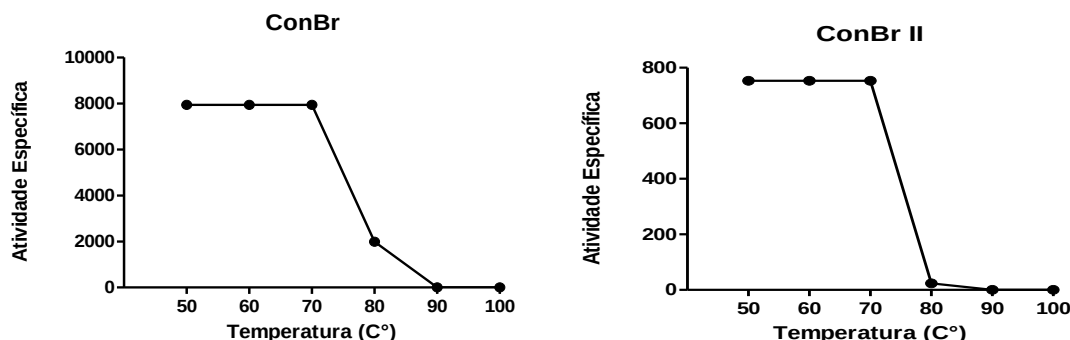
A temperatura é um dos fatores importantes para a manutenção da integridade proteica e da sua atividade, pois a variação da temperatura afeta o comportamento das proteínas. Com relação às lectinas vegetais, foi descrito que algumas são mais resistentes e outras mais sensíveis às variações de temperatura.

As lectinas de *C. brasiliensis* (ConBr e ConBr II) se mostraram resistentes a ação térmica perdendo sua atividade total a partir do tratamento a 90 °C durante 10 minutos. Nas temperaturas de 40 a 70 °C, ConBr teve sua atividade reduzida em cerca de 50% porém ConBr II se mostrou mais estável nesse intervalo. A 80 °C a redução das atividades foi mais abrupta para as duas lectinas sendo essa totalmente suprimida a 90 °C e 100 °C (Figura 6).

A resistência térmica foi relatada também para a lectina heveína, de *H. brasiliensis*, que permaneceu ativa inibindo o crescimento de fungos mesmo depois de aquecida a 90 °C por 10 minutos (CARNEIRO & HALLA, 2011; NEUMANN et al., 2004); e para a de *D. violacea* a qual foi relativamente resistente permanecendo com 50% de sua atividade depois de aquecida durante 7,5 min a 60 °C e 5 min a 80 °C (MOREIRA et al., 1996).

Já lectina isolada de *Capsicum annuum* se mostrou mais instável às variações de temperatura tendo sua atividade diminuída a partir de 40 °C. (KUKU et al., 2009).

Figura 7 - Efeito da temperatura sobre a atividade específica das lectinas de sementes de *C. brasiliensis* (ConBr e ConBr II).



4.6 EFEITO DO pH

As proteínas possuem um pH ótimo de atuação no qual sua atividade é máxima e em pH acima ou abaixo do pH ótimo a atividade proteica é reduzida e no caso de pH extremos, até mesmo nula. Variações de pH modificam a carga líquida das proteínas provocando repulsão eletrostática e rompimento de ligações de hidrogênio que estabilizam a estrutura proteica levando assim à sua desnaturação e perda da sua atividade biológica.

Para muitas proteínas o pH atua como fator limitante da sua atividade. Com o intuito de verificar a estabilidade das lectinas de sementes de *C. brasiliensis*, tanto ConBr como ConBr II tiveram suas atividades hemaglutinantes testadas frente a variações do pH e demonstraram ter sua atividade afetada pelo pH do meio no qual foram inseridas.

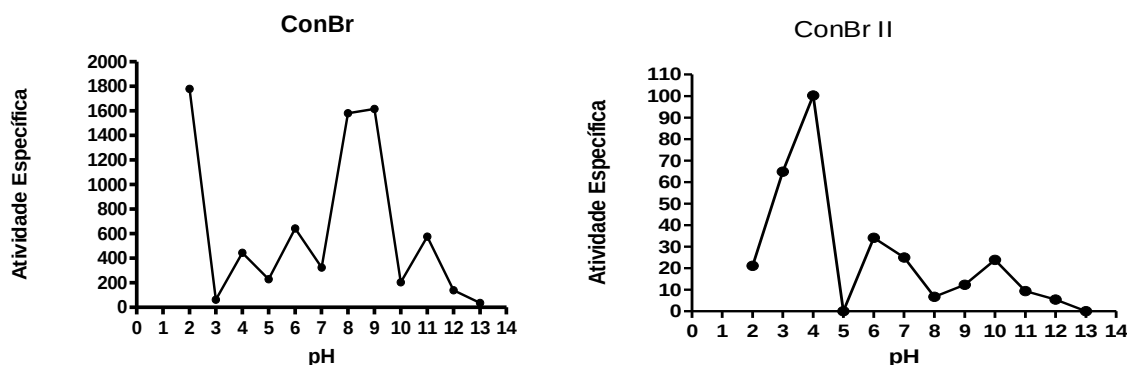
Os gráficos da resistência ao pH (do 2,0 ao 13,0), apresentados na Figura 7, aliados aos resultados de atividade específica e dosagem de proteína solúvel pelo método de Bradford, (1956) permitem observar que ConBr e ConBr II mostraram melhor solubilização em pH mais básicos, na faixa de 8,0 a 13,0 com concentrações de proteína que variaram de 0,592 a 0,890 mgP/mL e atividade específica de 0 a 790 UH/mgP. Apresentaram baixa solubilização em pH mais ácidos, na faixa de 2,0 ao 6,0 com concentrações que variaram de 0,071 a 0,398 mgP/mL e atividade específica de 0 a 889,47 UH/mgP, exceto para ConBr II, com solubilização 0,756 mgP/mL em pH 2,0 porém com atividade específica de 10,57 UH/mgP. Em pH básicos, a atividade hemaglutinante das duas lectinas foi reduzida e em pH 13,0, a atividade de ConBr II foi totalmente anulada. Em pH ácidos, com exceção de ConBr II que em pH 5,0 não exibiu hemaglutinação, a atividade das duas proteínas foi maior quando comparada aos pH básicos. A diminuição da atividade hemaglutinante pode ser resultante da baixa solubilização ou da reorganização das subunidades das cadeias das lectinas.

O pH também influencia na formação de dímeros e tetrâmeros das lectinas. Essa variação foi evidenciada para as lectinas de sementes de *D. virgata* e *D. rostrata* onde formam tetrâmeros em pH igual ou acima de 6,5 (CALVETE, 1999) e para ConBr que se apresenta na forma de dímeros e tetrâmeros em pH 8,5, diferindo da ConA que é dimérica em pH 5,0 e tetramérica em pH acima de 7,0 (GRANJEIRO et al., 1997).

A tendência para a diminuição da atividade hemaglutinante em lectinas vegetais é comum em pH extremos e valores abaixo de 3,0 e acima de 10,0 normalmente interferem na atividade hemaglutinante (ZANETTI, 2007) e varia entre as lectinas. Com relação à *Talisia esculenta*, sua lectina mostrou ser resistente à variações de pH na faixa do 3,0 ao 9,0 (FREIRE et al., 2002). A lectina de *Arundo donax* L. teve sua atividade reduzida após ser exposta por duas horas em pH abaixo de 3,0 e acima de 9,0 (ZANETTI, 2007) e a de *C. annuum* teve sua atividade suprimida em pH 3,0 e 4,0 e diminuída nos pH 5,0; 10,0; 11,0 e 12,0.

A lectina de *Setcreasea purpurea* é capaz de promover aglutinação em valores de pH extremos, sendo 100% de hemaglutinação vistos nos valores de pH 5,0 a 9,0 (YAO et al., 2010). No entanto, a lectina do fungo *Agrocybe cylindracea* é bastante sensível a valores extremos de pH, mantendo-se funcional apenas entre 6,0 e 9,0 (CHAO et al., 2008).

Figura 8 - Efeito do pH sobre a atividade específica das lectinas de sementes de *C. brasiliensis* (ConBr e ConBr II).



4.7 EFEITO DOS AGENTES DESNATURANTES

Como agente desnaturante, a ureia provoca o rompimento de interações hidrofóbicas que estabilizam as proteínas, mas não de ligações covalentes representando assim, um tratamento brando para elas, podendo atuar também como agente para solubilização de proteínas já que seu potencial desnaturante vai depender de sua concentração.

ConBr e ConBr II foram submetidas a ação do agente desnaturante ureia nas concentrações de 4 M e 8 M. Pode-se observar que, nas concentrações de ureia testadas, as lectinas apresentaram solubilização melhor que no controle sendo de 0,3410 mgP/mL e 0,2660 mgP/mL para ConBr e ConBr II, respectivamente, em ureia 4 M; em ureia 8 M, a solubilização foi de 0,4870 mgP/mL para ConBr e 0,3870 mgP/mL para ConBr II. Em NaCl 0,15 M usado como controle a solubilização foi de 0,2580 mgP/mL – ConBr, e 0,17 mgP/mL - ConBr II.

Porém, a atividade específica de 1501,46 UH/mL para ConBr e 481,20 UH/mL para ConBr II em ureia 4 M mostrou redução considerável em relação ao controle NaCl 0,15 M, 15875,96 UH/mL (ConBr) e 752,94 UH/mL (ConBr II). Na presença de ureia 8 M, a redução dessa atividade foi maior: 131,41 UH/mL para ConBr e 165,37 UH/mL para ConBr II.

Esses dados mostram que as lectinas são melhores solubilizadas na presença de sais, porém ocorre uma pequena mudança na estrutura dessas proteínas evidenciada pela redução da atividade específica, apesar de que as concentrações dos agentes não tenham sido suficientes para ocasionar alteração total na estrutura proteica. Algumas lectinas apresentam resistência à ureia até 8 M como é o caso da de sementes de *Erythrina indica* e de *Moringa oleifera*, que não perderam sua atividade hemaglutinante na presença de ureia 8 M durante 24h e 3 M respectivamente (DRESCH, 2008; KATRE et al., 2008). No entanto, a lectina de *Griffonia simplicifolia* sofre desnaturação após exposição à ureia 6 M (ZHU-SALZMAN et al., 2002).

4.8 EFEITO DOS AGENTES REDUTORES

O ensaio da resistência das lectinas frente ao agente redutor β -mercaptoetanol está demonstrado na Tabela 2. Sendo um agente redutor, o β -mercaptoetanol age como doador de elétrons provocando a redução e dessa maneira, rompimento de quaisquer pontes dissulfeto (S--S) que estabilizem a estrutura da proteína provocando assim, sua desnaturação e dessa forma, perda de sua atividade.

Já foi mostrado que a lectina I da esponja marinha *Axinella corrugata* teve sua atividade hemaglutinante reduzida em 50% na presença de beta-mercaptoetanol 2,5 mM e 5 mM (DRESCH, 2008).

Com relação às lectinas de *C. brasiliensis*, para ConBr foi verificado que a atividade específica diminuiu com ação do beta-mercaptoetanol nas concentrações de 5 e 20 mM sendo a redução maior na presença de concentração de 20 mM. Diferentemente, ConBr II teve sua

atividade específica aumentada pela ação do beta-mercaptoetanol, sugerindo a presença de pontes dissulfeto na estrutura de ConBr e ausência em ConBr II.

Tabela 2 - Resistência das lectinas frente ao β -mercaptoetanol. As lectinas foram incubadas com beta-mercaptoetanol a 5, 10 e 20 mM durante 30 min. O efeito do agente foi demonstrado através de diluição duplo-seriada e os resultados, expressos com os valores da atividade específica.

Tratamento	ConBr		ConBr II	
	mgP/mL	Atividade Específica	mgP/mL	Atividade Específica
Controle – NaCl 0,15 M	0,2580	15875,96	0,1700	752,94
β-mercaptoetanol 5 mM	0,3410	9481,48	0,2660	1446,32
β-mercaptoetanol 20 mM	0,2160	2426,54	0,1770	1113,04

4.9 EFEITO DOS AGENTES OXIDANTES

O metaperiodato de sódio é um agente oxidante que pode interferir na atividade biológica de proteínas através de alterações irreversíveis em carboidratos (FERREIRA et al., 2008) ao clivar ligações entre átomos de carbono adjacentes que contêm grupos hidroxilas, criando dois grupos aldeídos reativo, no caso de glicoproteínas ou através da oxidação dos próprios aminoácidos da cadeia polipeptídica (CLAMP; HOUGH, 1966), o que pode levar à perda da atividade biológica da proteína.

Na presença do metaperiodato de sódio, foi possível observar uma diminuição na atividade hemaglutinante de ambas as lectinas com relação aos seus controles (15875,97 UH/mgP – ConBr e 752,94 UH/mgP – ConBr II) sendo que esse efeito foi maior em ConBr do que em ConBr II cujas atividades específicas foram de 8350,35 e 89,57 UH/mgP respectivamente, na presença do agente.

A ConBr é uma lectina não glicosilada e a redução de sua atividade hemaglutinante pode ter ocorrido devido a interação entre o metaperiodato e os seus aminoácidos. Com relação à ConBr II, a redução de sua atividade pode ter ocorrido pelo fato dela ser uma glicoproteína e o metaperiodato de sódio ter reagido com carboidratos em sua estrutura ou pode-se inferir que a porção glicídica da glicoproteína pode atuar na atividade hemaglutinante promovendo melhor adequação do sítio de ligação da lectina ao carboidrato de membrana.

Estudos anteriores mostraram que o tratamento com metaperiodato de sódio das lectinas de *Belamya bengalensis* (BANERJEE et al., 2004) e de *Macrophomina phaseolina*

(BHOWAL et al., 2005) ocasionou significativa diminuição da atividade hemaglutinante dessas lectinas, diferentemente da lectina *Annona coriacea* (COELHO, 2002) a qual não sofreu interferência do agente em sua atividade.

Biroc e Etzler, (1978) relataram que após tratamento da lectina de *Dolichos biflorus* com periodato ocorreu destruição de 16% dos resíduos de manose, porém a atividade hemaglutinante da lectina permaneceu frente a eritrócitos tipo A.

4.10 EFEITO DE AGENTES QUELANTES E DE CÁTIONS DIVALENTES

Lectinas que dependem de íons metálicos para exercerem sua ação são denominadas metaloproteínas (MOREIRA, 1991) e eles são necessários para promover a estabilidade do sítio de ligação da proteína ao carboidrato específico. O EDTA é um composto orgânico, quelante, que forma complexos muito estáveis com diversos íons metálicos e que impede, portanto, a ligação destes a proteína.

Os resultados na Tabela 3 e no gráfico da Figura 8 mostram que apenas o magnésio promoveu aumento da atividade hemaglutinante da lectina e a amostra Lectina + MgSO_4 incubada com EDTA 250 mM teve sua atividade totalmente suprimida.

ConBr II na presença do MnSO_4 e de CaCl_2 apresentou uma redução da atividade hemaglutinante quando comparada ao controle. A atividade hemaglutinante foi potencialmente reduzida quando a lectina e o CaCl_2 ou o MnSO_4 foram incubados com o EDTA 250 mM. Porém, quando o MgSO_4 foi adicionado ocorreu uma potencialização da atividade sendo essa superior ao controle. Essa mesma atividade foi suprimida quando o EDTA 250 mM e o MgSO_4 40 mM foram incubados juntos, concluindo-se que o magnésio é necessário para a sua estabilização na interação com os carboidratos.

ConBr II com CaCl_2 ou MnSO_4 , ao ser incubada com o EDTA 250 mM, teve retirados parcialmente os íons Ca^{2+} ou Mn^{2+} mas também algum Mg^{2+} que estabilizava sua estrutura ocasionando assim diminuição alta da atividade nessas amostras já que a quantidade do agente quelante pode não ter sido suficiente para a retirada de todos os íons.

Os resultados obtido diferem de ConBr a qual é uma metaloproteína dependente de cálcio e manganês para manutenção de sua atividade (SANZ-APARICIO et al., 1997).

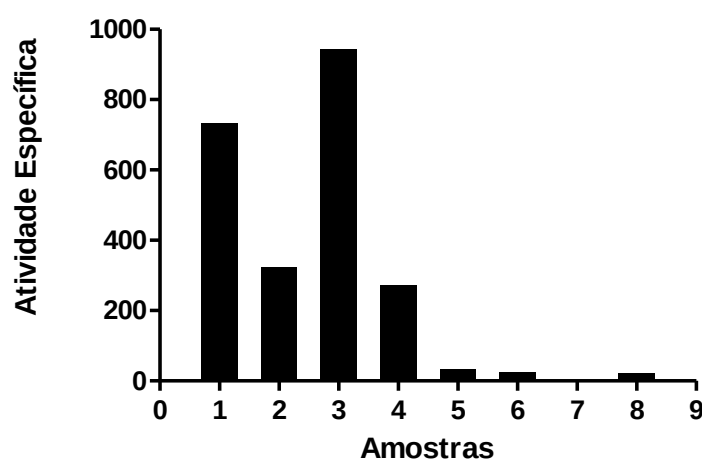
As lectinas de *Kaempferia rotunda*, de *Nymphaea nouchali* e de *Erythrina speciosa* demonstraram ser glicoproteínas íon-dependentes para manter funcional o sítio de ligação a carboidratos (KABIR et al., 2011, KONOZY et al., 2003). A lectina de *Agrocybe cylindracea*, apresentou diminuição de sua atividade hemaglutinante após tratamento com EDTA e íons

Ca^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} e Zn^{2+} (LI et al., 2008). ZHANG et al. (2010), isolaram uma lectina de fungo do gênero *Russula sp* que mantém sua atividade na presença de Ca^{2+} , e a aglutinação de eritrócitos se reduz na presença de Mn^{2+} . No estudo feito por Santos et al. (2009), foi visualizado um aumento na atividade hemaglutinante da lectina de *Moringa oleifera* na presença de Ca^{2+} , Mg^{2+} e K^{+} .

Tabela 3 - Efeito do EDTA e de cátions divalentes sobre ConBr II. A lectina foi incubada com EDTA 250 mM e os íons Ca^{2+} , Mg^{2+} e Mn^{2+} a 40 mM. O efeito dos agentes foi demonstrado através de diluição duplo-seriada e o resultado, com os valores da atividade específica.

Tratamento	mgP/mL	Atividade Específica
Controle – ConBr II com NaCl 0,15 M	0,1748	732,10
ConBr II com Ca^{2+} 40 mM	0,047	323,23
ConBr II com Mg^{2+} 40 mM	0,068	941,18
ConBr II com Mn^{2+} 40 mM	0,030	271,19
ConBr II com EDTA 250 mM	0,245	32,65
ConBr II com EDTA 250 mM e Ca^{2+} 40 mM	0,079	25,32
ConBr II com EDTA 250 mM e Mg^{2+} 40 mM	0,179	0
ConBr II com EDTA 250 mM e Mn^{2+} 40 mM	0,180	22,28

Figura 9 - Efeito do EDTA e de cátions divalentes sobre ConBr II. 1 - Controle; 2 - ConBr II com Ca^{2+} 40 mM; 3 - ConBr II com Mg^{2+} 40 mM; 4 - ConBr II com Mn^{2+} 40 mM; 5 - ConBr II com EDTA 250 mM; 6 - ConBr II com EDTA 250 mM e Ca^{2+} 40 mM; 7 - ConBr II com EDTA 250 mM e Mg^{2+} 40 mM; 8 - ConBr II com EDTA 250 mM e Mn^{2+} 40 mM.



4.11 ATIVIDADE BIOLÓGICA

4.11.1 Atividade antibacteriana

Os experimentos realizados com ConBr II mostraram que ela não inibiu o crescimento das bactérias testadas já que, provavelmente, as linhagens não devem apresentar carboidratos em suas cápsulas, parede celular ou até mesmo nos flagelos que sejam específicos para a lectina para permitir a ligação da mesma às células.

Muitos estudos têm sido realizados com lectinas de origem vegetal com relação à sua ação frente à diversos tipos de microrganismos e as análises veem demonstrando que essas proteínas podem ser fortes agentes inibidores do crescimento de bactérias de importância clínica.

Lectinas de outras plantas já demonstraram atividade contra as bactérias utilizadas no estudo tais como a do cerne de *Myracrodruon urundeuva* - aroeira e a de sementes de *Eugenia uniflora* – pitanga, que apresentaram atividade antimicrobiana contra *B. subtilis* e *S. aureus* sendo que a da pitanga também teve atividade contra *P. aeruginosa* e *E. coli* (PAIVA et al., 2010).

Gaidamashvili e Staden (2002) relataram ação antibacteriana em cinco lectinas-like de plantas medicinais do sul da África, onde todas promoveram redução do crescimento das bactérias *S. aureus* e *B. subtilis*. Oliveira et al., (2008) demonstraram que a lectina da semente de *Eugenia uniflora* foi capaz de inibir o crescimento das bactérias *S. aureus*, *Streptococcus* sp., *B. subtilis*, *Klebsiella* sp., *P. aeruginosa*, *Corinebacterium bovis* e *E. coli*.

4.11.2 Atividade antiinflamatória

4.11.2.1 Efeito de ConBr II no Tratamento Subcrônico em Camundongos

A administração de ConBr II (1 mg/Kg) em um esquema posológico de dose diária única durante quatorze dias consecutivos não afetou de forma significativa a massa corporal dos camundongos ou o peso úmido do fígado, do rim e do coração, os quais demonstraram morfologia normal e ausência de edema ao final do tratamento subcrônico com a lectina (Tabela 4). A avaliação macroscópica do estômago demonstrou uma mucosa intacta e sem lesões visíveis nos grupos avaliados.

Tabela 4 - Efeito de ConBr II sobre o peso corporal e o peso úmido dos órgãos de camundongos. O tratamento de ratos com ConBr II não altera o peso corporal dos animais (n=6) e o peso úmido de seus órgãos. A lectina foi injetada nos animais e.v., em dose única diária durante 14 dias; após o tratamento, os animais foram pesados, sacrificados e seus órgãos removidos e pesados ainda úmidos.

Paramêtros	Tratamento (0.1 mL)	
	Salina	ConBr II
Massa corporal antes (g)	26,77 ± 2.4	27.23 ± 1.4
Massa corporal depois (g)	30,89 ± 1.2	29,65 ± 4.5
Fígado (g/20 g peso corporal)	0,967 ± 0.4	1,008 ± 0,7
Rim (g/20 g peso corporal)	0,188 ± 0,45	0,163 ± 0,21
Coração (g/20 g peso corporal)	0,123 ± 0,07	0,144 ± 0,10

Os valores de ureia e creatinina, usados como parâmetros para a avaliação da função renal indicaram um funcionamento normal dos rins já que os mesmos não foram significativamente diferentes do controle. Quando comparado com este grupo, a função hepática avaliada pela cinética das enzimas alanina amino transferase-ALT e aspartato amino transferase-AST não foi alterada significativamente pelo tratamento com a lectina conforme os resultados expressos na tabela 5. As enzimas ALT e AST são liberadas no sangue em grandes quantidades quando a membrana dos hepatócitos está danificada, resultando em aumento da permeabilidade e assim, lesão hepática.

Tabela 5 - Avaliação da função renal e hepática em camundongos através de parâmetros bioquímicos após o tratamento com ConBr II. O tratamento de ratos com ConBr II não altera os níveis de ureia, creatinina, ALT e AST. A lectina foi injetada nos animais e.v., em dose única diária durante 14 dias; Após o tratamento, os animais foram pesados, sacrificados e seus órgãos removidos e os parâmetros bioquímicos mensurados.

Parâmetros Bioquímicos	Tratamento (0.1 mL)	
	Salina	ConBr II
Ureia (mg/dl)	51,22 ± 1.4	49,99 ± 4.1
Creatinina (mg/dl)	0,315 ± 0,14	0,298 ± 0,09
ALT (U/l)	45,60 ± 3.2	50,21 ± 1.9
AST (U/l)	86,33 ± 3,1	74,22 ± 9.0

Com relação ao leucograma, o número de leucócitos circulantes no sangue não foi modificado significativamente pelo tratamento com a lectina (tabela 6) indicando que não houve efeito nos tecidos linfoides.

Resultados semelhantes foram obtidos para as lectinas isoladas de *C. maritima* (FERNANDES, 2008), de *C. boliviana* (FIGUEIREDO et al., 2009) e da alga vermelha *Hypnea cervicornis* (BITENCOURT, 2007) e assim como estas, ConBr II não promoveu alteração dos parâmetros sanguíneos bem como nos órgãos dos animais.

Tabela 6 - Leucograma dos camundongos após tratamento com ConBr II. O tratamento de ratos com ConBr II não altera o seu leucograma. A lectina foi injetada nos animais e.v., em dose única diária durante 14 dias; Após o tratamento, os animais foram pesados, sacrificados e seus órgãos removidos e o leucograma mensurado.

Leucograma	Tratamento (0.1 mL)	
	Salina	ConBr II
Contagem Total	6,045 ± 3.4	7,004 ± 1,9
Neutrófilos	1,577 ± 1.9	1,344 ± 4.2

4.11.2.2 Influência de ConBr II na Permeabilidade Vascular e Migração de Neutrófilos em Camundongos

A injeção endovenosa de ConBr II (1 mg/Kg) na cavidade peritoneal dos camundongos levou a uma redução da permeabilidade vascular induzida por carragenina, avaliada pela quantificação de azul de Evans (50 mg/kg), demonstrado na figura 9.

A lectina também inibiu a migração dos neutrófilos após 4 horas da sua administração em 24% na concentração 0.1 mg/kg; 40% na concentração 1 mg/kg e 62% na concentração 10 mg/kg (Figura 10).

Figura 10 - Influência de ConBr II na Permeabilidade Vascular em Camundongos. A lectina ConBr II reduz a permeabilidade vascular em camundongos. Os animais foram tratados e.v. com salina ou ConBr II (1 mg/kg), 30 min. antes de Cg i.p. A permeabilidade vascular foi avaliada através da quantificação de azul de Evans (50 mg/kg) no fluido peritoneal após 3 horas da administração da Cg ou salina. Os resultados expressos como média de mg de azul de Evans/mL ± E.P.M. (n = 6) * indica significância estatística ($p < 0.05$) comparado ao grupo salina e ** comparado ao grupo Cg (ANOVA, teste de Bonferroni).

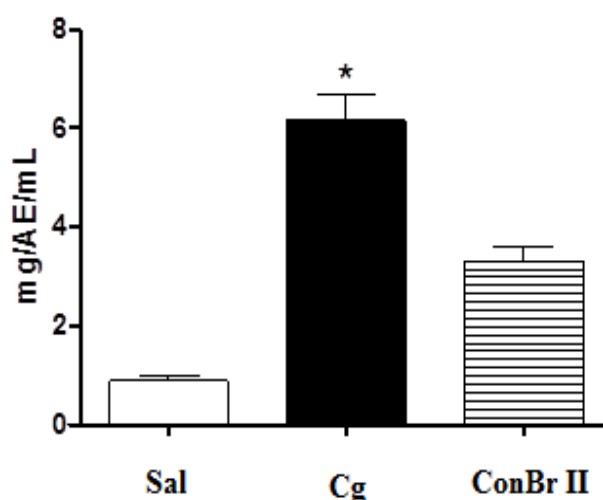
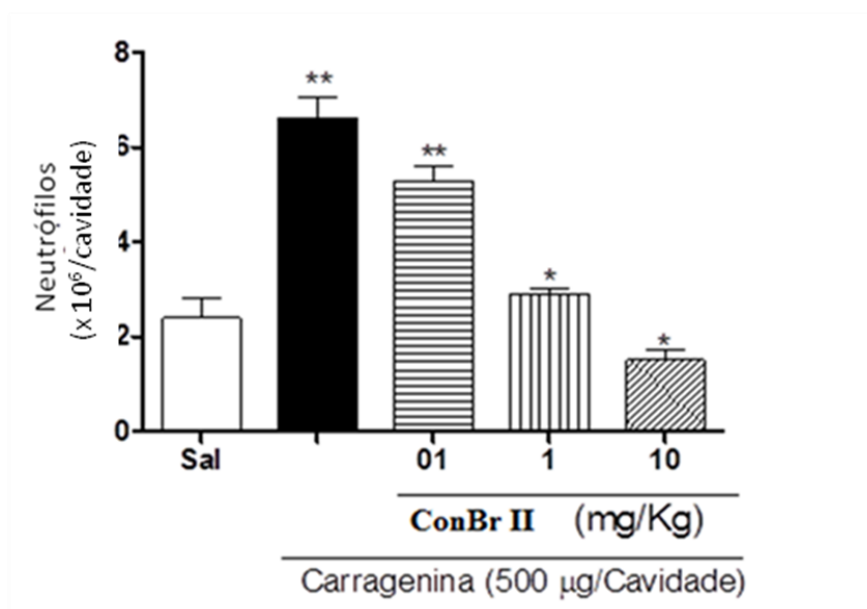


Figura 11 - Influência de ConBr II na Migração de Neutrófilos. A lectina ConBr II inibe a migração de neutrófilos induzida por carragenina para a cavidade peritoneal de camundongos. Os animais foram tratados e.v. com salina ou ConBr II (0,1, 1 e 10 mg/kg) 15 min antes de receberem Cg i.p. (500 µg/cav). A migração neutrofílica (MN) foi avaliada 4h depois da administração de Cg. Os animais controle negativo representam a MN induzida por salina i.p. Os valores são representados pela média $\pm$ E.P.M. do nº de neutrófilos (n = 6). * indica significância estatística ($p < 0.05$) comparado ao grupo salina **comparado ao grupo Cg (ANOVA, teste de Bonferroni).



A carragenina é um polissacarídeo sulfatado extraído de algas vermelhas que passou a ser usado como agente flogístico, a partir da década de 60, em modelos experimentais devido à sua habilidade de desencadear reação inflamatória aguda (CARVALHO, 2006).

Essa reação é caracterizada por edema e sensibilidade a estímulos térmicos e mecânicos devido à ação sequencial do sistema complemento e de vários mediadores químicos tais como histamina, 5-hidroxitriptamina, cininas e prostaglandinas (BORGES, 2010). No peritônio, a carragenina induz a migração de neutrófilos (SOUSA et al., 1988)

O estudo evidenciou que ConBr II possui efeito antiinflamatório quando testada no modelo de peritonite. Como houve alteração na permeabilidade dos vasos, o seu efeito pode estar relacionado com a sua ligação ao endotélio dos vasos, o que levou à redução da permeabilidade e impediu a entrada dos neutrófilos no tecido. Também devemos considerar a possibilidade de ligação da lectina com carboidratos na superfície dos neutrófilos, impedindo sua adesão ao endotélio.

A migração dos neutrófilos para tecidos lesados ou parasitados representa a segunda linha de defesa do organismo. Atraídos por mediadores químicos liberados pelos tecidos danificados, eles chegam ao local atingido e se aderem ao endotélio dos capilares antes de se

infiltrarem nos espaços teciduais. Essa aderência é específica e mediada por proteínas de membrana como as selectinas (BITENCOURT, 2010) e integrinas expressas na superfície das membranas dos leucócitos ou do endotélio onde desempenham um papel crucial na interação entre as células e os vasos (MANFRO et al., 2004).

Ao contrário dos dados obtidos para ConBr II no presente trabalho, estudos já demonstraram que ConBr não exibiu atividade inibitória sobre a migração de neutrófilos (PIRES, 2007).

Atividade antiinflamatória também foi observada para lectinas de *Araucaria angustifolia*, a qual promoveu diminuição tanto do edema de pata, quanto da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal, ambos induzidos por carragenina (SANTI-GADELHA et al., 2006) e para as de *Dioclea violacea*, *Dioclea guianensis* e *Cratylia floribunda*, as quais diminuem a migração de neutrófilos em 70, 63 e 62%, respectivamente (ASSREUY et al., 1997). Outras lectinas tais como a de *Annona coriacea* (COELHO et al., 2006), *Vatairea macrocarpa* (ALENCAR et al., 2003), *Artocarpus incisa* (BRANDO-LIMA et al., 2005), *Artocarpus integrifolia* (TOLEDO et al., 2009) e a de *D. rostrata* (FIGUEIREDO et al., 2009) possuem atividade pró-inflamatória sendo capazes de recrutar neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos. Essa indução à migração de neutrófilos não ocorre quando tais lectinas são colocadas em contato com os carboidratos específicos às quais se ligam, mostrando que a indução a inflamação é provocada pelo sítio de ligação a carboidratos.

A busca de drogas de origem natural que tenham como alvo a interação leucócito-endotélio no tratamento de doenças inflamatórias agudas e crônicas parece um campo promissor para melhorar as terapias para desordens associadas com a inflamação (PANÉS et al., 1999).

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

- As sementes da leguminosa *C. brasiliensis* apresentam uma nova lectina, denominada ConBr II, formada por duas subunidades, glicosilada, dependente de Mg^{2+} para estabilização de sua estrutura e específica para manose, frutose e maltose;
- As lectinas ConBr e ConBr II solubilizam melhor em pH básicos; foram sensíveis a temperaturas acima de 70 °C por exposição por 10 minutos, à ureia e ao metaperiodato de sódio. A atividade específica de ConBr foi reduzida na presença de β -mercaptoetanol e a de ConBr II, aumentada.
- ConBr II não apresenta atividade antibacteriana contra as cepas *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*. Tem efeito antiinflamatório através da redução da permeabilidade dos vasos sanguíneos e da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal dos camundongos e não é tóxica para os mesmos.
- O efeito antiinflamatório de ConBr II mostra a possibilidade de seu uso no desenvolvimento de novas drogas que possam ser utilizadas no tratamento do processo inflamatório.
- O desafio agora é identificar outras atividades biológicas para esta proteína, realizar o seu sequenciamento e estudar a sua estrutura tridimensional para que a partir daí seja possível entender o seu mecanismo de ação.

REFERÊNCIAS

- ADENIRAN, O. A.; KUKU, A.; OBUOTOR, M. E.; AGBOOLA, F. K.; FAMUREWA, A. J.; OSASAN, S. Purification, characterization and toxicity of a mannose-binding lectin from the seeds of *Treculia africana* plant. **Toxicological and Environ Chemistry**, v. 91, n.7, p. 1361-1374, 2009.
- ALENCAR, N. M. N. ASSREUY; A. M. S. ALENCAR; V. B. M. MELO; S. C. RAMOS, M. V.; CAVADA, B. S. CUNHA, F. Q. RIBEIRO, R. A. The galactose-binding lectin from *Vatairea macrocarpa* seeds induces in vivo neutrophil migration by indirect mechanism. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, n. 35, p. 1674–1681, 2003.
- ARAÚJO, F. F. Inoculação de sementes com *Bacillus subtilis*, formulado com farinha de ostras e desenvolvimento de milho, soja e algodão. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 2, p. 456-462, 2008.
- ASSREUY, A. M. S.; SHIBUYA, M. D.; MARTINS, G. J.; SOUZA, M. L. P.; CAVADA, B. S.; MOREIRA, R. A.; OLIVEIRA, J. T. A.; RIBEIRO, R. A.; FLORES, C. A. C. A. Anti-inflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from Brazilian beans. **Mediators of Inflammation**, n. 6, p. 201-210, 1997.
- AYAMARD, G.A.; N. CUELLO. Catálogo y adiciones a las especies neotropicales del género *Canavalia* (Leguminosae – Phaseolae – Diocleinae). Em: Seminário taller Del trabajo internacional sobre Canavalia. Universidad Central, Caracas Venezuela. Maracay-Venezuela, 1991.
- 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.
- BARBERI, A.; CARNEIRO, M.A.C.; MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. Nodulação em leguminosas florestais em viveiros no sul de Minas Gerais. **Cerne**, v. 4, n. 1, p. 145-153, 1998.
- BARBOSA, T.; ARRUDA, S.; CAVADA, B.; GRANJEIRO, T.B.; FREITAS, L.A.R.; BARRAL-NETTO, M. In vivo lymphocyte activation and apoptosis by lectins of the Diocleinae subtribe. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.96, p.673-678, 2001.
- BASILE-FILHO, A.; CUNHA, F.Q.; TAVARES-MURTA, B. M.; MARTINS, M. A.; ARRAES, S. M. A. A. Falência de Migração de Neutrófilos e Dosagem Sérica de Citocinas e Óxido Sérica de Citocinas e Óxido Nítrico na Sepse Humana. **Revista Brasileira Terapia Intensiva**, v. 14, n. 14, p. 146-155, 2002.

BATISTA, F.A.H. **Isolamento e caracterização da lectina camposemina extraída das sementes de *Camposema 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.

BERG, J.M.; TYMOCZKO, J.L.; STRYER, L. **Biochemistry**. 5th ed. W.H. Freeman and Company., 2004. 514p.

BIROC, S. L.; ETZLER, M. E. The effect of periodate oxidation and α -mannosidase treatment of *Dolichos biflorus* lectin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 544, n. 1, p. 85-92, 1978.

BITENCOURT, F.S. **Estudo da atividade antiinflamatória e antinociceptiva da lectina isolada da alga marinha vermelha *Hypnea cervicornis* (J. Agardh)**. 2007. 141f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2007.

BORGES, J.C.M. **Acetilbergenina: obtenção e avaliação das atividades antinociceptiva e anti-inflamatória**. 2010. 122f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará, Belém, 2010.

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

BRADFORD, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRANDO-LIMA, A. C.; SALDANHA-GAMA, R. F.; HENRIQUES, M. G. M. O.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O.; MOREIRA, R. A.; BARJA-FIDALGO, C. Frutalin, a galactose-binding lectin, induces chemotaxis and rearrangement of actin cytoskeleton in human neutrophils: Involvement of tyrosine kinase and phosphoinositide 3-kinase. **Toxicology and Applied Pharmacology**. n. 208, p. 145-154, 2005.

BRINDA K.V.; SUROLIA, A.; VISHVESHWARA, S. Insights into the quaternary association of proteins through structure graphs: a case study of lectins. **Biochemical Journal**, v.1, n. 391, p. 1-15, Oct. 2005.

CAJAZEIRAS, J.B. **Espermadesinas caprinas (bodesinas): Produção em sistema bacteriano**. 2009. 95f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2009.

CALVETE, J.J.; THOLE, H.H.; RAID, M.; URBANKE, C.; ROMERO, A.; GRANGEIRO, T.B.; RAMOS, M.V.; ROCHA, I.M.A, GUIMARÃES; F.N., CAVADA, B.S. Molecular characterization and crystallization of Diocleinae lectins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1430, p. 367-375, 1999.

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> Acesso em 07 ago. 2011.

CARVALHO, R.A. **Análise do mecanismo de ação de lasers de baixa potência, na região do visível-vermelho, em inflamação aguda induzida por carragenina**. 2006. Tese. 92f. (Doutorado em Engenharia Biomédica) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica. Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2006.

CAVADA, B. S.; RAMOS, M. V.; CORDEIRO, E. F.; GRANGEIRO, T. B.; OLIVEIRA, J.; 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, B.S.; VIEIRA, C.C.; SILVA, L.M.A.; OLIVEIRA, J.T.A.; MOREIRA, R.A. Comportamento da lectina de sementes de *Canavalia brasiliensis* Mart. Durante a germinação em presença de luz. **Acta Botanica Brasilica**, v. 4, n. 2, p. 13, 1990.

CAVADA, B.S.; GRANGEIRO, T.B.; RAMOS, M.V.; CORDEIRO, E.F.; OLIVEIRA, J.T.A.; MOREIRA, R.A. Isolation and partial characterization of a lectin from *Dioclea rostrata* Benth seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 8, n.1, p. 31-36, 1996.

CAVALCANTE, T. T. A.; ROCHA, B.A.M.; CARNEIRO, V.A.; ARRUDA, F.V.S.; NASCIMENTO, A.S.F.; SÁ, N.C.; NASCIMENTO, K.S.; CAVADA, B.S.; TEIXEIRA, E.H. Effect of lectins from Diocleinae subtribe against oral Streptococci. **Molecules**, v. 16, n. 5, p. 3530-3543, 2011.

CHAO, L. XI, Z.; XIAO-CHAO, X.; LING-RUI, L.; YAN-HONG, L.; SHAO-DONG, Z.; JIN-KU, B. Hemagglutinating activity and conformation of a lactose-binding lectin from mushroom *Agrocybe cylindracea*. **International Journal of Biological Macromolecules**, n. 42, p.138–144, 2008.

CHAPOT, M.P.; PEUMANS, W.J.; STROSBURG, A.D. Extensive homologies between lectins from non-leguminous Plants. **Elsevier Science Publishers B. V. (Biomedical Division)**, v. 195, n.1, 2, p. 231-234, Jan. 1986.

CHEVREUIL, L. R.; PANDO, C.S.; JUNIOR, A.R.N; BARIANI, A.; GONÇALVES, J.F.C.; 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.

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.

CLAMP, J. R.; HOUGH, L. Some observations on the periodate oxidation of amino compounds. **Biochemical Journal**, v. 101, n. 1, p. 120-126, 1966.

COELHO, M.B. **Isolamento e caracterização de uma lectina de sementes de *Annona coriacea* e seu efeito sobre os insetos *Callosobruchus maculatus* e *Anagasta kuehniella***. 2002. 111f. Dissertação (Mestrado em Biologia Funcional e Molecular) - Programa de Pós-Graduação em Biologia Funcional e Molecular, Campinas, 2002.

COELHO, M. B. SOUZA; I. A. FREIRE, M. G. M.; MARANGONIA, S.; ANTUNES, E.; MACEDO, M. L. R. Neutrophil migration in mice induced by a mannose-binding lectin isolated from *Annona coriacea* seeds. **Toxicon**, n. 48, p. 529–535, 2006.

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.

DELATORRE, P; ROCHA, B.A.M; SOUZA, E.P; OLIVEIRA, T.M; BEZERRA; G.A.; MORENO, F.B.M.B.; FREITAS, B.T.; SANTI-GADELHA, T; SAMPAIO, A.H.; AZEVEDO JR, W.F.; CAVADA, B.S. Structure of a lectin from *Canavalia gladiata* seeds: new structural insights for old molecules. **BMC Structural Biology**, London, v.7, n. 52, 2007. Disponível em <<http://www.biomedcentral.com/1472-6807/7/52>>. Acesso em 07 ago. 2011.

DHUNA, V.; BAINS, J.S.; KAMBOJ, S.S.; SINGH, J.; SHANMUGAVE & SAXENA, A.K. Purification and Characterization of a Lectin from *Arisaema tortuosum* Schott Having in-vitro Anticancer Activity against Human Cancer Cell Lines. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, n. 5, p. 526-532, Sep. 2005.

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

DRESH, R.R. **Purificação e caracterização das lectinas ACL-I e ACL-II da esponja marinha *Axinella corrugata*, imunolocalização da ACL-I e avaliação do seu potencial como marcador de transformação celular**. 2008. 252f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

DUBOIS, M; GILLES, K.A; HAMILTON, J. K; REBERS, P.A; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

DUBOIS, B.; PEUMANS W.J.; VAN DAMME E.J.; VAN DAMME J.; OPDENAKKER, G. Regulation of gelatinase B (MMP-9) in leukocytes by plants lectins. **FEBS Letters**, v. 427, p. 275-278, 1998.

DUNBAR, B. S. **Two dimensional electrophoresis and immunological techniques Plenum Publishing Corporation**. New York, 371 p. il. (Appendix 11 - Antibody Preparation, Detection and Characterization Techniques, p. 303-315, 1987.

ETZLE, M.; MACMILLAN, S.; CATES, S.; GIBSON, D.M.; JAMES, D.W.; COLE, D.; THAYER, S. Subcellular localization of two *Dolichos biflorus* lectins. **Plant Physiology**, v. 76, p. 871-878, 1984.

FERNANDES, D.C. **Avaliação da lectina de *Canavalia maritima* Thours, em evento vascular da inflamação aguda**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas. Universidade Estadual da Paraíba, Fortaleza, 2008.

FERREIRA, A. P.; CORREA, T.; CUNHA, R.; MARQUES, M.J.; MONTESANO, M.A.; SOUZA, M.A.; TEIXEIRA, H.C. Human serum antibody reactivity towards *Paracoccidioides brasiliensis* antigens treated with sodium metaperiodate. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 4, p. 325-329, 2008.

FIGUEIREDO, J.G.; BITENCOURT, F.S.; MOTA, M.R.; SILVESTRE, P.P.; AGUIAR, C. N.; BENEVIDES, R. G.; NASCIMENTO, K.S.; MOURA, T.R.; DAL-SECCO, D.; ASSREUY, A.M.S.; CUNHA, F.Q.; VALE, M.R.; CAVADA, B.S.; Alencar, N. Pharmacological analysis of the neutrophil migration induced by *D. rostrata* lectin: Involvement of cytokines and nitric oxide. **Toxicon**, v. 54, n. 6, 736-744. 2009.

FIGUEIREDO, J.G.; BITENCOURT, F.S.; BEZERRA, I.G.; TEIXEIRA, C.S.; BASTOS LUZ, P.; BEZERRA, E.H.S.; MOTA, M.R.L.; ASSREUY, A.M.S.; CUNHA, F.Q.; CAVADA, B.S. Antinociceptive activity and toxicology of the lectin from *Canavalia boliviana* seeds in mice. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 380, n. 5, p. 407-414, 2009.

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, M.G.M.; GOMES, V.M.; CORSINI, R.E.; MACHADO, O.L.T.; SIMONE, S.G.; NOVELLO, J.C.; MARANGONI, S.; MACEDO, M.L.R. Isolation and partial

characterization of a lectin from *Talisia sculenta* seeds that interferes with fungal growth. **Plant Physiology Biochemistry**, v. 40, p. 61-68, 2002.

GAIDAMASHVILI, M.; STADEN, J. V. Interaction of lectin-like proteins of South African medicinal plants with *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 80, p. 131-135, 2002.

GRANGEIRO, T.B.; SCHRIEFER, A.; CALVETE, J.J.; RAIDA, 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.

GUEDES, R.S.; QUIRINO, Z.G.M; GONÇALVES, E.P. Fenologia reprodutiva e biologia da polinização de *Canavalia brasiliensis* Mart. ex Benth (Fabaceae). **Biotemas**, v. 22, n. 1, p. 27-37, mar. 2009.

HAJTÓ, T.; HOSTANSKA, K.; BERKI, T.; PÁLINKÁS, L.; BOLDIZSÁR, F.; NÉMETH, P. 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.

KABIR, S. R.; ZUBAIR, M. A.; NURUJJAMAN, M.; HAQUE, M. A.; HASAN, I.; ISLAM, M. F.; HOSSAIN, M. T.; HOSSAIN, M. A.; RAKIB, M. A.; ALAM, M. T.; SHAHA, R. K.; HOSSAIN, M. T.; KIMURA, Y.; ABSAR, N. Purification and characterization of a Ca²⁺-dependent novel lectin from *Nymphaea nouchali* tuber with antiproliferative activities. **Bioscience Reports**, v. 31, n. 6, p. 465-75, 2011.

KASSAB, B.H. **Purificação e caracterização parcial de uma lectina do veneno da Serpente *Bothrops moojeni***. 2009. 78f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de São Paulo, Campinas. 2009.

KATRE, U. V. SURESH, C.G. KHAN, M. I. GAIKWAD, S. M. Structure–activity relationship of a hemagglutinin from *Moringa oleifera* seeds. **International Journal of Biological Macromolecules**, n. 42, p. 203–207, 2008.

KAWSAR, S.M.A; MAMUM, S.M.A.; RAHMAN, M. S.; YASUMITSU, H.; OZEKI, Y. *In Vitro* Antibacterial and Antifungal Effects of a 30 kDa D-Galactoside-Specific Lectin from the Demosponge, *Halichondria okadai*. **International Journal of Biological and Life Sciences**, v. 6, n. 1, 2010.

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

KUKU, A.; ODEKANYIN, O.; ADENIRAN, K.; ADEWUSI, M.; OLONADE, T. Purification of a mannose/glucose – specific lectin with antifungal activity from pepper seeds (*Capsicum annuum*). **African Journal of Biochemistry Research**, v.3, n.6, p.272-278, Jun. 2009.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage t₄. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LAIJA, S.N.; MAHESH, S.; SMITHA, L.S.; REMANI, P. Isolation and Partial Characterization of Two Plant Lectins. **Current Research Journal of Biological Sciences**, v. 2, n. 4, p. 232-237, 2010.

LEITE, M.C.A.; **Caracterização nutricional e atividade biológica de folhas orgânicas de cenoura (*Daucus carota* L.)**. 2010. 112f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Nutrição) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2010.

LEITE, J. F. M.; ASSREUY, A. M. S.; MOTA, M. R. L.; BRINGEL, P. H. D. S. F.; GOMES, V. D. M.; CAJAZEIRAS, J. B.; NASCIMENTO, K.S.; PESSOA, H.L.F.; GADELHA, C.A.A.; DELATORRE, P.; CAVADA, B.S.; SANTI-GADELHA, T. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of a lectin-like substance from *Clitoria fairchildiana* R. Howard seeds. **Molecules**, v. 17, n. 3, p. 3277-3290, 2012.

LEWIS, G.; SCHRIRE, B.; MACKINDER, B.; LOCK, M. **Legumes of the world**. Kew, Royal Botanic Gardens. 2005, 577p.

LIAO, W.-R.; LIN, J.-Y.; SHIEH, W.Y; HUANG, W.L.J.R. Antibiotic activity of lectins from marine algae against marine vibrios. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 433-439, 2003.

LIMA, M.S.; ALBUQUERQUE, D.A.; IBAÑEZ, O.M; SANT'ANNA, O. Inflammatory cutaneous reaction induced by lectin of *Dioclea grandiflora* (Mart.). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 88, n. 4, p. 599-603, Oct/Dec. 1993.

LIS, H.; SHARON, N. Lectins: Carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. **Chemicals Reviews**, v. 98, n. 2, p. 637-674, 1998.

LOPES, F.C.; CAVADA, B.S.; PINTO, V.P.T.; SAMPAIO, A.H.; GOMES, J.C. Differential effect of plant lectins on mast cells of different origins. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 6, p. 935-941, 2005.

LORIS, R.; HAMELRYCK, T.; BOUCKAERT, J.; WYNS, L. Legume lectin structure. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1383, n. 1. p. 9-33, 1998.

MANFRO, G. G.; NETTO, C.A.; POLLACK, M.; MEZZOMO, K. M.; PREFFER, F.; KRADIN, R. Stress regulates the lymphocyte homing receptor CD62L (L-selectin). **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 61, n.1, 20-24. 2003.

MARTÍNEZ-CRUZ, M; ZENTENO, E.; CÓRDOBA, F. Purification and characterization of a galactose-specific lectin from corn (*Zea mays*) coleoptyle. **Biochimica et Biophysica Acta (G). General subjects**, v. 1568, n. 1, p. 37-44, 2001.

MATOS, A.B.M.; ARTELES, G.R.; VALDÉZ, L.H. & OLIVER, P. H. Revisión Taxonómica del Género *Canavalia* D.C. (Leguminosae-Papilionoideae) en Cuba. **Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales**, v. 28, n. 107, Jun. 2004.

MELGAREJO, L.M.; VEGA, N.; PÉREZ, G. Isolation and characterization of novel lectins from *Canavalia ensiformis* and *Dioclea grandiflora* Mart. ex Benth. Seeds. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 17, n. 3, p. 315-324, 2005.

MELO-JÚNIOR, M.R.; CAVALCANTI, C.L.B.; PONTES-FILHO, N.T.; CARVALHO JR, L.B.; BELTRÃO, E.I.C. Lectin staining patterns in human gastric mucosae with and without exposure to *Helicobacter pylori*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 238-240, 2008.

MIOTTO, S.T.S.; LUDTKE, R. & OLIVEIRA, M.L.A.A. A família Leguminosae no Parque Estadual de Itapuã, Viamão, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 6, n. 3, p. 269-290, jul/set. 2008.

MONTEIRO, A.C.O; MUNIZ-FILHO, W.E.; HORTA, A.C.G.; BELTRAMINI, L.M.; MOREIRA, R.A. Isolation and partial characterization of a lectin from *Canavalia dictyota* seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 10, n. 3, p. 167-172, 1998.

MOREIRA, R. A.; AINOUS, I.L.; DE OLIVEIRA, J.T.A; CAVADA, B.S.C. Plant Lectins, Chemical and Biological Aspects. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, p. 211-218, 1991.

MOREIRA, R. A.; CORDEIRO, E. F.; CAVADA, B. S.; NUNES, E. P.; FERNANDES, A. G.; OLIVEIRA, J. T. A. Plant seed lectins. A possible marker for chemotaxonomy of the genus *Canavalia*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 5, n. 2, p. 127-340, 1993.

MOREIRA, R.A.; CORDEIRO, E.F.; RAMOS, M.V.; GRANGEIRO, T.B.; MARTINS, J.L.; OLIVEIRA, J.T.A.O.; CAVADA, B.S. Isolation and partial characterization of a lectin from seeds of *Dioclea violacea*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 8, n.1, p. 23-29, 1996

MOREIRA, R.A.; BARROS, A.C.H.; STEWART, J.C.; PUSZTAI, A. Isolation and characterization of a lectin from the seeds of *Dioclea grandiflora* (Mart.). **Planta**, n. 158, p. 63-69, 1983.

MOREIRA, R.A.; CORDEIRO, E.F.; CAVADA, B.S.; NUNES, E.P.; FERNANDES, A.G.; OLIVEIRA, J.T.A. Lectins and the chemotaxonomy of the Sub-tribe *Diocleinae* (*leguminosae-phaseoleae*). **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 7, n. 1, p. 7-14, 1995.

MOREIRA, R.A.; CORDEIRO, E.F.; RAMOS, M.V.; GRANJEIRO, T.B.; MARTINS, J.L.; OLIVEIRA, J.T.A.; CAVADA, B.S. Isolation and partial characterization of a lectin from *Dioclea rostrata* Benth seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 8, p. 31-36, 1996.

MORENO, F. B. M. B. **Estudos estruturais de uma lectina presente em sementes de *Lotus tetragonolobus***. 2008. 126f. Tese (Doutorado em Biofísica Molecular) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho, São José do Rio Preto, 2008.

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.

NAGANO, C.S.; CALVETE, J.J.; BARETTINO, D.; PÉREZ, A.; CAVADA, B.S. & SANZ, L. Insights into the structural basis of the pH-dependent dimer–tetramer equilibrium through crystallographic analysis of recombinant *Diocleinae* lectins. **Biochemical Journal**, v. 409, p. 417- 428, 2008.

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.

NUNES, S.B.; RENSONNET, N.S.; DAL-SECCO, D.; VIEIRA, S.M., CAVADA, B.S.; TEIXEIRA, E.H.; MOURA, T.R., TEIXEIRA, C.S.; CLEMENTE-NAPIMOGA, J.T.; CUNHA, F.Q.; NAPIMOGA, M.H. Lectin extracted from *Canavalia grandiflora* seeds presents potential anti-inflammatory and analgesic effects. **Naunyn-Schmied Arch Pharmacol**, n. 369, p. 609-616, 2009.

OESTERHELT, H.B. Disregulation of bacterial proteolytic machinery by a new class of antibiotics. **Nature Medicine**, v. 11, n. 10, p. 1082-1087, 2005.

OLIVEIRA, J.T.A.; CAVADA, B.S.; MARTINS, J.L.; JARENKOW, J.A.; VASCONCELOS, I.M.; MOREIRA, R.A. Lectinas de sementes como marcadores taxonômicos da tribo *Diocleae*. **Acta Botânica Brasileira**, v.4, n. 2, 1990.

OLIVEIRA, M.R.T.R.; NAPIMOGA, M.H., COGO, K; GONÇALVES, R.B.; MACEDO, M.R.L., FREIRE, M.G.M. & GROppo, F.C. Inhibition of bacterial adherence to saliva-coated through plant lectins. **Journal Oral Science**, v. 29, n.2, p. 141-145, Apr. 2007.

PAIVA, P.M.G.; GOMES, F.S.; NAPOLEÃO, T.H.; SÁ, R.A.; CORREIA, M.T.S.; 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.

PANÉS, J.; PERRY, M.; GRANGER, D.N. Leukocyte-endothelial cell adhesion: avenues for therapeutic intervention. **British journal of pharmacology**, v. 126, n. 3, p. 537-550, 1999.

PAJIC, I.; KLJAJIC, Z.; DOGOVIC., N.; SLADIC, D.; JURANIC, Z.; GASIC, M.J.; A novel lectin from the sponge *Haliclona crater*: isolation, characterization and biological activity. **Comparative Biochemistry and Phisiology Part C**, v. 132, p. 213-221, 2002.

PARIJS, J. V.; BROEKAERT, W. F.; GOLDSTEIN, I. J. & PEUMANS, W. J. Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. **Planta**, v.183, p. 258-264, Jul. 1990.

PARIJS, J.V.; BROEKAERT, W.F.; GOLDSTEIN, I.J.; PEUMANS, J.W. Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) látex. **Planta**, v. 183, p. 258-264, 1991.

PEDROSO, M.M. **Estudo da interação lectina-carboidrato por meio da técnica de microbalança de cristal de quartzo**. 2006. 112f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, 2006.

PEREZ, G., HERNANDEZ, M., MORA. E. Isolation and characterization of a lectin from the seeds of *Dioclea lehmanni*. **Phytochemistry**, v. 29, p. 1745-1749.

PÉREZ, G. Isolation and characterization of a novel lectin from *Dioclea lehmani* (Fabaceae) seeds. **The Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 30, n. 7, p. 843-853, 1997.

PEUMANS, W.J. & VAN DAMME, E.J.M. Lectins as Plant Defense Proteins. **Plant Phisiology**, n. 109, p. 347-352, 1995.

PIRES, A.F. **Atividade Antinoniceptiva de uma lectina de sementes de *Canavalia brasiliensis*** MART. 2007. 119f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2007.

PIRES, A.F. Atividade Antinociceptiva de uma Lectina: proliferation and proliferative cytokine secretion. **Cell Tissue Research**, v. 346, p. 237-244, 2011.

RAMOS, M.V.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, J.T.A.; CAVADA, B.S; ROUGÉ, P. The Carbohydrate binding Specificity and Molecular Modelling of *Canavalia maritima* and *Dioclea grandiflora* Lectins. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 26, p. 761-766, 1996.

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

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F. & EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 856p.

RODRIGUES, T.M.; MACHADO, S.R. Anatomia comparada do pulvino primário de leguminosas com diferentes velocidades de movimento foliar. **Phytochemistry**, v. 29, n. 4, p. 709-720, out./dez. 2006.

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.

SANTOS, A.F.S. **Moléculas Bioativas de *Moringa oleifera*: Detecção, Isolamento e Caracterização**. 2007. 129f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife. Fev. 2007.

SANTOS, A. F. S. LUZ, L. A. ARGOLO, A. C. C. TEIXEIRA, J. A. PAIVA, P. M. G. COELHO, L. C. B. B. Isolation of a seed coagulant *Moringa oleifera* lectin. **Process Biochemistry**, n. 44, p. 504–508, 2009.

SANZ-APARICIO, J.; HERMOSO, J.; GRANGEIRO, T.B.; CALVETE, J.J.; CAVADA, B.C. The crystal structure of *Canavalia brasiliensis* lectin suggests a correlation between its quaternary conformation and its distinct biological properties from Concanavalin A. **FEBS Letters**, v. 405, n. 1, p. 114-118, 1997.

SANTI-GADELHA, T; GADELHA, C. A. A; ARAGÃO, K. S; OLIVEIRA, C. C; MOTA, M. R. L; GOMES, R. C; PIRES, A. F; TOYAMA, M. H; O, TOYAMA, D; ALENCAR, N. M. N; ASSREUY, A. M. S; CAVADA, B. S. Purification and biological effects of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) seed lectin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 350, p. 1050-1055, 2006.

SCHRODER, H. C; Schröder, H.C.; Ushijima, H.; Krasko, A.; Gamulin, V.; Thakur, N.L.; Diehl-Seifert, B. Emergence and disappearance of an immune molecule, an antimicrobial lectin, in basal metazoa. A tachylectin-related protein in the sponge *Suberites domuncula*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 35, p. 32810-32817, 2003.

SELL, A.M; COSTA, C.P. Atividades biológicas das lectinas PHA, WGA, jacalina e artocarpina. **Acta Scientiarum**, v. 22, n. 2, p. 297-203, 2000.

SHARON, N.; HALINA, L. Lectins: Cell-Agglutinating and Sugar-Specific proteins. **Science**, v. 177, n. 4053, Sep 1972.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glicobiology**, v. 14, n. 4, 2004.

SHARON, N. Lectins: Carbohydrate-specific Reagents and Biological Recognition Molecules. **The Journal of biological chemistry**, v. 282, n. 5, p. 2753–2764, Feb, 2007.

SHARON, N.; LIS, H. **Lectins**. Disponível em: <
http://books.google.ca/books?id=7Ffvxcwmc2QC&printsec=frontcover&hl=ptBR&source=gb_s_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false> Acesso em 11 ago. 2012.

SITOHY, M.; DOHEIM, M.; BADR, H. Isolation and characterization of a lectin with antifungal activity from Egyptian *Pisum sativum* seeds. **Food chemistry**, v. 104, n. 3, p. 971-979, 2007.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. Botânica sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. **Plantarum**, Nova Odessa. 2005.

SWANSON, M.D.; WINTER, C.H.; GOLDENSTEIN, I.J.; MARKOVITZ, D.M. A lectin isolated from bananas is a potent inhibitor of HIV replication. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 12, p. 8646-8655, 2010.

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.

SILVA, F.O; ARAÚJO, R.V.S; SCHIRATO, G.V; TEIXEIRA, E.H; JÚNIOR, M.R.M; CAVADA, B.S.; LIMA-FILHO, J.L; CARNEIRO-LEÃO, A.M.A, PORTO, A.L.F. Perfil de proteases de lesões cutâneas experimentais em camundongos tratadas com a lectina isolada das sementes de *Canavalia brasiliensis*. **Ciência Rural**, v. 39, n. 6, p. 1808-1814, set. 2009.

SILVA, F.O.; SANTOS, P.N.; MELO, C.M.L.; TEIXEIRA, E.H.; CAVADA, B.S.; PEREIRA, V.A.R.; PORTO, A.L.F.; CAJAZEIRAS, J.B.; ARRUDA, F.V.S.; ALMEIDA, A.C. Immunostimulatory activity of ConBr: a focus on splenocyte proliferation and proliferative cytokine secretion. **Cell and Tissue Research**, n. 346, v. 2, p. 237-244, 2011.

SOUZA, G.E. & FERREIRA, S.H. Blockade by antimacrophage serum of the migration of PMN neutrophils into the inflamed peritoneal cavity. **Agents Actions**, 17:97–103, 1985.

THURSTON, G.; SURI, C.; SMITH, K.; MCCLAIN, J.; SATO, T. N. YANCOPOULOS, G. D.; MCDONALD, D. M. Leakage-Resistant Blood Vessels in Mice Transgenically Overexpressing Angiopoietin-1. **Science**, v. 286, 1999.

TOLEDO, K. A.; SCWARTZ, C.; OLIVEIRA, A. F.; CONRADO, M. C. A. V.; BERNARDES, E. S.; FERNANDES, L. C.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; PEREIRA-DASILVA, G.; MORENO, A. N. Neutrophil activation induced by ArtinM: Release of inflammatory mediators and enhancement of effector functions. **Immunology Letters**, n. 123, p. 14–20, 2009.

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, São Carlos, 2005.

TROPICAL FORAGES. ***Canavalia brasiliensis***. Disponível em <http://www.tropicalforages.info/key/Forages/Media/Html/Canavalia_brasiliensis.htm> Acesso em 30 jun 2012.

VACARI, F.C.M. **Cristalização e resolução de estrutura das proteínas *Canavalia gladiata* lectin (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, 2010.

VACARI, F.C.M. **Cristalização e resolução de estrutura das proteínas *Canavalia gladiata* lectin (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, 2010.

VAN DAMME, E.J.M; PEUMANS, W.J; BARRE, A; ROUGÉ, P. Plant lectin: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 17, n. 6, p. 575-692, 1998.

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

VAN DAMME, E.J.M; BRIKÉ, F.; WINTER, H.C.; VAN LEUVEN, F.; GOLDENSTEIN, I.J.; PEUMANS, W.J. Molecular cloning of two different mannose-binding lectins from tulip bulbs. **European Journal of Biochemistry**, n. 236, p. 419-427, 1996.

VAN LEUVEN, F.; TORREKENS, S.; VAN DAMME, E.; PEUMANS, W.; VAN DENBERGHE, H. Mannose-specific lectins bind alpha-2-macroglobulin and an unknown protein from human plasma. **Protein Science**, v. 2, n.2, p.255–263, 1993.

VASCONCELOS, M.A.; CUNHA, C.O.; ARRUDA, F.V.S.; CARNEIRO, V.A.; MERCANTE, F.M.; NETO, L.G.N.; SOUSA, G.S.; ROCHA, B.A.M.; TEIXEIRA, E.H.;

CAVADA, B.S.; SANTOS, R.P. Lectin from *Canavalia brasiliensis* Seeds (ConBr) Is a Valuable Biotechnological Tool to Stimulate the Growth of *Rhizobium tropici* in Vitro. **Molecules**, v. 17, p. 5244-5254, 2012.

VASCONCELOS, S.M.M.; LIMA, S.R.; SOARES, P.M.; ASSREUY, A.M.S.; SOUSA, F.C.F.; LOBATO, R.F.G.L.; VASCONCELOS, G.S., SANTI-GADELHA, T.; BEZERRA, E.H.S.; CAVADA, B.S. & PATROCÍNIO, M.C.A. Central action of *Araucaria angustifolia* seed lectin in mice. **Epilepsy & Behavior**, v. 15, p. 291-293, 2009.

VILLANUEVA, A.C; ABDULLAEV, F. Lectinas vegetales y sus efectos en el cáncer. **Revista de Investigación Clínica**. v. 57, n.1, p. 55-64, 2005.

WOESE, C.R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M.L. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 87. p. 4576-4579, Jun 1990.

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

YAO, Q. WU¹, C. F. LUO, P. XIANG, X. C. LIU, J. J. MOU, L. BAO, J. K. A new chitin-binding lectin from rhizome of *Setcreasea purpurea* with antifungal, antiviral and apoptosis-inducing activities. **Process Biochemistry**, n. 45, p. 1477–1485, 2010.

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.

ZHU-SALZMAN, K. HAMMENB, P. K. SALZMAN, R. A. KOIWAD, H. BRESSAND, R. A. MURDOCKE, L. L. HASEGAWAD, P. M. Calcium modulates protease resistance and carbohydrate binding of a plant defense legume lectin, *Griffonia simplicifolia* lectin II (GSII). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 132, p. 327–334, 2002.

ANEXOS