



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



**DANIEL LIMA DE FARIAS**

**ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE UMA NOVA**  
**LECTINA DE SEMENTES DE FEIJÃO DA PRAIA (*Canavalia maritima*).**

**JOÃO PESSOA - PB**

**2013**

**DANIEL LIMA DE FARIAS**

**ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE UMA NOVA  
LECTINA DE SEMENTES DE FEIJÃO DA PRAIA (*Canavalia maritima*).**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Biologia Celular e Molecular como requisito para obtenção do título de Mestre em Biologia Molecular e Celular, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM), do Centro de Ciências Exatas da Natureza, da Universidade Federal da Paraíba.

**Orientador:** Prof. Dr. Carlos Alberto de Almeida Gadelha.

**JOÃO PESSOA - PB**

**2013**

**DANIEL LIMA DE FARIAS**

Dissertação \_\_\_\_\_ em \_\_\_\_/\_\_\_\_/2013.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Carlos Alberto de Almeida Gadelha  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular  
Universidade Federal da Paraíba  
Coordenador da Banca (Orientador)

---

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

---

Prof. Dr. Francisco de Assis Leone  
Programa de Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Imunologia da FMRP  
Universidade de São Paulo  
Examinador Externo Titular

---

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

---

Profa. Dra. Daniela Pereira Garçon  
Professora Titular do Departamento de Biologia Molecular  
Universidade Federal da Paraíba  
Examinadora Externa Suplente

Dedico ao meu “Deus”, meus pais e irmãos.

Ao meu padrinho Pe. Cícero Romão Batista.

Assim como a futura mãe dos meus filhos Sayane.

A toda minha família, amigos, professores e orientadores que me apoiaram todo o tempo.

“As raízes do estudo são amargas,  
mas seus frutos são doces.” (Aristóteles)

“Pois será como a árvore plantada junto a  
ribeiros de águas,  
a qual dá o seu fruto no seu tempo; as suas  
folhas não cairão,  
e tudo quanto fizer prosperará.” (Salmos 1:3)

“Ser FELIZ não é ter uma vida perfeita,  
mas deixar de ser vítima dos problemas  
e tornar o autor da própria história.”  
(Abraham Lincoln)

“Sou um homem muito FELIZ...  
(Daniel Lima de Farias).

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço ao meu Deus porque é fiel e justo. Pois nada acontece se não for de sua vontade. Pois justos e verdadeiros são os teus caminhos. E com Ele encontrei o meu caminho.

Com carinho muito especial agradeço ao meu professor orientador dessa Universidade: o Prof. Dr. Carlos Gadelha pela orientação, pelo pronto apoio, pela paciência, pelo companheirismo e amizade. Mas, acima de tudo, por ter me mostrado que sempre é tempo de acreditar, lutar e conseguir, pois mesmo com problemas conseguimos fazer um belo trabalho.

Com muito amor, o que não basta, e nem sei como agradecer... à futura esposa e mãe dos meus filhos, Sayane Marlla. Por sempre ter estado ao meu lado, discutindo, pesquisando, aconselhando, aguentando meus abusos. Obrigado! Te amo e amarei eternamente, pois és minha escolha!

Aos meus pais, Sr. Sancho e Dona Beta Rufino, por todo amor incondicional, preocupação e zelo em minhas noites em claro, e principalmente por tudo que fizeram e fazem por mim! São meus ídolos em bondade e humildade... e hoje sou o reflexo de vossos ensinamentos. Dou minha vida por vocês!

Aos meus irmãos amados, as gêmeas Damiana e Daniele, e o caçula Denis, cúmplices e companheiros de sangue pra vida inteira!

À Profa Tatiane Santi Gadelha, minha amiga, pela confiança, compreensão, apoio e por todo aprendizado que adquiri durante esses anos de pesquisa em que trabalhamos juntos, meu muito obrigado por tudo, professora... até pelos puxões de orelha!

As professoras: Jozi Godoy, Hilzeth Luna e Edeltrudes de Oliveira, pela confiança, compreensão, apoio e por todo aprendizado que adquiri em atividades biológicas que trabalhamos, meu muito obrigado por tudo, professoras.

À Paula Perazzo, colega de turma e irmãzinha adotiva, muito competente e sempre disposta em ajudar. Valeu pelas arengas e pela ajuda que me deu no laboratório sempre que precisei e é claro, pela amizade, carinho e consideração para comigo. Te adoro Paulinha!

Ao meu amigo de infância e conterrâneo Rodrigo Lacerda, pela amizade e por está presente nos bons e maus momentos.

As duas magrelas, Emília e Luciana, amigas de longas datas, por tudo que fizeram e fazem por mim nestes vários anos de convivência.

Aos colegas da botânica, Itamar e Maria do Céu, pelas aulas particulares em exsiccatas e em Leguminosas. Aos colegas da EAD, Rafael, Dega, Diego e Lua, pela paciência e compreensão das minhas ausências!

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica, Genética e Radiobiologia (BioGeR Lab.) e do Laboratório de Proteômica Estrutural (LaProtE), os que estiveram presentes durante meu trabalho do mestrado e os que passaram por lá em anos anteriores, destacando: Carol, João Vitor(Jurú), Elba, Maria Clara, Andressa, Segundinho, Sâmia, Amanda, Julia, Helanne, Jota, Guilherme, Gregório(Guga), Andréa, Juarez, Whyara, Tales, Gracy, Alana, Sandro, que deixaram contribuição no meu desenvolvimento pessoal e científico.

Aos funcionários da Universidade Federal da Paraíba, em particular os do DBM, pelos auxílios digamos que extras técnicos.

Aos técnicos de laboratório do DBM, em especial João Ricardo e Maria Rita, pelas considerações pertinentes do apoio logístico do trabalho.

Aos colegas e ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, como também pela contribuição de cada professor na minha formação científica, e a secretária Ludmilla Maul por ser eficiente e prestativa sempre que requisitada.

À Coordenação de Apoio ao Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pelo apoio financeiro para o desenvolvimento científico.

Enfim agradeço a todos que, de alguma forma, direta ou indiretamente, participaram desse trabalho, o meu mais valioso OBRIGADO!

# ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE UMA NOVA LECTINA DE SEMENTES DE FEIJÃO DA PRAIA (*Canavalia maritima*).

## RESUMO

As leguminosas estão entre as plantas mais conhecidas pelas pessoas de diversas partes do mundo. Nesta família, muitas são as plantas que usamos como alimento. O gênero *Canavalia* ao qual pertence o feijão da praia, dentro da família Leguminosae, é formado por um pequeno grupo de 48 espécies. O termo 'lectina' (do latim '*legere*', que significa escolher, selecionar), representa um grupo heterogêneo de proteínas que variam amplamente em tamanho, estrutura, organização molecular, bem como na constituição de seus sítios de interação, desempenhando atividades biológicas diversas como antiinflamatórias, antifúngicas e antibióticas. As lectinas de plantas são as mais estudadas até então, embora algumas presentes em animais e microorganismos já tenham sido bem caracterizadas. O objetivo geral deste trabalho foi isolar, purificar e determinar atividades biológicas de uma nova lectina presente em sementes da leguminosa *Canavalia maritima*. Os resultados indicaram a presença de uma nova lectina com preferência em aglutinar eritrócitos nativos de coelho, purificada através de cromatografias de afinidade em Sephadex G-50 e quitina, e de exclusão molecular em sistema HPLC, respectivamente. Por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS, foi constatada a pureza e o peso molecular aproximado da nova lectina de 50 a 55 kDa. A nova lectina não promoveu hemólise em eritrócitos humanos dos tipos A, O e AB, em graus variáveis, o que reflete a sua especificidade de interação com diferentes açúcares. Com uma composição de 71,5 µg de carboidratos, a nova lectina demonstrou, pelo teste de inibição por açúcares, especificidade para os açúcares arabinose, frutose, maltose, sacarose e xilose. Por outro lado, a nova lectina, não inibiu o crescimento das linhagens bacterianas testadas, entretanto, observou-se que ela é capaz de promover a proliferação destes microorganismos. Apresentou atividade antiinflamatória, no modelo de peritonite induzido por carragenina em camundongos, reduzindo a migração dos neutrófilos no peritônio de camundongos e a permeabilidade dos vasos sanguíneos. Também produziu atividade antifúngica sobre o crescimento dos fungos *C. neoformans*, nos ensaios de crescimento das cepas, evidenciado pela determinação da CIM, onde os resultados demonstraram que não houve crescimento na presença da nova lectina.

**PALAVRAS CHAVE:** Nova Lectina, Atividades Biológicas e *Canavalia maritima*.

**ISOLATION, PURIFICATION AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF A NEW  
LECTIN FROM SEEDS OF BAYBEAN (*Canavalia maritima*).**

**ABSTRACT**

In many parts of the world leguminous plant is one of the most widely known plants previously reported. There are many different types of plants in the family leguminous used as food, in this case, the genus *Canavalia* comprises a group of some 48 species. The term lectin (derived from the latin word *legere*, meaning, among other things, to select) represent a heterogeneous group of proteins ranging from size, structure, molecular organization and constitution of interaction points as well as performing several biological activities such as anti-inflammatory, antifungal and antibiotic. Until now, the lectins of plants are one of the most studied, although some lectins in animals are well-specified. This research aim to isolate, purify and define biological activities of a new lectin present in the seeds of the *Canavalia maritima*. The results indicate the presence of a new lectin with a preference to agglutinate native erythrocytes of rabbit. These lectins were both purified in *column chromatography* of Sephadex G-50 and chitin, molecular exclusion in HPLC system, respectively. The purity and molecular weight (approximate) of the new lectin (from 50 to 55 kDa) was detected by SDS polyacrylamide gel electrophoresis. The new lectin did not cause hemolysis in human erythrocytes type A, O and AB, it reflects the interaction level of the sugars. According to sugar inhibition assays, the new lectin (content 71,5 $\mu$ g) indicates it is specific for arabinose, fructose, maltose, saccharose and xylose. On the other hand, the new lectin did not prevent the growth of tested bacterial strains, however, it is able to promote the proliferation these microorganisms. It also presented an anti-inflammatory activity as peritonitis induced by carrageenan in mice reducing the migration of neutrophils in the peritoneum of mice and permeability of the blood vessels. It also produced antifungal activity on the growth of the fungus *C. neoformans*, on its growth assay, evidenced by CIM determination, in this case, the results demonstrates no growth in the presence of the new lectin.

**KEY WORDS** – New lectin, Biological activities and *Canavalia maritima*.

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>BSA</b>	Albumina Sérica Bovina
<b>ConA</b>	Concanavalina A
<b>CIM</b>	Concentração mínima inibitória
<b>CRD</b>	Domínio reconhecedor de carboidrato
<b>e.v.</b>	Via endovenosa
<b>HLO</b>	Lectina da esponja <i>Halichondria okadai</i>
<b>HPLC</b>	Cromatografia Líquida de Alta Pressão
<b>i.p.</b>	Via intraperitoneal
<b>ConM</b>	Lectina de sementes da <i>Canavalia maritima</i>
<b>ConM II</b>	Segunda lectina de sementes da <i>Canavalia maritima</i>
<b>M</b>	Concentração de solução expressa em molaridade (mol L <sup>-1</sup> )
<b>m/v</b>	Relação massa/volume
<b>mgP/gF</b>	Miligrama de proteína por grama de farinha
<b>mM</b>	Milimolar
<b>PAGE</b>	Eletroforese em gel de poliacrilamida
<b>PHA</b>	Fitohemaglutinina de <i>Phaseolus vulgaris</i>
<b>PP1</b>	Proteína principal do floema
<b>RIP</b>	Proteína inativadora de ribossomos
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sódio
<b>TEMED</b>	N – N' – N'' – N'''- tetrametiletilnodiamina
<b>TRIS</b>	Hidroxi metil – amino metano
<b>UDA</b>	Aglutinina de <i>Urtica dioica</i>
<b>UH/mL</b>	Unidades de hemaglutinação por mililitro
<b>v/v</b>	Relação volume/volume
<b>WGA</b>	Wheat Germ Agglotinin

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA	CONTEÚDO	PG
<b>Figura 1</b>	Representação esquemática do sítio de ligação glicídica de uma lectina. Fonte: Adaptado de Kennedy e col <i>et. al.</i> 1995.	17
<b>Figura 2</b>	Distribuição Geográfica da família das leguminosas. Fonte: <a href="http://www.splink.org.br/index?lang=pt">http://www.splink.org.br/index?lang=pt</a>	19
<b>Figura 3</b>	Distribuição Geográfica da espécie <i>Canavalia maritima</i> . As cores representam os Estados brasileiros que podemos encontrar a espécie <i>Canavalia maritima</i> . Fonte: <a href="http://www.splink.org.br/index?lang=pt">http://www.splink.org.br/index?lang=pt</a>	20
<b>Figura 4</b>	Leguminosa <i>Canavalia maritima</i> ; à esquerda, foto contendo flores, ao meio, foto da planta no litoral paraibano e à direita, foto das vagens e sementes da <i>Canavalia maritima</i> . Fonte: Farias, D L, João Pessoa – PB, 2012.	23
<b>Figura 5</b>	Detalhe do sítio de ligação a carboidratos da ConM complexada com o oligossacarídeo maltose. Fonte: Fernandes, 2008.	28
<b>Figura 6</b>	Visão geral da estrutura tetramérica da lectina de sementes de <i>Canavalia maritima</i> . Nos "loops" superficiais em cada um dos monômeros podem ser vistos os sítios de ligação ao $Ca^{2+}$ (bolas verdes) e ao $Mn^{2+}$ (bolas violetas). Fonte: Fernandes, 2008.	29
<b>Figura 7</b>	Cromatografia de afinidade Sephadex G-50. Os valores obtidos das frações entre 0 e 15 correspondem ao pico não retido e os valores entre 40 e 60 correspondem ao pico retido.	44
<b>Figura 8</b>	Cromatografia de afinidade de quitina. Os valores obtidos das frações entre 0 e 10 correspondem ao pico não retido e os valores entre 35 e 45 correspondem ao pico retido.	44
<b>Figura 9</b>	Padrão cromatográfico da coluna de exclusão molecular Sephacryl S-200 HR (26 mm x 600 mm). A coluna foi equilibrada e eluída em solução de fosfato de sódio bibásico 0,05 M com NaCl 0,15 M, pH 7,2. Frações de 6 mL foram coletadas e monitoradas em 280nm.	45

<b>Figura 10</b>	Padrão eletroforético em PAGE-SDS. Padrões de massa molecular (marcador GE Healthcare/Nº 17044601). Pico retido em quitina (ConM II). Pico retido Sephadex (ConM).	50
<b>Figura 11</b>	Atividade hemolítica da ConM II (10, 100 e 1000 µg/mL) na presença de eritrócitos humanos do tipo sanguíneo A. Hemólise expressa como média ± erro padrão da média (n=3).	56
<b>Figura 12</b>	Atividade hemolítica da ConM II (10, 100 e 1000 µg/mL) na presença de eritrócitos humanos do tipo sanguíneo B. Hemólise expressa como média ± erro padrão da média (n=3).	56
<b>Figura 13</b>	Atividade hemolítica da ConM II (10, 100 e 1000 µg/mL) na presença de eritrócitos humanos do tipo sanguíneo AB. Hemólise expressa como média ± erro padrão da média (n=3).	57
<b>Figura 14</b>	Atividade hemolítica da ConM II (1000 µg/mL) na presença de eritrócitos humanos do tipo sanguíneo O. Hemólise expressa como média ± erro padrão da média (n=3).	57
<b>Figura 15</b>	Influência da ConM II na Migração de Neutrófilos.* indica significância estatística (p<0.05) comparado ao grupo salina **comparado ao grupo Cg (ANOVA, teste de Bonferroni).	59
<b>Figura 16</b>	Influência da ConM na Permeabilidade Vascular em Camundongos.* indica significância estatística (p<0.05) comparado ao grupo salina e ** comparado ao grupo Cg (ANOVA, teste de Bonferroni).	60
<b>Figura 17</b>	Influência da ConM II na Permeabilidade Vascular em Camundongos.* indica significância estatística (p<0.05) comparado ao grupo salina e ** comparado ao grupo Cg (ANOVA, teste de Bonferroni).	61

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA</b>	<b>CONTEÚDO</b>	<b>PG</b>
<b>Tabela 1</b>	Teor de lectinas de algumas sementes de espécies da família Leguminosae. Fonte: (adaptado de Freier <i>et. al.</i> 1985).	18
<b>Tabela 2</b>	Teor de proteínas solúveis e atividade hemaglutinante com a farinha de semente de <i>Canavalia maritima</i> contra eritrócitos de coelho a 3%.	46
<b>Tabela 3</b>	Efeito de carboidratos simples sobre a atividade hemaglutinante da nova lectina de ConM II (P2 quitina) frente a eritrócitos nativos de coelho a 3%.	48
<b>Tabela 4</b>	Resultados da CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) da ConM sobre <i>C. neoformans</i> , <i>C. tropicalis</i> e <i>C. albicans</i> .	51
<b>Tabela 5</b>	Resultados da CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) da ConM II sobre os fungos <i>C. neoformans</i> , <i>C. tropicalis</i> e <i>C. albicans</i> .	52
<b>Tabela 6</b>	Atividade hemolítica da ConM (1000 $\mu\text{g/mL}$ ) na presença de eritrócitos humanos dos tipos sanguíneos A, B, AB e O. Porcentagem de hemólise expressa como média $\pm$ erro padrão da média.	55
<b>Tabela 7</b>	Atividade hemolítica da ConM II (1000 $\mu\text{g/mL}$ ) na presença de eritrócitos humanos dos tipos sanguíneos A, B, AB e O. Porcentagem de hemólise expressa como média $\pm$ erro padrão da média.	55
<b>Tabela 8</b>	Efeito da ConM II sobre o peso corporal e o peso úmido dos órgãos de camundongos.	63

## SUMÁRIO

---

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	16
1.1. Conceitos de Lectina .....	16
1.2. Ocorrência das Lectinas.....	17
1.3. Lectinas de Leguminosas.....	21
1.4. Classificação das Lectinas .....	23
1.5. Especificidade por Carboidratos.....	24
1.6. Estrutura Molecular das Lectinas .....	26
1.7. Atividades Biológicas das Lectinas .....	29
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	33
2.1. Objetivo Geral .....	33
2.2. Objetivos Específicos .....	33
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	34
3.1. Preparação da Farinha das Sementes de <i>Canavalia maritima</i> .....	34
3.2. Preparo do Extrato Bruto.....	34
3.3. Obtenção e Preparo de Eletrólitos .....	34
3.4. Determinação da Atividade Hemaglutinante (AH) .....	35
3.5. Obtenção da Nova lectina da Leguminosa <i>Canavalia maritima</i> .....	35
3.6. Especificidade por Carboidrato e glicoproteínas.....	36
3.7. Eletroforese PAGE – SDS .....	37
3.8. Determinação do Teor de Proteínas Solúveis.....	37
3.9. Determinação da presença de Carboidrato .....	37
3.10. ATIVIDADES BIOLÓGICAS .....	38
3.10.1. Atividade Biológica Antifúngica.....	38
3.10.1.1. Produtos Testados .....	38
3.10.1.2. Meios de Cultura .....	38
3.10.1.3. Ensaios de Atividade Antimicrobiana. ....	38
3.10.2. Atividade Biológica Antibacteriana .....	40
3.10.3. Atividade Citotóxica.....	41
3.10.4. Atividade Antiinflamatória.....	41
3.10.4.1. Animais de Experimentação .....	41

3.10.4.2. Verificação da Atividade Antiinflamatória por meio da Migração de Neutrófilos e Permeabilidade Vascular da ConM II .....	42
<b>4. RESULTADOS E DISCURSÃO</b> .....	43
4.1. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE (AH) E DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNAS SOLÚVEIS .....	43
4.2. CROMATOGRAFIA DE EXTRATO DE SEMENTE DE <i>Canavalia maritima</i> ....	43
4.3. DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA DE CARBOIDRATO .....	46
4.4. ESPECIFICIDADE POR CARBOIDRATO E GLICOPROTEÍNA .....	47
4.5. ELETROFORESE PAGE SDS .....	49
4.5. ATIVIDADES BIOLÓGICAS .....	50
4.5.1. Atividade Biológica Antifúngica .....	51
4.5.2. Atividade Biológica Antibacteriana .....	54
4.5.3. Atividade Citotóxica .....	54
4.5.4. Atividade Antiinflamatória .....	58
4.5.4.1. Influência na Migração de Neutrófilos e Permeabilidade Vascular em Camundongos da ConM II .....	58
4.5.4.2. Efeito da ConM II no Tratamento Subcrônico em Camundongos .....	62
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS</b> .....	64
REFERÊNCIAS	
APÊNDICE	
ANEXOS	

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Conceito de Lectinas

O termo 'lectina' (do latim '*legere*', que significa escolher, selecionar) define uma classe de proteínas composta de pelo menos um domínio não catalítico, denominado domínio lectínico, onde através deste se liga de forma reversível e específica à mono ou oligossacarídeos (GADELHA *et. al.* 2005). Lectinas têm sido encontradas em muitos organismos, desde vírus, bactérias, plantas e animais.

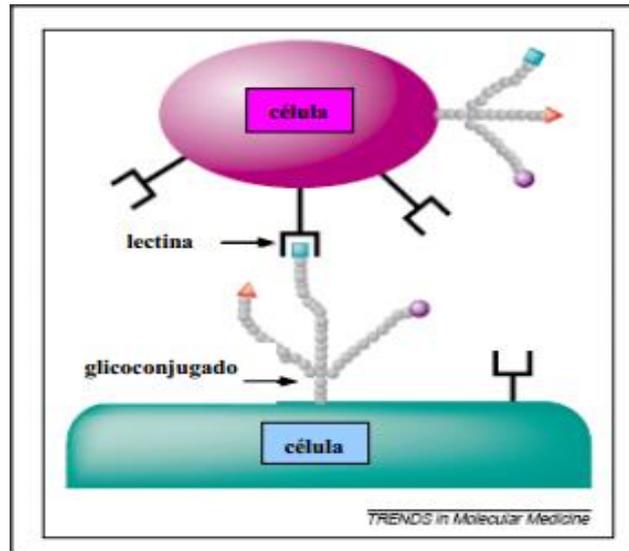
De acordo com a definição proposta por Sharon e Lis (1990), todas as proteínas de plantas que possuem pelo menos um domínio não catalítico que se liga reversivelmente a mono ou oligossacarídeos específicos são consideradas lectinas. Assim, foi possível incluir um número grande de proteínas com diferentes capacidades de aglutinação e com propriedades de precipitar glicoconjugados.

Segundo Peumans e Van Damme (1995) lectinas são glicoproteínas que se ligam especifica e reversivelmente a carboidratos e/ou glicoconjugados de origem não imunológica, sendo proteínas amplamente distribuídas na natureza.

São consideradas moléculas que reconhecem e decifram a informação contida nos oligossacarídeos presentes na superfície celular (RINI, 1995). Essas glicoproteínas, em particular as de origem vegetal, são consideradas importantes ferramentas para estudos em bioquímica, nutrição e biologia (RUDIGER, 1998). Sabe-se ainda que essas glicoproteínas são capazes de aglutinar células ou precipitar complexos de carboidratos, sem qualquer tipo de atividade enzimática para os que são alvo da sua ligação (Figura 1) (GOLDSTEIN *et. al.* 1980).

Segundo Parkin *et. al.* (2000) este reconhecimento entre proteínas e carboidratos é de importância fundamental em muitos processos biológicos como infecções virais, bacterianas, a micoplasma e de parasitas, na marcação de células, fertilização, metástases e no crescimento e diferenciação celular.

**Figura 1:** Representação esquemática do sítio de ligação glicídica de uma lectina.



**Fonte:** Adaptado de Kennedy e col *et. al.* 1995.

## 1.2. Ocorrência das Lectinas

As lectinas são encontradas em todas as classes e famílias de organismos vivos (SHARON e LIS, 1989). Nas plantas, lectinas têm sido relatadas e purificadas de folhas, frutos, raízes, tubérculos, rizomas (PEUMANS *et. al.* 1995), bulbos, cascas, caules (VAN DAMME *et. al.* 1996) e predominantemente em sementes (WANG e NG, 2006), onde elas constituem até 10% do conteúdo total de proteínas de extratos de sementes maduras (PEUMANS e VAN DAMME, 1995). Quando considerado seu peso seco, lectinas podem corresponder a 2% do peso seco total das sementes podendo, no entanto, esta porcentagem ser bastante inferior em determinadas espécies da família Leguminosae (Tabela 1).

A maioria das lectinas de sementes maduras de leguminosas está localizada nos cotilédones (num tipo especial de vacúolos chamados de vacúolos de reserva protéica) que funcionam como reserva de nutrientes, usados durante sua germinação.

Leguminosae é a terceira maior família de plantas, compreendendo três subfamílias: Caesalpinioideae, Mimosoideae, e Papilionoideae. Apresenta 727 gêneros e cerca de 20.000 espécies, de distribuição cosmopolita e ampla variedade de formas de vida (LEWIS *et. al.* 2005).

**TABELA 1** – Teor de lectinas de algumas sementes de espécies da família Leguminosae.

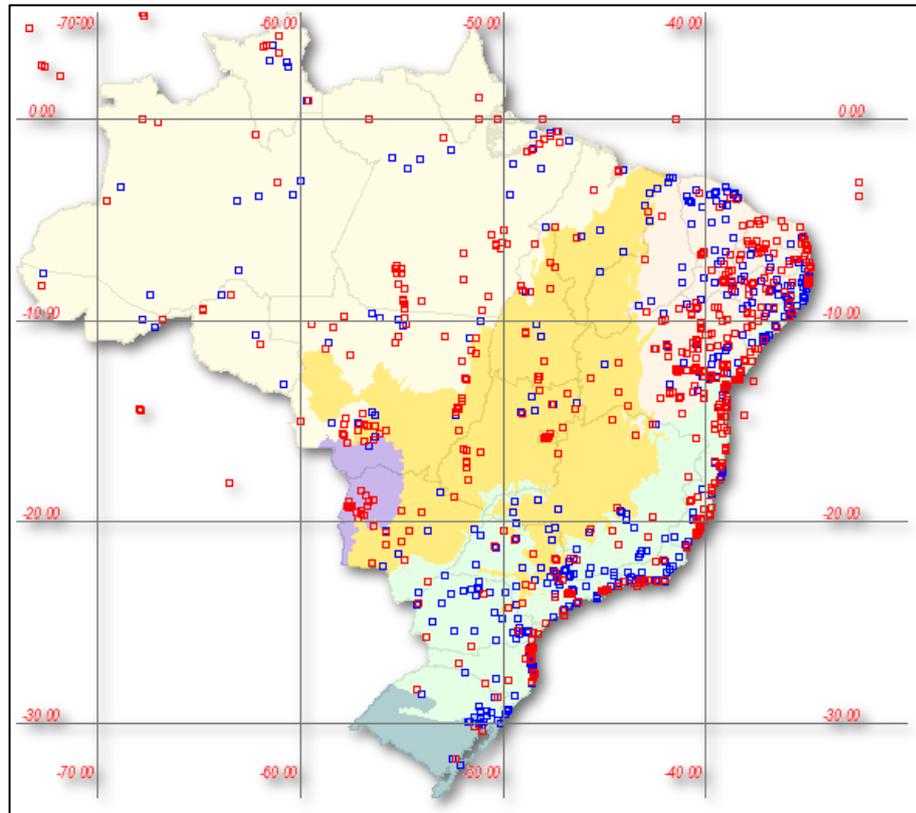
<b>Espécie</b>	<b>Nome vulgar</b>	<b>Lectina mg/100g de semente seca</b>
<i>Canavalia ensiformis</i>	Feijão de porco	2100
<i>Vicia cracca</i> (Lectina I / GalNAc)	Ervilhaca	1400
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Feijão vermelho	1200
<i>Glycine max</i>	Soja	300
<i>Arachis hypogaea</i>	Amendoim	190
<i>Phaseolus lunatus limensis</i>	Feijão de lima	170
<i>Wisteria floribunda</i>	Glicínia	160
<i>Vicia cracca</i> (lectina II / Mam/Glc)	Ervilhaca	150
<i>Pisum sativum</i>	Ervilha	140
<i>Dolichos biflorus</i>	Faveira	110
<i>Lens culinaris</i>	Lentilha	60
<i>Bauhinia purpúrea</i>	Pata de vaca	28
<i>Ulex europaeus</i>	Tojo	09

Fonte: (adaptado de Freier *et. al.* 1985).

Espécies de leguminosas são encontradas praticamente em todos os ambientes terrestres. Podem ocorrer desde florestas até desertos, de áreas quentes equatoriais até próximo aos polos. Variam desde pequenas ervas efêmeras e anuais, até árvores emergentes em florestas tropicais úmidas, como a Ducke da floresta amazônica (*Dinizia excelsa*) (FERNANDES, 2008).

No Brasil ocorrem 200 gêneros nativos e 1.500 espécies, estando entre as famílias de presença mais significativa na maioria dos ecossistemas brasileiros (Figura 2). Apresentam grande potencial econômico, sendo utilizada como alimento, madeira de lei, ornamental e adubação verde devido a sua capacidade de fixação de nitrogênio pelas bactérias simbiotes de suas raízes (SOUZA e LORENZI 2005). Graças a isso, elas podem colonizar ambientes pobres em nitrogênio e estocar uma maior quantidade de compostos nitrogenados em suas sementes. Em importância agrônômica, a família Leguminosae é superada apenas pelas gramíneas (a família do arroz, milho, trigo e outros cereais).

**Figura 2.** Distribuição Geográfica da família das leguminosas.

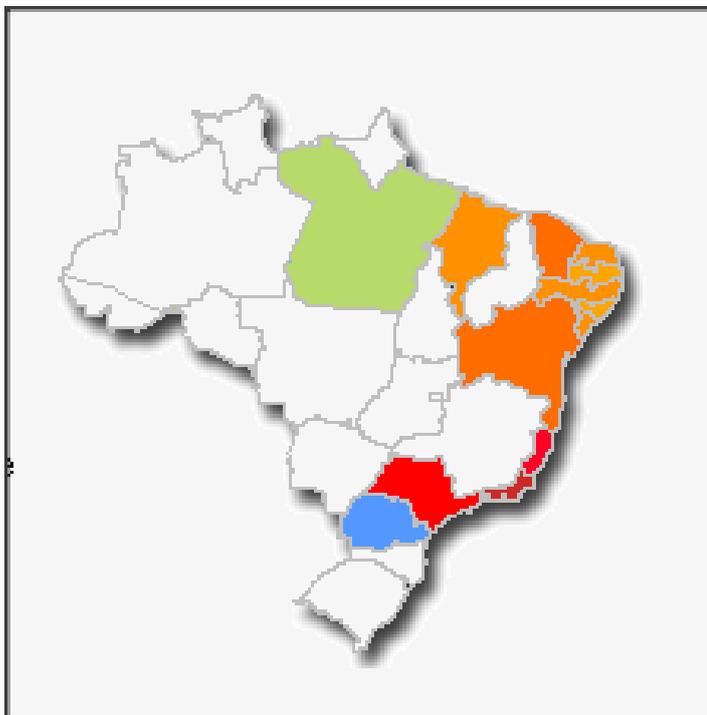


■ Coordenações Originais ■ Coordenações por Municípios

Fonte: <http://www.splink.org.br/index?lang=pt>

Dentro da família Leguminosae, o gênero *Canavalia* compreende um pequeno grupo de 48 espécies distribuídas ao longo dos trópicos (Figura 3). As espécies tropicais apresentam elevada produção de sementes, que foram utilizadas por séculos como fonte de alimento de alto conteúdo protéico e forrageira pelos nativos. Alguns representantes deste gênero encontrados no Brasil incluem: *Canavalia ensiformis*, *C. brasiliensis*, *C. gladiata* e *C. maritima* (ALLIGIANAIS, KALPOTZAKIS, MITAKU, CHINO, 2001).

**Figura 3.** Distribuição Geográfica da espécie *Canavalia maritima*. As cores representam os Estados brasileiros que podemos encontrar a espécie *Canavalia maritima*.



Fonte: <http://www.splink.org.br/index?lang=pt>.

*Canavalia maritima* (família Leguminosae, tribo Phaseoleae, sub-tribo Diocleinae) vulgarmente conhecido como feijão da praia (Figura 3), é uma leguminosa nativa amplamente distribuída nas praias do litoral paraibano, que ocorre em dunas costeiras, onde forma uma cobertura do solo, tolerante a condições de seca e solos arenosos e salinos (LÓPEZ *et. al.* 2009). Segundo Seena *et. al.* (2003) suas sementes têm altos níveis de taninos, além de outros fatores anti-nutricionais, como fitohemaglutininas (lectinas).

Das sementes de *Canavalia maritima* é extraída uma lectina (ConM), isolada por cromatografia em Sephadex® G-50. ConM é uma lectina glicose/manose, específica com estrutura quaternária recentemente elucidada, consistindo de um tetrâmero com quatro sítios de ligação para carboidratos (um por subunidade) e uma cavidade hidrofóbica. Cada subunidade apresenta massa molecular de 25,5 kDa contendo 237 resíduos de aminoácidos. Como outras lectinas da família Leguminosae, sub-tribo Diocleinae, a ConM apresenta mais de 90% de identidade de sua sequência de aminoácidos com a já bem estudada lectina

concanavalina A (ConA) de *Canavalia ensiformis*. Além disso, ConM possui atividade relaxante sobre o músculo liso vascular, relacionado a indução da liberação de óxido nítrico no endotélio vascular (DELATORRE *et. al.* 2006).

### 1.3. Lectinas de Leguminosas

No reino vegetal os grupos mais estudados são as lectinas de plantas superiores pertencentes à divisão Angiospermae (SHARON e LIS, 1990), principalmente aquelas de sementes de leguminosas. Estas plantas merecem destaque especial, devido à elevada concentração protéica de lectinas em suas sementes maduras (mais de 10%) e a facilidade de obtenção das mesmas.

Apesar das lectinas terem sido descobertas em extratos de mamona (*Ricinus comunis*) há mais de um século pelo trabalho pioneiro de Hermann Stillmark em 1888, um marco para biologia, ainda hoje a função das lectinas em plantas permanece não esclarecida, apresentando indícios de proteção contra patógenos e insetos para as sementes durante a germinação. Outras atribuições relevantes conferidas as lectinas são transporte e armazenamento de carboidratos, reconhecimento ou sinalização celular (dentro da célula, célula/célula ou entre organismos). Nos últimos anos essa classe de proteínas está sendo extensivamente usada em pesquisa científica, sendo consideradas como fonte de compostos promissores em biotecnologia (LIS e SHARON, 1998).

As lectinas representam um grupo heterogêneo de proteínas oligoméricas que variam amplamente em tamanho, estrutura, organização molecular, e na constituição de seus sítios de interação. No entanto, muitas delas pertencem a famílias de proteínas distintas com semelhanças de seqüência e características estruturais sofridos ao longo da evolução. Diante deste contexto é possível classificar essas proteínas em famílias evolutivamente relacionadas, ou seja, que apresentem estrutura quaternária semelhante e compartilhem outras características que possam estar diretamente relacionadas com a função biológica desempenhada por cada uma (ALLIGIANAIS, KALPOTZAKIS, MITAKU, CHINOU, 2001).

A ampla distribuição de lectinas em quase todas as famílias vegetais e a conservação de suas principais características parece indicar que essas proteínas são essenciais para a sobrevivência das espécies (MOREIRA *et. al.* 1991).

Dentre as famílias evolutivamente relacionadas de lectinas de plantas, podemos destacar: Lectinas de leguminosas; Lectinas específicas à quitina e homólogas a heveína; Lectinas homólogas ao tipo RIP-2; Lectinas homólogas a Jacalina; Lectinas da família das Amarantaceas; Lectinas de floema de Curcubitaceae (PEUMANS e VAN DAMME, 1995).

O gênero *Canavalia* se destaca dentro da tribo Diocleinae, por caracteres morfológicos que as definem como taxonômica homogênea. O gênero *Canavalia* possui aproximadamente 60 espécies sendo comum ao velho e ao novo mundo. Pelo menos 4 espécies de *Canavalia* são cultivadas como forrageira e alimento enquanto que as demais espécies, são silvestres em seus respectivos habitats naturais (MATOS *et. al.* 2004).

*Canavalia maritima* pertence à família Leguminosae, subfamília Papilionoideae, Tribo Phaseoleae, subtribo Diocleinae (DAM *et. al.* 1998) sendo popularmente conhecida como feijão da praia ou feijão da baía (ETZLER, 1986). Apresenta como sinônimos botânicos: *Canavalia rosea* (SW) e *Dolichos maritimus* Aublet, sendo a mais comum *C. maritima* Thouars desde 1813.

A *Canavalia maritima* é uma espécie comum em ambientes marinhos, sobretudo nas praias e costas tropicais e subtropicais dos hemisférios norte e sul (D'ARCY, 1980). De cobertura rasteira, possui folhas trifolhadas alternadas e boleadas no ápice as pequenas flores que variam do róseo ao roxo da *Canavalia maritima* mantidas durante todo o ano (FERNANDES, 2008) (Figura 4).

A lectina de *Canavalia maritima* é uma hololectina, purificada e descrita por Moreira e Cavada (1984), apresentando especificidade de reconhecimento por resíduos de maltose e trealose e com maior afinidade por dissacarídeos em relação a monossacarídeos (DELATORRE *et. al.* 2006).

**Figura 4:** Leguminosa *Canavalia maritima*; à esquerda, foto contendo flores, ao meio, foto da planta no litoral paraibano e à direita, foto das vagens e sementes da *Canavalia maritima*.



Fonte: Farias, D. L., João Pessoa – PB, 2012.

#### 1.4. Classificação das Lectinas

Nos anos 80, as lectinas foram classificadas apenas com relação à especificidade por carboidratos. Algumas lectinas eram classificadas como sendo específicas para carboidratos do tipo manose/glicose, outras lectinas específicas por glicose e outras específicas por quitina que é um polissacárideo. Por outro lado esta classificação era baseada apenas nos monossacarídeos que eram reconhecidos com maior afinidade. Estudos de microcalorimetria demonstraram que mesmo para lectinas altamente similares, a especificidade por carboidratos complexos é distinta, ou seja, a classificação descrita acima é útil apenas para fins experimentais, não sendo, tão eficiente para classificar lectinas apud DAM *et. al.* 2002.

De acordo com a especificidade as lectinas foram classificadas em quatro grupos, conforme a configuração relativa dos carboidratos 3 e 4 (C3 e C4) do anel piranosídico dos monossacarídeos inibidores. Grupo I: L-fucose; Grupo II: galactose/N-acetil-galactosamina; Grupo III: glicose/manose; Grupo IV: idose, gulose, L-glicose e L-xilose apud ZANETTI, 2007.

Segundo os autores Sharon e Lis (1990) as lectinas são subdivididas em três grandes classes, sendo que a terceira, apresenta duas subdivisões:

I. As *merolectinas* são proteínas contendo exclusivamente um único domínio ligante a carboidratos. São proteínas polipeptídicas simples, que devido a sua estrutura monovalente são incapazes de precipitar glicoconjugados ou aglutinar células. Exemplos bem conhecidos deste grupo são as heveínas, lectinas de *Hevea brasiliensis* (VAN PARIJS *et. al.* 1991) e as proteínas ligantes monoméricas de orquídeas (PEUMANS e VAN DAMME, 1995).

II. As *hololectinas* são formadas domínio ligante a carboidratos, contendo dois ou mais desses domínios que podem ser idênticos ou homólogos. Este grupo compreende todas as lectinas que têm múltiplos sítios de ligação são capazes de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados. A maioria das lectinas vegetais conhecidas são hololectinas e comportam-se como hemaglutininas.

III. As *quimerolectinas* são proteínas que, além do domínio ligante a carboidrato, possuem um outro domínio com atividade catalítica ou outra atividade biológica bem definida, agindo independentemente do domínio de ligação à carboidratos. Em função do número de sítios de ligações a açúcares, as quimerolectinas agem como merolectinas ou hololectinas (PEUMANS e VAN DAMME, 1995). As RIPs tipo II, proteínas inativadoras de ribossomos e as quitinases tipo I de plantas, exemplificam respectivamente os dois casos citados apud PIRES, 2007.

#### 1.5. Especificidade por Carboidrato

A interação das lectinas com receptores glicídicos da membrana celular é a base molecular para inúmeras respostas que essas proteínas são capazes de induzir em diversos sistemas biológicos. Elas têm mostrado variadas propriedades biológicas como atividade antitumoral (KAUR *et. al.* 2006), antiviral (FAVACHO *et. al.* 2007), antifúngica e antibacteriana (SÁ *et. al.* 2009), mediadoras de liberação e absorção de drogas e micro partículas nas mucosas (BIES *et. al.* 2004).

Ao interagirem com glicoconjugados da superfície celular, as lectinas podem promover a formação de ligações cruzadas entre células adjacentes, causando a aglutinação das mesmas (PEUMANS E VAN DAMME, 1995). A especificidade de ligação de uma lectina é definida em termos dos monossacarídeos que melhor inibem a reação de aglutinação (RAY *et. al.* 1992).

A estrutura do açúcar é sem dúvida, de importância fundamental no estabelecimento da interação carboidrato/proteína. A especificidade a monossacarídeos parece estar correlacionada com a os resíduos do local conservado na proteína, ligados aos açúcares por pontes de hidrogênio e, ainda, a uma variedade de “loops” que determinam o local exato de ligação ao monossacarídeo.

Estudos realizados por Sharma e Surolia (1997) permitiram discriminar nas lectinas quatro regiões diferentes de resíduos envolvidos na formação dos “loops” responsáveis pela ligação ao carboidrato: “loops” A, B, C e D. Quando os resíduos conservados no “loop” são a Aspartato e Glicina (ou Arginina) os “loops” designam-se por A e B, respectivamente. Os resíduos de Asparagina e resíduos hidrofóbicos (Tirosina, Fenilalanina, Triptofano ou Leucina) estão presentes nos “loops” C. Quando as interações são de outro tipo, geralmente com os átomos do esqueleto central polipeptídico da lectina, o “loop” designa-se por D, parecendo ser este o “loop”, quer pelo tamanho, quer pelo tipo de sequência, que mais contribui na diferenciação da especificidade para os açúcares, pela lectina (FERNANDES, 2008).

Lectinas que pertencem ao mesmo grupo de especificidade podem exibir especificidade anomérica, interagindo quer com o anômero  $\alpha$ , quer com o anômero  $\beta$  do monossacarídeo (ZANETTI, 2007). Variações na posição C-2 no monossacarídeo podem ser toleradas por algumas lectinas (exemplo, lectinas específicas para a manose podem interagir com a glucose e com a N-acetilglucosamina) (ZANETTI, 2007). Algumas lectinas toleram variações na posição C-3 do açúcar, mas a configuração do C-4, no que se refere à posição do grupo hidroxila é crítica, pelo que lectinas específicas para a manose não reconhecem a galactose (SHARMA e SUROLIA, 1997).

Muitos dos grupos polares (grupos hidroxila e átomos de oxigênio do anel do açúcar) do açúcar ligado à lectina participam na formação de ligações de hidrogênio com os grupos carbonila e amida do esqueleto central da cadeia polipeptídica. Apesar dos açúcares serem moléculas altamente polares, a disposição espacial dos grupos hidroxila deixa zonas hidrofóbicas na superfície do açúcar, as quais contribuem muito para a afinidade e para a especificidade da lectina para o açúcar, por meio de interações não-polares (forças de Van der Waals) (TOONE, 1994). A família de lectinas de leguminosas conta com duas exceções, no que diz respeito à atividade de reconhecimento da proteína, para o carboidrato, a arcelina (proteína de defesa encontrada na semente) e o inibidor da  $\alpha$ -amilase, ambas provenientes do

*Phaseolus vulgaris* (MIRKOV *et. al.* 1994). Estas proteínas não possuem locais conservados de ligação aos metais, pelo que não conseguem estabelecer ligação com os carboidratos, o que as torna disfuncionais para o conceito de lectina.

Os resultados disponíveis hoje na literatura indicam que, apesar das diferenças na especificidade por carboidratos, as lectinas vegetais mostram elevado grau de homologia em suas sequências de aminoácidos e são relativamente similares em relação às suas propriedades bioquímicas e físico-químicas, mas com intensidades diferentes (CAVADA *et. al.* 1993; 2001).

#### 1.6. Estrutura Molecular da Lectina de *Canavalia maritima*

Geralmente, cerca de 10 a 20% dos resíduos de aminoácidos das lectinas vegetais são conservados. Lectinas da mesma tribo podem exibir homologia em cerca de 60%, como é o caso do gênero *Viciae*, a moderada cerca de 30% nas lectinas do *Phaseolus vulgaris*. A região de ligação da lectina ao metal ( $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$ ) é fortemente conservada (MORENO e CHRISPEELS, 1989; MIRKOV *et. al.* 1994 e LORIS *et. al.* 2002), assim como para os aminoácidos, que participam em ligações de hidrogênio ou interações hidrofóbicas, com o monossacarídeo, no centro de ligação (LIS e SHARON, 1998).

Os monômeros de lectinas de leguminosas são estruturalmente bem conservados. Consistem em três folhas pregueadas- $\beta$ : uma folha posterior constituída por 6 fitas, uma anterior constituída por 7 fitas e uma folha mais pequena, também chamada de folha-S constituída por 5 fitas, que formam entre si um encaixe que constitui o centro de ligação para o carboidrato, no qual a zona de ligação do carboidratos é inserida. A região mais hidrofóbica localiza-se entre a folha posterior e a anterior. Não existem  $\alpha$ -hélices e 50% dos resíduos estão na região do “loop”. O “loop”, que contém um resíduo de glicina conservado no centro de ligação ao carboidrato enovela-se por cima da folha anterior, formando uma segunda zona hidrofóbica entre a folha anterior e este “loop”. Esta mesma arquitetura e topologia são encontradas numa grande variedade de carboidratos que reconhecem, ou são reconhecidos, por determinadas proteínas, como as galectinas (LOBSANOV *et. al.* 1993).

A atividade biológica das lectinas, que se manifesta pela sua ligação aos carboidratos, é dependente de cátions, como o  $\text{Ca}^{2+}$  e íons metálicos de transição, que, estão extremamente

conservados em todas as estruturas de lectinas. Um exemplo bem estudado é o da concanavalina A, que ilustra a ligação do  $\text{Ca}^{2+}$  e íons metálicos de transição, mediante resíduos de aspartato (CUNNINGHAM *et. al.* 1975; PIRES, 2007).

Deve-se ressaltar que a lectina nativa de sementes de *Canavalia maritima* foi cristalizada e determinada sua estrutura tridimensional (GADELHA *et. al.* 2005). As coordenadas atômicas da estrutura tridimensional nativa da lectina de sementes de *Canavalia maritima* (Código PDB: 2CWM) encontram-se depositadas no Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb>) desde o ano de 2006.

A principal diferença na estrutura da ConM mostrada nos dias atuais é a substituição de Ser 202 por Pro 202, um resíduo que promove a aproximação de Tyr 12 para o local de ligação de hidrato de carbono, favorecendo assim a grande especificidade por carboidato pelas lectinas ( DELATORRE *et. al.* 2006).

Apesar das diferenças notórias encontradas na especificidade para os carboidratos, as lectinas de leguminosas partilham propriedades moleculares comuns (LIS e SHARON, 1986): são compostas usualmente por 2 (ou 4) subunidades com massas moleculares de 25 a 30 kDa. Muitas são glicoproteínas e metaloproteínas contendo  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$  (FERNANDES, 2008). O número de centros de ligação ao monossacarídeo é de um por subunidade, possuindo cada subunidade uma especificidade idêntica de açúcar. A maioria das lectinas contém, ainda, carboidratos em sua composição (FERNANDES, 2008; PIRES, 2007). Os carboidratos ligados ao amino terminal incluem, a N-acetilglucosamina, a manose, a xilose e a L-fucose. Estes açúcares não contribuem, no entanto, nem para a ligação específica da lectina ao carboidrato, nem para a atividade biológica da lectina (SHARON e LIS, 1990).

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).

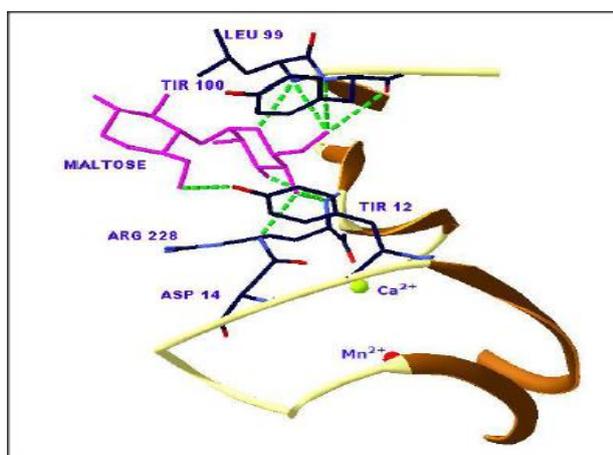
Lectinas podem exercer papéis como proteínas de reserva, no mecanismo de defesa contra patógenos (SHARON e LIS, 1986, MIRELMAN *et. al.* 1975; ETZLER, 1986), na regulação de fitohormônios que controlam o crescimento e desenvolvimento da planta; no

armazenamento ou transporte de carboidratos em sementes (SANZ-APARICIO *et. al.* 1997) e na associação do vegetal a simbioses (SHARON e LIS, 2004). Contêm ainda uma cavidade hidrofóbica, primeiramente descrita para a concanavalina A (ConA) por Becker *et. al.* (1975). Esta cavidade consiste, principalmente, de resíduos hidrofóbicos conservados, os quais podem estar envolvidos na ligação das lectinas a hormônios vegetais (CUNNINGHAM *et. al.* 1975; WANG, 1978).

As lectinas contêm ainda, um teor elevado de aminoácidos acídicos e aminoácidos básicos, comparativamente ao baixo teor em aminoácidos sulfurados. Devido à extensa homologia de seqüências encontrada entre as lectinas, a sua organização estrutural é similar (SHARON e LIS, 1989). O elemento principal da estrutura secundária são as folhas pregueadas. O conteúdo  $\alpha$ -helicoidal é baixo ou praticamente inexistente. Algumas lectinas podem existir em mais do que uma forma (isolectinas), que se distinguem pelo padrão eletroforético (exemplo, *Phaseolus vulgaris*) (PIRES, 2007).

A Figura 5 mostra detalhe do sítio de ligação a carboidratos da ConM complexada com o oligossacarídeo maltose. A estrutura tridimensional completa da ConM nativa é mostrada na Figura 6. Segundo Fernandes (2008) o tetrâmero consiste de dois dímeros canônicos de lectinas de leguminosas, sendo cada monômero formado por uma cadeia polipeptídica de 237 resíduos de aminoácidos.

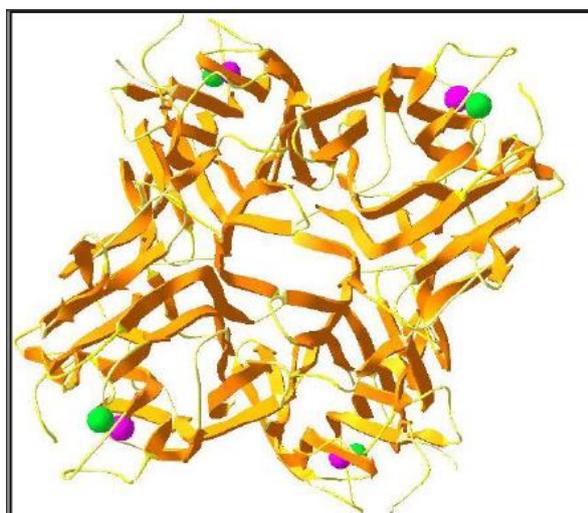
**Figura 5.** Detalhe do sítio de ligação a carboidratos da ConM complexada com o oligossacarídeo maltose.



Fonte: Fernandes, 2008.

Pouco se conhece na literatura sobre os efeitos biológicos da lectina ConM. Um dos poucos relatos existentes na literatura mostra que a lectina produz relaxamento do músculo liso vascular em aortas isoladas de ratos via liberação de NO (GADELHA *et. al.* 2005).

**Figura 6.** Visão geral da estrutura tetramérica da lectina de sementes de *Canavalia maritima*. Nos "loops" superficiais em cada um dos monômeros podem ser vistos os sítios de ligação ao  $\text{Ca}^{2+}$  (bolas verdes) e ao  $\text{Mn}^{2+}$  (bolas violetas).



Fonte: Fernandes, 2008.

### 1.7. Atividades Biológicas das Lectinas

A atividade de lectina em sementes de plantas foi demonstrada, pela primeira vez, por Stillmark (1888) (FERNANDES, 2008). Hoje estas macromoléculas são conhecidas como uma vasta família de proteínas homólogas, das quais o exemplo mais estudado é o da concanavalina A (PARKIN *et. al.* 1996).

Inúmeras atividades biológicas de lectinas vegetais têm sido demonstradas, dentre elas destacam-se: aumento de permeabilidade vascular em intestino delgado, com provável ativação de proteína quinase C pela Wheat Germ Agglutinin (WGA) (NORTHOVER & NORTHOVER, 1994); efeito relaxante em aortas de ratos pela liberação de óxido nítrico (NO) pela lectina de *Canavalia maritima* (GADELHA *et. al.* 2005); alteração da pressão de

perfusão e resistência vascular renal pelas lectinas de *Dioclea guianensis*, *Canavalia ensiformis* (HAVT *et. al.* 2003) e *Vaitarea macrocarpa* (MARTINS *et. al.* 2005); inibição da entrada do vírus HIV por lectinas ligadoras de manose (BALZARINI *et. al.* 2004), atividade antimicrobiana da lectina de *Lonchocarpus sericeus* na peritonite infecciosa (ALENCAR *et. al.* 2007); aumento dos níveis de insulina regulado hormonalmente e dependente do sistema opióide pela ConA (FRANCISCO-DO- PRADO *et. al.* 1998).

No estudo da inflamação, temos que as lectinas da subtribo Diocleinae induzem proliferação de linfócitos e produção de interferon- $\gamma$  em células mononucleares de sangue periférico (BARRAL-NETTO *et. al.* 1992) e liberação de histamina por mastócitos (GOMES *et. al.* 1994); que a lectina de *Vaitarea macrocarpa* induz migração de leucócitos no modelo de peritonite via liberação de citocinas e a formação de infiltrado celular no modelo de edema de pata (ALENCAR *et. al.* 2003; 2004; 2007); e que a lectina de *Pisum arvense* estimula quimiotaxia *in vivo* e *in vitro* (ALENCAR *et. al.* 2005).

Desta forma, com relação aos efeitos de lectinas na inflamação, observou-se que a maioria dos trabalhos se refere as suas ações pró-inflamatórias quando estas são injetadas localmente nos animais. No entanto, foi demonstrado que, por via endovenosa, as lectinas agem como antiinflamatórias em vários modelos experimentais: lectinas ligadoras de glicose e manose promoveram inibição da migração de neutrófilos para cavidade peritoneal e do edema de pata em ratos (ASSREUY *et. al.* 1997; ALENCAR *et. al.* 1999), bem como da cistite hemorrágica induzida por ciclofosfamida em camundongos (ASSREUY *et. al.* 1999). Além disso, a lectina de *Lonchocarpus sericeus*, uma lectina ligadora de Glic-Nac inibiu o edema de pata em ratos (ALENCAR *et. al.* 1999), a peritonite infecciosa em ratos (ALENCAR *et. al.* 2005) e a migração de leucócitos para a cavidade peritoneal de camundongos via inibição da produção de citocinas e quimiocinas, bem como pela diminuição do rolamento e adesão dos leucócitos ao endotélio vascular (NAPIMOGA *et. al.* 2007).

A respeito do grande número de trabalhos envolvendo as atividades biológicas de lectinas, muito pouco tem sido feito no sentido de investigar seus efeitos na nocicepção. Foi demonstrado que as lectinas das algas marinhas *Bryothamnion seaforthii*, *B. triquetrum* e *Amansia multifida* apresentam efeito antinociceptivo, por via oral, nos modelos de contorções abdominais induzidas por ácido acético, teste da formalina e da placa quente, sendo que neste último modelo, o efeito foi sensível ao pré-tratamento com naloxona, sugerindo a participação da via opióide no mecanismo de ação antinociceptivo destas lectinas (VIANA *et. al.* 2002;

NEVES *et. al.* 2007). Recentemente, foi demonstrado que a lectina de *Lonchocarpus sericeus* inibe a hipernocicepção mecânica em ratos induzida pela injeção intraplantar de OVA e carragenina, mas não a induzida por PGE2 ou formalina em camundongos (NAPIMOGA *et. al.* 2007). Estes trabalhos sugerem as lectinas de plantas como uma importante fonte de substâncias com potenciais aplicações farmacológicas.

Também têm sido demonstrados importantes efeitos sobre a contratilidade do músculo liso. O tratamento de coelhos com ricina, lectina extraída da planta *Ricinus communis*, aumentou significativamente a contração induzida por serotonina e histamina em artérias coronárias (ZHANG *et. al.* 1994); a ConA e a lectina do germe do trigo (WGA) produzem relaxamento dependente de endotélio em aorta de coelho (KLEHA *et. al.* 1991). As lectinas de *Bryothamnion triquetrum* e *Canavalia maritima* relaxam aortas de ratos via ativação da enzima óxido nítrico sintase (LIMA *et. al.* 2004; GADELHA *et. al.* 2005).

Lectinas são proteínas que apresentam diversas atividades biológicas, tais como: atividade hemaglutinante (AH), larvicida e antimicrobiana (CHUANG *et. al.* 2007; COELHO *et. al.* 2009). Interações de lectina com carboidratos, lipopolissacarídeos e ácidos teicóicos presentes na parede celular das bactérias são responsáveis por sua atividade antibacteriana (RATANAPO *et. al.* 2001). As sementes de moringa, por exemplo, têm demonstrado efeito bactericida contra cepas gram-positivas (*Bacillus subtilis* e *Streptococcus*) e gram-negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia macerescens*, *Micobacterium pheii* e *Shigella*), sugerindo o uso dessas sementes como fontes de agentes antibacterianos (MATOS, 1998; BROIN *et. al.* 2002; ANWAR *et. al.* 2007; COSTA *et. al.* 2009).

Neste sentido a realização deste estudo justificou-se devido ao fato que em trabalhos de pesquisa anteriores, durante o procedimento de isolamento e purificação da lectina de sementes de *Canavalia marítima* para produção de cristais de boa resolução que foram utilizados em experimentos de difração de raios-X (GADELHA *et. al.* 2005<sup>a,b</sup>; DELATORRE *et. al.* 2006), evidenciou-se que o pico não retido na cromatografia de afinidade em matriz de Sephadex<sup>®</sup> continuava apresentando atividade hemaglutinante, sugerindo a presença de uma nova lectina nos extratos protéicos de sementes de *Canavalia maritima*.

Descoberta semelhante foi relatada por Pérez (1998) para a espécie *Dioclea lehmanni* da mesma subtribo. Apesar disso, nenhuma dessas novas proteínas foi cristalizada, o que permitiria comparações a nível estrutural de proteínas da mesma classe, isoladas a partir da

mesma parte vegetativa de uma única espécie. Experimentos preliminares confirmam diferenças no padrão de atividade hemaglutinante e especificidade por carboidratos entre a lectina já isolada (ConM) e a presente no pico não retido da matriz de Sephadex<sup>®</sup>. Estes resultados prévios motivaram a realização deste trabalho de pesquisa.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

O presente estudo teve como objetivo geral isolar, purificar e realizar atividades biológicas de uma nova lectina presente em sementes da leguminosa *Canavalia maritima*;

### 2.2 Objetivos Específicos

- a) Estabelecer um protocolo de isolamento para uma segunda lectina presente em extratos de sementes de *Canavalia maritima*;
- b) Avaliar atividades biológicas da nova lectina (antibacteriana, citotóxica, antifúngica e antiinflamatória);
- c) Gerar novos conhecimentos que posteriormente venham propor resultados a ser publicáveis em congressos e/ou em revistas científicas indexadas.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Preparação da Farinha das Sementes de *Canavalia maritima*

As sementes de *Canavalia maritima* foram coletadas em praias do litoral paraibano, nas praias do Bessa e Intermares em João Pessoa- PB, as sementes foram moídas em moinho tipo Willey, até obtenção de uma farinha fina que foi estocada em frascos hermeticamente fechados e mantidos a temperatura de 25 °C, para uma melhor conservação.

#### 3.2. Preparo do Extrato Bruto

A metodologia de extração utilizada foi a descrita por Cavada *et. al.* (1996). Dessa forma, a farinha fina de sementes de *Canavalia maritima* foi submetida à extração em NaCl 0,15 M na proporção de 1/10 (m/v), sob agitação constante durante 4 horas. Em seguida, o extrato obtido foi centrifugado a 5.000 rpm por 20 minutos a 4° C e o sobrenadante, filtrado em papel de filtro qualitativo.

#### 3.3. Obtenção e Preparo de Eritrócitos

Os eritrócitos foram obtidos de coelhos provenientes do Biotério Prof. Thomas George do Centro de Biotecnologia da UFPB (CBiotec) sob aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA nº 0509/12) (ANEXO).

Para a obtenção dos eritrócitos livres de soro foi distribuído 2 mL de sangue em tubo de ensaio e completado seu volume para 10 mL com NaCl 0,15 M, centrifugado a 2.000 rpm por 5 minutos, repetindo o procedimento por 5 vezes. Após a obtenção de uma massa de eritrócitos livre de soro e material hemolisado, o mesmo foi diluído numa concentração final de 3% em NaCl 0,15 M.

### 3.4. Determinação da Atividade Hemaglutinante (AH)

A AH foi realizada seguindo a metodologia descrita por Correia e Coelho (1995). A AH dos diferentes extratos protéicos foi determinada por meio de diluições duplo-seriadas com repetições. A cada tubo foram adicionados 100µL de NaCl 0,15 M; nos primeiros tubo foram adicionados 100µL do extrato diluídos serialmente até o ultimo tubo capaz de causar aglutinação. A cada um dos tubos foram adicionados 100 µL de eritrócitos de coelho a 3%. Os tubos foram então incubados em estufa a 37 °C durante 30 minutos e a presença da AH foi determinada macroscopicamente.

Os resultados foram expressos em número de unidades hemaglutinantes (UH) que é calculado como sendo o inverso do título da maior diluição, na base 2 que ainda apresentou nítida aglutinação e, em atividade específica da lectina obtida pelo cálculo de mgP/UH (KILPATRICK; YEOMAN, 1978).

### 3.5. Obtenção da nova lectina da Leguminosa *Canavalia maritima*

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

O extrato protéico obtido a partir da farinha das sementes de *Canavalia maritima* foi submetido à coluna cromatográfica de afinidade matriz Sephadex G-50 (5 x 25 cm), previamente equilibrada com NaCl 0,15 M contendo CaCl<sub>2</sub> e MnCl<sub>2</sub> a 5mM, conforme metodologia de Cavada *et. al.* (1996). O extrato protéico permaneceu em contato com a matriz de afinidade por 15 horas sob fluxo contínuo de 60 mL/h. Após a eluição do pico não retido com a solução de equilíbrio da coluna, o mesmo 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 contínuo por 15 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. Onde todas as trocas de soluções em todos os procedimentos respeitaram a obtenção da absorbância abaixo de 0,050, medidas a 280 nm.

### 3.6. Especificidade por Carboidrato e Glicoproteína

A especificidade da nova lectina por açúcares foi determinada segundo descrito por Moreira e Perrone (1977). Para os ensaios de inibição da AH, uma alíquota de 100 µL de uma solução de NaCl 0,15 M foi colocada em todos os tubos. No primeiro tubo foram adicionados 100 µL de soluções estoque de carboidratos simples e de glicoproteínas na concentração de 0,5M e destas soluções foram feitas diluições seriadas. Em seguida, foram adicionados 100µL da amostra contendo a lectina em todos os tubos que permaneceram em estufa a 37 °C por 30 minutos. Após este período, foram adicionados 200 µL de uma suspensão de eritrócitos de coelho nativas a 3%. Esta mistura foi deixada em estufa a 37 °C por 30 minutos, seguidos de outros 30 minutos a temperatura de 25 °C e os resultados foram lidos macroscopicamente.

Foram testados 8 (oito) açúcares simples, a saber: glicose, manose, xilose, sacarose, frutose, arabinose, maltose e galactose, assim como foram testadas 2(dois) glicoproteínas, a saber: mucina e carragenina. A especificidade da nova lectina (ConM II) foi determinada analisando-se quais açúcares inibiram a AH e os resultados foram expressos com base na Concentração Inibitória Mínima (CIM) do açúcar que foi capaz de inibir a hemaglutinação.

O branco do extrato foi considerado como controle positivo por conter 100 µL de NaCl 0,15 M + 100 µL da amostra + 200 µL de sangue de coelho a 3%. O controle negativo (branco do açúcar) utilizado constou de 100µL de NaCl 0,15 M + 100 µL do açúcar + 200 µL de suspensão de eritrócitos de coelho nativos a 3%.

### 3.7. Eletroforese PAGE-SDS

O grau de purificação da amostra foi acompanhado por meio da análise dos perfis protéicos obtidos através de eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS e 2-mercaptoetanol. Dessa forma, a proteína, em concentração de 1 mg/mL foi dissolvida em tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,3, contendo SDS a 1 % e aquecida à temperatura de 100° C por 5 minutos. O gel de aplicação foi preparadoa 3,5 % de acrilamida-bisacrilamida e o gel de separação, a 12,5 % de acrilamida-bisacrilamida SDS a 1 %. A amostra, contendo azul de bromofenol a 0,02 %, foi então submetida a uma corrida eletroforética em amperagem constante de 20 mA. Após a corrida, o gel foi corado em Commassie brilliant blue R - 250 a 0,05 % e o padrão de bandas protéicas analisadas.

### 3.8. Determinação do Teor de Proteínas Solúveis

O teor de proteínas solúveis presentes nos extratos da farinha de sementes da *Canavalia maritima* foi determinado segundo o método descrito por Bradford (1976), onde a cada 100 µL 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 BSA.

### 3.9. Determinação da presença de Carboidrato

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 ou da solução padrão. Alíquotas de 500 µL das diluições do extrato total liofilizado e das amostras protéicas foram retiradas e acrescentadas 500 µL de fenol (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O) 5% ultrapuro (≥99%, MW=94,1) e 2,5 mL de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) concentrado (95-97%, MW=98.08 g/mol, d = 1.84 g/cm<sup>3</sup>). 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 D-(+)-Glicose Anidra ultrapura (≥99%, MW=180,1).

### 3.10. ATIVIDADES BIOLÓGICAS

O interesse pelas lectinas é devido às várias atividades biológicas que as mesmas apresentam, como hemaglutinante (SEPCIC *et. al.* 1997), mitogênica (ENGEL *et. al.* 1992), citotóxica (PAJIC *et. al.* 2002), hemolítica (HATAKEYAMA *et. al.* 1995), antibacteriana (TUNKIJJANUKIJ; OLAFSEN, 1998), dentre outras, as quais podem ensejar uma gama de aplicações biológicas, tecnológicas e inclusive terapêuticas.

#### 3.10.1. Atividade Biológica Antifúngica

##### 3.10.1.1. Produtos Testados

Os produtos testados foram duas lectinas isoladas da espécie *Canavalia maritima* da família Leguminosae. A nova Lectina (ConM II) foi identificada e as lectinas foram testadas na concentração 1.024 µg/mL até 16 µg/mL. As mesmas foram solubilizadas em dimetilsufóxido-DMSO (SIGMA-ALDRICH®), numa proporção de 10 % para não ocorrer interferência sobre o microrganismo. Os antifúngicos nistatina e anfotericina B (SIGMA-ALDRICH®) foram utilizados como padrão no controle na execução da metodologia dos ensaios de atividade biológica das lectinas, respectivamente, frente às cepas de *Cryptococcus neoformans*, *Candida tropicalis* e *Candida albicans*.

##### 3.10.1.2. Meios de Cultura

Os ensaios de atividade antifúngica foram realizados em caldo Sabouraud dextrose-CSD (DIFCO LAB./USA/FRANCE) frente às leveduras. O mesmo foi preparado e usado conforme as instruções do fabricante.

##### 3.10.1.3. Ensaios de Atividade Antimicrobiana

Nos ensaios de atividade biológica das lectinas, foram incluídas as espécies fúngicas: *Cryptococcus neoformans* (FCF – 119), *Cryptococcus neoformans* (LM – 0310), *Candida albicans* (ATCC – 76645), *Candida albicans* (LM 106), *Candida tropicalis* (ATCC

13803) e *Candida tropicalis* (LM 10). As cepas foram adquiridas no Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, no Laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo e no Laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal da Paraíba. As mesmas foram mantidas em Agar Sabouraud dextrose - ASD (DIFCO LAB. USA/FRANCE) e conservadas a 35-37 °C e a 4 °C.

A suspensão dos microrganismos foi preparada conforme o tubo 0.5 da Escala Mc Farland, ajustada através de leitura espectrofotométrica (Leitz-Photometer 340-800), para 90% T (530 nm), correspondendo, aproximadamente, a 10<sup>6</sup> UFC/mL (NCCLS 2002; HADACECK; GREEGER, 2000; CLEELAND; SQUIRES, 1991). Os ensaios de atividade antifúngica foram realizados pelo método de diluição seriada em meio líquido - técnica de microdiluição (ELOFF, 1987; CLEELAND; SQUIRES, 1991; BAWER *et. al.* 1996; HADACECK; GREEGER, 2000; NCCLS, 2002).

Para a execução do ensaio, foi usado microplacas contendo 96 poços com fundo chato e tampa (DISPO-PETRI/INLAB-Alamar Tecno Científica Ltda./SP). Inicialmente, adicionou-se aos poços, 100 µL de caldo Sabouraud duplamente concentrado. Em seguida, foi inoculado 100µL das lectinas solubilizadas na concentração inicial de 1024 µg/mL. Depois foram feitas diluições seriadas à razão de dois, de 1024 µg/mL até 16 µg/mL. Posteriormente, o inoculo de 10 µL da suspensão dos microrganismos foram inoculados em todas as cavidades da placa.

Em paralelo, foram feitos controle do crescimento das espécies de leveduras, como também com os antifúngicos padrões: anfotericina B (*C. neoformans*) e nistatina (*C. albicans* / *C. tropicalis*). O sistema foi incubado a 35-37 °C / 24-48 horas (CLEELAND; SQUIRES, 1991; VILJOEN *et. al.* 2003; SAHIN *et. al.* 2004).

Após o tempo de incubação adequado, foi feita a leitura dos resultados para avaliar a determinação da CIM das lectinas frente às leveduras ensaiados. A CIM foi determinada através de observação visual, tomando como base o crescimento da levedura pela formação dos chamados botões de crescimento - aglomerado de células ou não crescimento nos poços da placa de microdiluição (ESPINEL INGROFF *et. al.* 1991; ESPINEL INGROFF *et. al.* 1992). Os ensaios foram realizados em duplicata e o resultado expresso pela média geométrica dos valores de CIM obtidas nos dois ensaios (CLEELAND; SQUIRES, 1991; ESPINEL INGROFF *et. al.* 1991; ESPINEL INGROFF *et. al.* 1992; ELOFF, 1998). E foi

considerada como CIM, a menor concentração da lectina que foi capaz de inibir o crescimento das cepas usadas nos ensaios biológicos.

A atividade biológica do produto foi interpretada e considerada ativa ou não, conforme os seguintes critérios: 50-100 µg/mL = excelente/ótima atividade; 100-500 µg/mL = moderada atividade; 500-1000 µg/mL = baixa atividade; > 1000 µg/mL = produto inativo (MITCHER *et. al.* 1972; ALLIGIANAIS *et. al.* 2001; HOLETZ *et. al.* 2002; HOUGHTON *et. al.* 2007).

### 3.10.2. Atividade Biológica Antibacteriana

Para a avaliação da atividade antibacteriana em bactérias das lectinas da *Canavalia maritima* foram utilizadas linhagens padrão da *American Type Culture Collection* (ATCC) e da Coleção de Culturas Tropicais (CCT): *E. coli* ATCC 10536, *P. aueruginosa* ATCC 9027, *P. aueruginosa* ATCC 25619, *S. aureus* ATCC 6538, *S. aureus* ATCC 25925, *B. subtilis* CCT 0516. Desenvolvidas no Laboratório de Bioquímica Genética e Radiobiologia (BioGeR) – UFPB.

As linhagens foram obtidas mediante solicitação na Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro/RJ), conservadas em Ágar Sangue Inclinado "*slants*", e posteriormente replicadas no BioGeR Lab. UFPB. Os microrganismos foram inoculados em caldo BHI (HIMEDIA) e incubados a 37 °C / 24 h, a fim de se obter o crescimento bacteriano. Os meios de cultura utilizados para o crescimento das bactérias nos experimentos foram preparados de acordo com as instruções do fabricante.

Para a avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), foi utilizada a técnica de microdiluição. As lectinas foram submetidas a uma diluição seriada a metade de 1000 a 1 µg e adicionadas a uma suspensão ( $1 \times 10^{-2}$  UFC/mL) das bactérias. As placas foram incubadas a 37°C por 24 h e o crescimento bacteriano foi quantificado por espectrofotometria a 630 nm. Foi considerada como CIM a menor concentração de lectina que inibiu completamente o crescimento bacteriano (DAVIENNE; RADDI, 2002). Todos os testes foram realizados em triplicata e o resultado expresso pela média  $\pm$  epm dos três valores.

### 3.10.3. Atividade Citotóxica

Os eritrócitos humanos utilizados foram oriundos da Unidade Transfusional do Hospital Universitário Lauro Wanderley/UFPB. A manipulação e o descarte do sangue foram realizados em acordo com as Normas de Biossegurança seguidas pela referida Unidade, onde os procedimentos experimentais foram analisados e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do HULW, através da Plataforma Brasil no site do Ministério da Saúde (Certidão nº 259.119) (ANEXO).

Uma amostra de sangue humano foi misturado com NaCl 0,9 % na proporção de 1:30 e centrifugada a 2500 rpm durante 5 minutos para obtenção dos eritrócitos. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes e o sedimento da última centrifugação foi ressuspensão em NaCl 0,9% para obter uma suspensão a 0,5%.

As lectinas em diferentes concentrações (0.1, 1, 10, 100 e 1000µg) foram adicionadas à 2 mL da suspensão de eritrócitos para um volume final de 2,5 mL. A suspensão de eritrócitos foi utilizada como controle negativo (0 % de hemólise) e a suspensão de eritrócitos acrescida de Triton X-100 a 1% como controle positivo (100 % de hemólise). As amostras foram incubadas por 1 hora à  $22 \pm 2$  °C sob agitação lenta e constante a 100 rpm. Decorrido este tempo foram centrifugadas a 2500 rpm durante 5 minutos e a hemólise foi quantificada por espectrofotometria a 540 nm (RANGEL *et. al.* 1997). Todos os experimentos foram realizados em triplicata e expressos como a porcentagem média das três quantificações. Os resultados obtido foram analisados no GraphPad Prism versão 5.0.

### 3.10.4. Atividade Antiinflamatória

#### 3.10.4.1. Animais de Experimentação

Para determinar a atividade antiinflamatória foram usados dois grupos de camundongos (n= 6) suíços e machos (*Mus musculus*, com massa corporal entre 25 e 35 g). 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, também foram mantidos sob condições adequadas de luz e temperatura. Os testes foram realizados no período entre as 7 e 16 horas a  $20 \pm 3^{\circ}\text{C}$ .

Todos os protocolos de testagem em animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da USP, sob Certidão N° 183-2011.

#### 3.10.4.2. Verificação da Atividade Antiinflamatória por Meio da Migração de Neutrófilos e da Permeabilidade Vascular da ConM II.

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 2 de *C. maritima* (ConMII), na concentração de 1 mg/Kg, foram administradas 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 apenas 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.

Para a avaliação da permeabilidade vascular, os camundongos receberam a ConMII 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 como descrito nos estudos realizados por Thurston e seus colaboradores (2009).

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. 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  $\mu\text{g}$  de azul de Evans por meio de regressão linear baseado em uma curva padrão de azul de Evans. Os resultados foram calculados em  $\mu\text{g}$  de azul de Evans/mL de fluidos peritoneais e expressos como média  $\pm$  EMP.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE (AH) E DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNAS SOLÚVEIS.

Os resultados da dosagem de proteínas solúveis, AH e atividade específica da farinha de sementes e dos picos retidos e não retidos, coletados de colunas de afinidade por Sephadex G-50 e quitina, de extratos de sementes de *Canavalia maritima*, quando testadas frente eritrócitos de coelho estão apresentados na Tabela 2. A farinha de sementes de *C. maritima* extraída com solução de NaCl 0.15 M apresenta atividade hemaglutinante contra eritrócitos de coelho tendo sua maior atividade específica de 636,12 UH/ mgP na etapa P2 quitina (tabela 2), seguido do extrato bruto 557,95 UH/ mgP e P1 Sephadex 445,95 UH/ mgP.

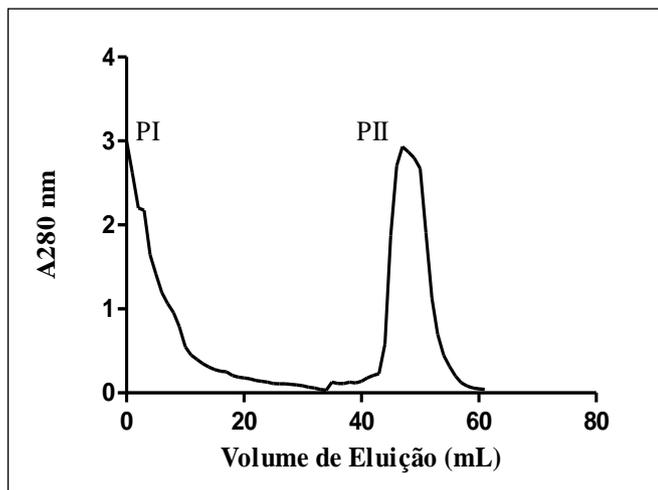
Pode-se verificar ainda que a solução de NaCl 0,15M foi capaz de extrair significativa quantidade da ConM II presente na farinha de sementes de *Canavalia maritima*, observando-se pelos resultados da atividade hemaglutinante por grama de farinha (UH/ml(g)).

### 4.2. CROMATOGRAFIA DE EXTRATOS DE SEMENTES DE *Canavalia maritima*

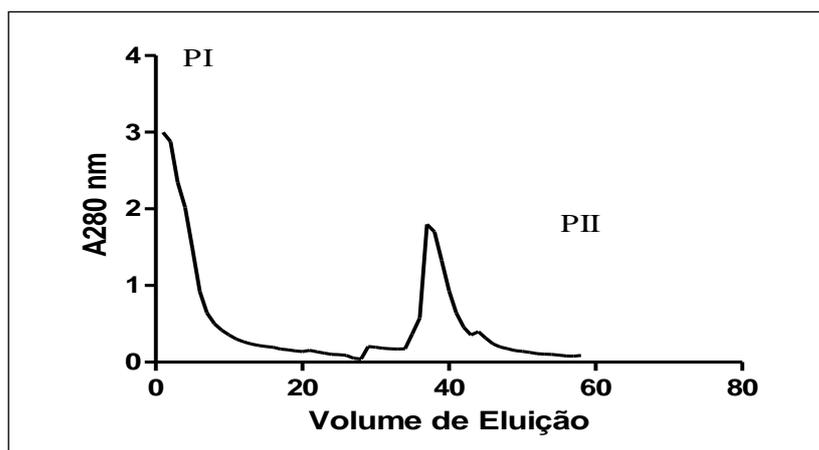
O extrato de sementes de *Canavalia maritima* obtido com NaCl 0,15 M foi submetido a coluna cromatográfica de afinidade Sephadex G-50 para purificação da lectina. Através de monitoramento, por leitura de absorvância em comprimento de onda de 280nm, verificou-se que um pico de proteínas não-retidas na coluna (P1 Sephadex) foi eluído com a solução de NaCl 0,15 M  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$  5 mM (Figura 7). Em seguida, o pico retido foi obtido através de eluição com tampão Glicina 0,1 M pH 2,6.

O pico retido e o não retido foram recolhidos, dialisados exaustivamente contra água, liofilizados e tiveram sua atividade hemaglutinante testada. Em seguida, o pico de proteínas não retidas liofilizado foi solubilizado em NaCl 0,15 M e aplicado em coluna de afinidade de quitina. O pico não retido foi eluído com a mesma solução de equilíbrio da coluna (NaCl 0,15 M). Após a saída das proteínas não retidas, foi obtido o P2 da quitina, aplicando-se na coluna o tampão Glicina 0,1 M pH 2,6.

**FIGURA 7:** Cromatografia de afinidade Sephadex G-50. Os valores obtidos em leitura de absorvância em comprimento de onda de 280nm das frações entre 0 e 15 correspondem ao pico não retido e os valores entre 40 e 60 correspondem ao pico retido.



**FIGURA 8:** Cromatografia de afinidade de quitina. Os valores obtidos em leitura de absorvância em comprimento de onda de 280nm das frações entre 0 e 10 correspondem ao pico não retido e os valores entre 35 e 45 correspondem ao pico retido.

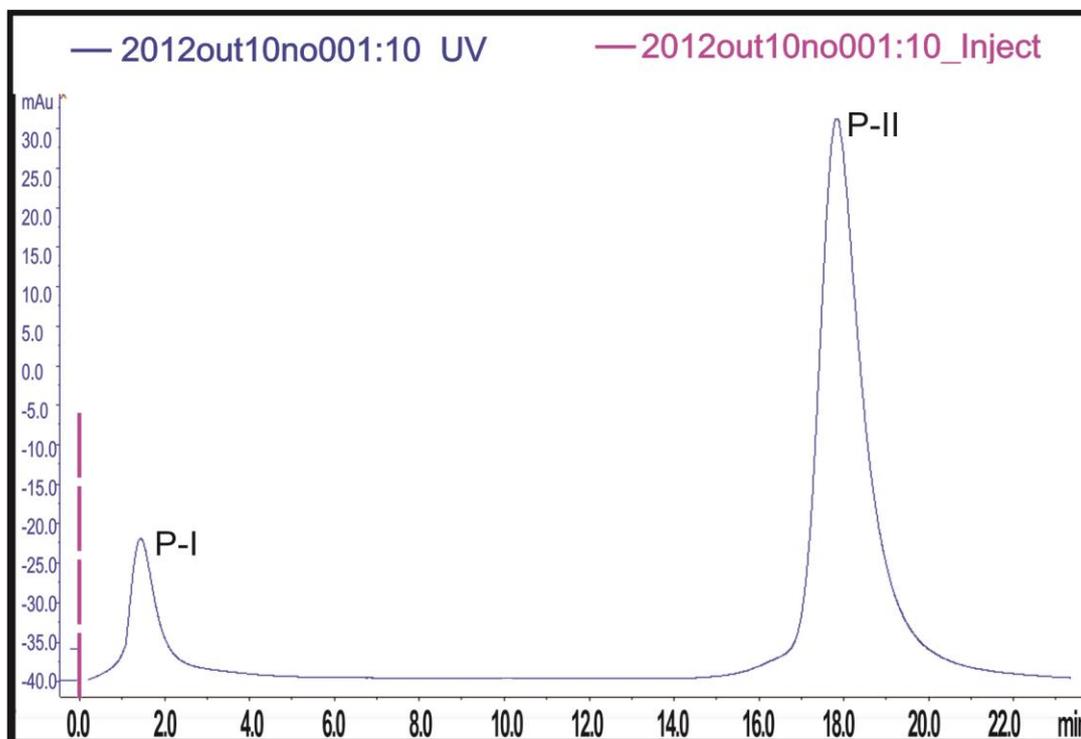


A cromatografia por exclusão molecular tem sido constantemente utilizada na purificação de lectinas vegetais, principalmente em etapas intermediárias do processo, como no isolamento da Curcina, uma lectina tóxica das sementes de *Jatropha curcas* (LIN *et. al.*

2010), na purificação de uma lectina manose-específica das sementes de *Treculia africana* (ADENIRAN *et. al.* 2009) e no isolamento de uma lectina antifúngica presente nas sementes egípcias de *Pisum sativum* (SITOHY *et. al.* 2007). Sendo assim, o pico ativo (P2 quitina), obtido através da cromatografia por afinidade em matriz quitina; foi submetido a cromatografia por exclusão molecular em sistema HPLC, visando obter a separação de contaminantes proteicos constatados no perfil cromatográfico da cromatografia de afinidade em matriz de quitina (Figura 8).

Após obtenção do perfil cromatográfico da exclusão molecular, verificou-se a presença de atividade hemaglutinante apenas no PII (Figura 9), que foi então, submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE-SDS) para verificação do grau de pureza da nova lectina (ConM II).

**FIGURA 9:** Padrão cromatográfico da coluna de exclusão molecular Sephacryl S-200 HR (26 mm x 600 mm). A coluna foi equilibrada e eluída em solução de fosfato de sódio bibásico 0,05 M com NaCl 0,15 M, pH 7,2. Frações de 6 mL foram coletadas e monitoradas em 280nm.



O grande desafio dos processos de purificação de proteínas é o exaustivo trabalho para se encontrarem as melhores estratégias, e, se for o caso, a adequação da metodologia para a escala de produção pretendida, garantindo que o produto final tenha todas as características necessárias para seu uso, seja em humanos, ou para diagnóstico, ou para processos analíticos de interesse para a pesquisa básica, como o estudo da estrutura tridimensional da proteína por ressonância magnética nuclear de alta resolução ou cristalografia por Raios-X. Tudo isso se passa, muitas vezes, no decorrer de anos e o protocolo final deverá ser resultado dos seguintes compromissos, definidos no desenho do processo: custo, velocidade e pureza (ALMEIDA *et. al.* 2002).

**TABELA 2:** Teor de proteínas solúveis e atividade hemaglutinante com a farinha de semente de *Canavalia maritima* contra eritrócitos de coelho a 3%.

<b>ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE E</b>			
<b>TEOR DE PROTEÍNAS SOLÚVEIS DE SEMENTES DA <i>Canavalia maritima</i></b>			
<b>Etapa de purificação</b>	<b>mgP/mL</b>	<b>UH/mL (g)</b>	<b>Atividade específica</b>
Extrato bruto (NaCl 0,15 M)	6,67	4096	557,95
PI Sephadex (pico não retido Sephadex G – 50 – NaCl 0,15 M Ca <sup>2+</sup> Mn <sup>2+</sup> 0,005 M)	0,57	256	445,95
P2 quitina (pico retido em quitina – Glicina 0,1 M pH 2,6)	0,40	256	636,12

#### 4.3. DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA DE CARBOIDRATOS

A nova lectina de ConM II (P2 quitina) 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 71,5 µg de carboidrato, indicando que a mesma é uma glicoproteína. Constatou-se que em *D. grandiflora*, *C. ensiformis* (MELGAREJO *et. al.* 2005), *D. sericia* (SIERRA e PÉREZ, 1999)

e *D. lehmani* também há lectinas glicosiladas. Os estudos com *D. lehmani* apontaram carboidratos em suas duas lectinas, sendo o conteúdo de carboidratos em DLL-II maior do que em DLL-I (PÉREZ, 1997). O resultado difere do encontrado para a primeira lectina de ConM (P2 Sephadex), que demonstrou um valor de 66,4 µg de carboidrato. Lectinas isoladas de *Bauhinia Monandra* (SOUZA *et. al.* 2011) e de *Luetzelburgia auriculata* (OLIVEIRA *et. al.* 2002) também são glicosiladas.

#### 4.4. ESPECIFICIDADE POR CARBOIDRATO E GLICOPROTEÍNA

A capacidade de provocar atividade hemaglutinante (AH) em células isoladas, não é um teste conclusivo de presença de lectina em extratos vegetais, já que taninos, alguns lipídeos e até mesmo cátions divalentes em altas concentrações, são capazes de aglutinar células. Sendo assim, para garantir que a AH esteja sendo mediada por alguma lectina, exige-se que ocorra a inibição desta AH por carboidratos (ZANETTI, 2007). Dessa forma, no teste de inibição da AH, a primeira lectina de ConM (P2 Sephadex) demonstrou especificidade por glicose e manose (RAMOS *et. al.* 1996).

A ação inibitória de carboidratos sobre a atividade hemaglutinante (AH) da nova lectina (ConM II) foi analisada com 08 diferentes açúcares e 02 glicoproteína. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 3. Foram utilizados nos ensaios de inibição da hemaglutinação, uma suspensão a 3% de eritrócitos de coelhos não tratados com enzimas proteolíticas. Como resultado, observou-se que entre as glicoproteínas e os açúcares testados, tiveram ação inibitória sobre a nova lectina, os açúcares frutose (62,5 mM), arabinose (125,0 mM), xilose (62,5 mM), sacarose (62,5 mM) e maltose (62,5 mM).

As lectinas de leguminosas possuem a capacidade de interagir com diversos açúcares, sejam eles simples ou complexos. Essa interação depende de um sítio de ligação primário a carboidratos presente na superfície molecular da lectina (DAM e BREWER, 2002). Segundo Goldstein (1980), Kocourek e Horejsi (1983) e Peumans & Van Damme (1995), alguns critérios devem ser supridos para que uma determinada proteína seja chamada de lectina e um desses critérios é ser proteína ou glicoproteína que se liga a algum tipo de carboidrato e não modificar quimicamente os carboidratos aos quais se ligam, este critério foi bem explorado e

evidenciado na nova lectina (ConM II), conforme ficou evidenciado frente a um considerável número de ligantes glicídicos testados.

**TABELA 3:** Efeito de carboidratos simples sobre a atividade hemaglutinante da nova lectina de ConM II (P2 quitina) frente a eritrócitos nativos de coelho a 3%.

<b>Carboidratos (Monossacarídeos)</b>	<b>(UH/mL)</b>	<b>CIM (mM)</b>
Glicose	ND	ND
Manose	ND	ND
Mucina	ND	ND
Carragenina	ND	ND
Galactose	ND	ND
Maltose	8	62,5
Sacarose	8	62,5
Frutose	8	62,5
Xilose	8	62,5
Arabinose	4	125,0

CIM: concentração requerida para inibir a atividade hemaglutinante em 100%.

ND: não detectada ação inibitória.

O processo de interação a carboidratos ocorre por meio de ligações de hidrogênio e interações de Van der Waals, entre as hidroxilas dos carboidratos e os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da lectina (WEIS e DRICKAMER, 1996). O teste de inibição por açúcares constitui uma etapa muito importante no processo de purificação e caracterização de lectinas, visto que, esse resultado irá conduzir todo o processo posterior de isolamento da proteína, além de, revelar o principal componente da atividade lectínica: o carboidrato ao qual a proteína possui afinidade.

A atividade hemaglutinante é considerada o principal ensaio capaz de detectar a presença de aglutininas em extratos vegetais, sendo essa presença, confirmada pela inibição

da aglutinação por um açúcar ou glicoconjugado. Sendo as lectinas conhecidas por sua habilidade em aglutinar células, especialmente eritrócitos, provocando o fenômeno da aglutinação (REYNOSO-CAMACHO *et. al.* 2003), bastante utilizado em ensaios para detecção da presença dessas proteínas.

#### 4.5. ELETROFORESE PAGE-SDS

Para avaliar o grau de pureza e estimar a massa molecular da nova lectina (ConM II), utilizou-se a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS (PAGE-SDS). Dessa forma, a amostra liofilizada oriunda do segundo pico (P-II) cromatográfico da coluna de exclusão molecular foi dissolvida numa concentração protéica final de 1 mg/mL em tampão da amostra (Tampão Tris 0,0625 M, pH 6,8, contendo SDS a 2%, glicerol a 10%,  $\beta$ -mercaptoetanol 5% e 10  $\mu$ L de azul de bromofenol 0,0002%). Em seguida, o gel foi montado contendo os marcadores de peso molecular (GE Healthcare/N<sup>o</sup> 17044601), a lectina já purificada e publicada (ConM) e a nova lectina (ConM II).

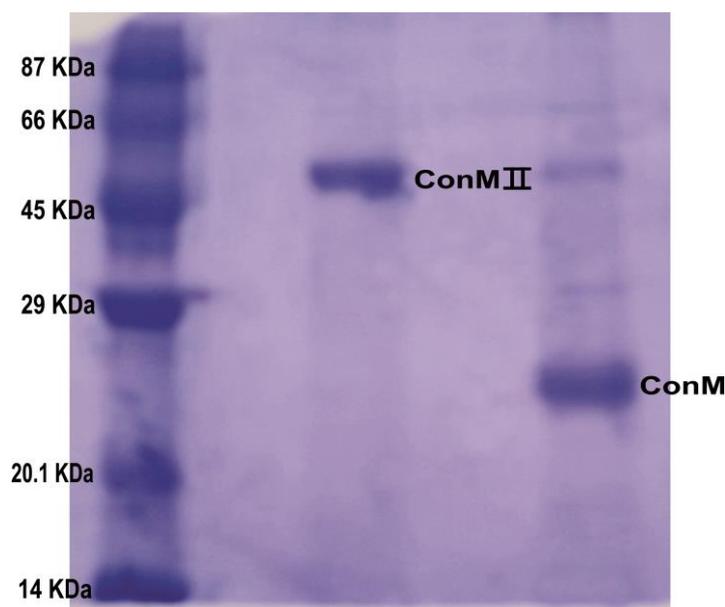
O padrão eletroforético obtido encontra-se na Figura 10. Neste é possível observar que as duas proteínas apresentam perfis eletroforéticos distintos, característicos para cada uma das lectinas. Pois enquanto ConM apresentou seu típico padrão de três bandas proteicas já descrito para as lectinas de leguminosas dos gêneros *Canavalia* e *Dioclea*, ConM II apresentou em seu padrão apenas uma banda proteica com peso molecular mais elevado. Na comparação com os marcadores de peso molecular, ConM II mostrou-se como uma proteína de peso molecular aproximado na faixa de 50 a 55 kDa, bem diferente da massa molecular da primeira lectina de sementes de *Canavalia maritima*, cuja massa molecular foi determinada como sendo em torno de 25 kDa por Cavada *et. al.* (1996).

Esse tratamento desnaturante que a amostra sofre durante a eletroforese é essencial quando se trata da análise de lectinas, já que, uma das características mais marcantes das lectinas é a sua variabilidade estrutural, que é composta por subunidades monoméricas que podem se arranjar em dímeros e tetrâmeros (BENEVIDES, 1998).

Lectinas de leguminosas são constituídas de 2 ou 4 subunidades com massa molecular relativa de 30 kDa e um sítio de ligação com carboidrato por subunidade (PANDO *et. al.*

2004). Sendo assim o uso do beta-mercaptoetanol e SDS se torna essencial para que as subunidades da lectina, caso existam, sejam separadas e analisadas.

**FIGURA 10:** Padrão eletroforético em PAGE-SDS. Padrões de massa molecular (marcador GE Healthcare/N° 17044601). Pico retido em quitina (ConM II). Pico retido Sephadex (ConM).



O emprego da eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE-SDS) é utilizado ao longo das diferentes etapas de um processo de purificação de proteínas, pois além de permitir a sua separação, fornece informações adicionais, tais como: o número de proteínas presentes na preparação, o seu peso molecular, o grau de pureza de purificações e a análise de subunidades protéicas.

#### 4.5. ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Visando obter comparações de atividade biológica, sempre que possível, as duas lectinas (ConM e ConM II) foram avaliadas frente a diversos modelos experimentais.

#### 4.5.1. Atividade Biológica Antifúngica

Visando avaliar o potencial antifúngico da nova lectina, ConM e ConM II foram testadas em três tipos de leveduras: *C. neoformans*, *C. albicans* e *C. tropicalis*. Nos testes, ConM e ConM II foram submetidos as cepas em concentrações que variaram de 1024 até 16 µg/mL.

Como resultado, a lectina de sementes de *Canavalia maritima* (ConM) na concentração de 32 µg/mL produziu inibição sobre o crescimento das leveduras encapsuladas de *C. neoformans* cepa LM 0310, enquanto que para *C. neoformans* cepa FCF 119, produziu inibição sobre o crescimento numa concentração de 512 µg/mL (Tabela 4). Já para *C. albicans* e *C. tropicalis*, nas concentrações testadas de 1024 até 16 µg/mL de ConM, não verificou-se, para as cepas testadas, qualquer tipo de inibição sobre o crescimento das leveduras encapsuladas.

**TABELA 4:** Resultados da CIM (µg/mL) da ConM sobre *C. neoformans*, *C. tropicalis* e *C. albicans*.

Leveduras	ConM (µg/mL)							Anfoteri cina B	Nistatina	CSD
	1024	512	256	128	64	32	16			
<i>C. neoformans</i> LM-0310	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
<i>C. neoformans</i> FCF-119	-	-	+	+	+	+	+	-	-	
<i>C. tropicalis</i> ATCC-13803	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
<i>C. tropicalis</i> LM-14	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
<i>C. albicans</i> ATCC-90028	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
<i>C. albicans</i> LM-106	+	+	+	+	+	+	+	+	-	

(+) = Crescimento do microrganismo

(-) = Não crescimento do microrganismo

Nos ensaios de atividade antifúngica da nova lectina de sementes de *Canavalia maritima* (ConM II), observou-se que a nova proteína foi capaz de inibir o crescimento de *C. neoformans* (Tabela 6), cuja CIM foi de 256 µg/mL para a cepa LM 0310 e de 512 µg/mL para a cepa FCF 119.

Quando comparado com os resultados obtidos para ConM (Tabela 5), constata-se que a nova lectina (Tabela 5) apresentou-se menos eficaz como inibidora do crescimento da levedura *C. neoformans*, uma vez que concentrações maiores são necessárias para inibir o crescimento de ambas as cepas testadas. De maneira semelhante à ConM, a nova lectina (ConM II), também não foi capaz de inibir o crescimento das cepas testadas de *C. albicans* e de *C. tropicalis*.

**TABELA 5:** Resultados da CIM (µg/mL) da ConM II sobre os fungos *C. neoformans*, *C. tropicalis* e *C. albicans*.

Leveduras	ConM II (µg/mL)							Anfoteri cina B	Nistatina	CSD
	1024	512	256	128	64	32	16			
<i>C. neoformans</i> LM - 0310	-	-	-	+	+	+	+	-		-
<i>C. neoformans</i> FCF – 119	-	-	+	+	+	+	+	-		-
<i>C. tropicalis</i> ATCC-13803	+	+	+	+	+	+	+		-	-
<i>C. tropicalis</i> LM-14	+	+	+	+	+	+	+		-	-
<i>C. albicans</i> ATCC-90028	+	+	+	+	+	+	+		+	-
<i>C. albicans</i> LM-106	+	+	+	+	+	+	+		+	-

(+) = Crescimento do microrganismo

(-) = Não crescimento do microrganismo

Os resultados obtidos da avaliação da atividade antifúngica das lectinas ConM e ConM II de sementes da leguminosa *Canavalia maritima* sobre os fungos *C. neoformans*

estão dentro dos parâmetros considerados excelente (ConM) e bom (ConM II), de acordo com os critérios estabelecidos por Houghton *et. al.* 2007; Holetz *et. al.* 2002; Mitscher *et. al.* 1972.

Autores e pesquisas afirmam que as lectinas possuem a capacidade de se ligarem especificamente a hifas das cepas fúngicas, e atuarem impedindo ou não o consumo de nutrientes a incorporação de precursores necessários para o crescimento do fungo. Sabe-se ainda que as lectinas atuam sobre a germinação de esporos fúngicos, provavelmente em um estágio muito inicial do processo, inibindo-a, de modo que há um prolongamento do período latente que precede a germinação (LIS e SHARON, 1981).

A atividade antifúngica foi observada em uma lectina isolada de sementes de *Castanea mollissima* (castanha-da-China) frente aos fungos *B. cinerea*, *M. arachidicola* e *Physalospora piricola* (WANG e NG, 2003); assim como na lectina isolada de sementes de *Talisia esculenta* (pitombeira), a qual inibiu o crescimento dos fungos *F. oxysporum*, *Colletotrichum lindemuthianum* e *Saccharomyces cerevisiae* através da interação da lectina com as estruturas dos fungos (FREIRE *et. al.* 2002).

Brandolt, Klafke, Casarin, Santi-Gadelha, Pinto, Xavier (2012) demonstraram que quando as lectinas isoladas de *Canavalia brasiliensis*, *Mucuna puriens* e *Clitoria* spp, são aplicadas sobre o fungo *C. parapsilosis*, pode-se observar atividade inibitória sobre a cepa fúngica de *C. parapsilosis*, sendo que a lectina de *Abelmoschus esculentus* aquela que apresentou a menor CIM ( $0.97 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) dentre as lectinas avaliadas. Xu *et. al.* (1998) purificaram e caracterizaram uma lectina da *Gastrodia elata*, que inibiu o crescimento de hifas dos fungos fitopatógenos *Valsa ambiens*, *Rhizoctonia solani*, *Gibberella zeae*, *Ganoderma lucidum* e *B. cinerea*.

Lectinas também têm sido usadas com grande sucesso como indicadores de fungos, uma vez que esses compostos são altamente específicos aos carboidratos presentes na parede celular dos mesmos (ZABEL e MORRELL, 1992).

O conhecimento do perfil sacarídico na superfície fúngica, habilita o uso de lectinas como promissoras sondas celulares que podem servir como carreadores de agentes antifúngicos que utilizam como alvos específicos, os carboidratos existentes na superfície da célula do microorganismo (LEAL *et. al.* 2007).

#### 4.5.2. Atividade Biológica Antibacteriana

O perfil de sensibilidade das linhagens bacterianas foi evidenciado pela determinação da CIM. Os resultados demonstraram que não houve crescimento das linhagens bacterianas na presença das lectinas ConM e ConMII de sementes de *Canavalia maritima*). Sendo assim as linhagens bacterianas *E. coli* ATCC 10536, *P. aueruginosa* ATCC 9027, *P. aueruginosa* ATCC 25619, *S. aureus* ATCC 6538, *S. aureus* ATCC 25925, *B. subtilis* CCT 0516; não foram sensíveis a ação de ConM e ConMII).

A habilidade que lectinas de plantas têm em reagir com carboidratos expostos na superfície celular de micróbios tornou possível o emprego dessas biomoléculas como sondas-diagnóstico para identificação de bactérias patogênicas, que estão baseadas na reação de aglutinação seletiva entre lectina e bactéria (DOYLE e SLIFKIN, 1994).

Ratanapo *et. al.* (2001) mostraram a interação de duas lectinas com especificidade para ácido N-glicosilneuramínico contra bactérias fitopatogênicas, propondo uma possível função na defesa de plantas.

Athamna e colaboradores (2006) analisaram os diferentes padrões de aglutinação de bactérias promovidas por 23 lectinas e mostraram que a interação lectina-bactéria é uma boa ferramenta para identificar rapidamente espécies de *Mycobacterium*. Além disso, a atividade antimicrobiana de lectinas (RATANAPO *et. al.* 2001) estimula a avaliação delas como novos antibióticos. No caso das lectinas ConM e ConM II testadas neste estudo, nas concentrações que foram utilizadas as mesmas não apresentaram atividade antibacteriana, porém nada pode se dizer caso sejam utilizadas outras concentrações da mesma lectina.

#### 4.5.3. Atividade Citotóxica

Quanto à atividade hemolítica, as lectinas ConM e ConM II nas concentrações de 1, 10, 100 µg foram bem semelhantes em sua atividade; entretanto, ConM não apresentou efeito hemolítico na concentração de 1000 µg/mL nos eritrócitos A e B e a ConM II quando na concentração de 1000 µg/mL apresentou uma percentagem de 32,54 de hemólise para o eritrócito do tipo sanguíneo A e 54,80 para o eritrócito tipo B, conforme demonstrado nas tabelas 6 e 7 e nas figuras 11, 12, 13 e 14.

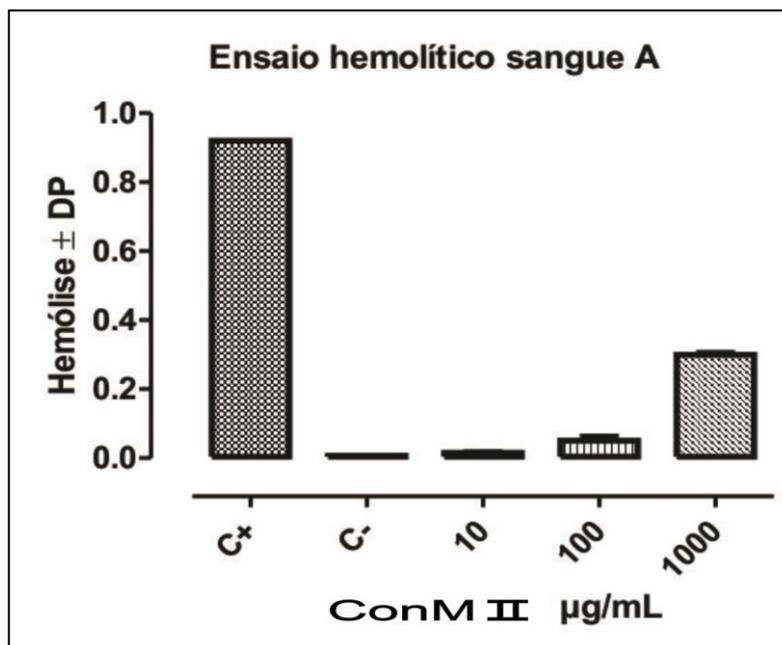
**TABELA 6:** Atividade hemolítica da ConM (1000 µg/mL) na presença de eritrócitos humanos dos tipos sanguíneos A, B, AB e O. Porcentagem de hemólise expressa como média  $\pm$  erro padrão da média.

Tipo Sanguíneo	ConM µg/MI		
	1000		
A	12,40	$\pm$	1,0
B	20,50	$\pm$	0,8
AB	17,3	$\pm$	0,3
O	-	-	-

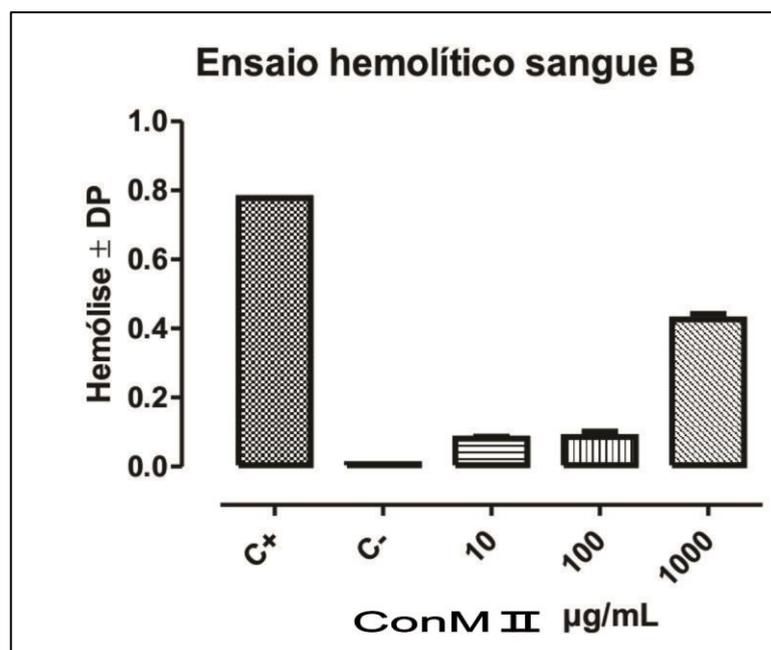
**TABELA 7:** Atividade hemolítica da ConM II (1000 µg/mL) na presença de eritrócitos humanos dos tipos sanguíneos A, B, AB e O. Porcentagem de hemólise expressa como média  $\pm$  erro padrão da média.

Tipo Sanguíneo	ConM II µg/mL					
	10		100		1000	
A	1,67	$\pm$ 0,00	5,47	$\pm$ 0,02	32,54	$\pm$ 0,01
B	10,41	$\pm$ 0,01	11,05	$\pm$ 0,03	54,80	$\pm$ 0,03
AB	2,18	$\pm$ 0,02	3,82	$\pm$ 0,01	17,67	$\pm$ 0,03
O	8,00	$\pm$ 0,07	3,65	$\pm$ 0,02	8,11	$\pm$ 0,01

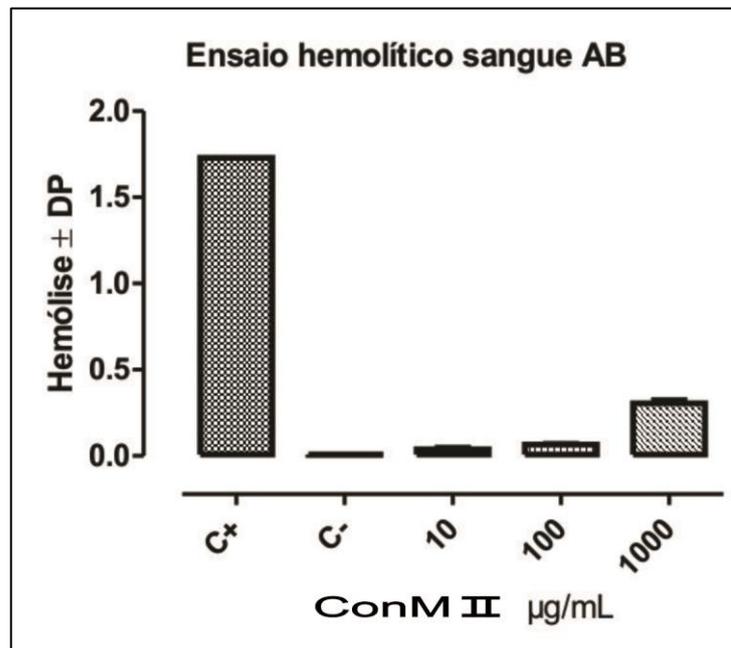
**FIGURA 11:** Atividade hemolítica da ConM II (10, 100 e 1000  $\mu\text{g/mL}$ ) na presença de eritrócitos humanos do tipo sanguíneo A. Hemólise expressa como média  $\pm$  erro padrão da média (n=3).



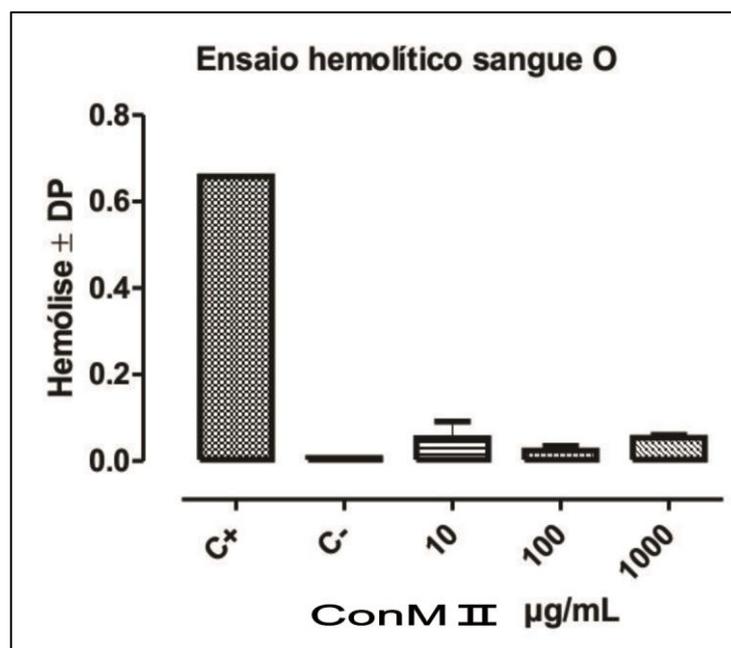
**FIGURA 12:** Atividade hemolítica da ConM II (10, 100 e 1000  $\mu\text{g/mL}$ ) na presença de eritrócitos humanos do tipo sanguíneo B. Hemólise expressa como média  $\pm$  erro padrão da média (n=3).



**FIGURA 13:** Atividade hemolítica da ConM II (10, 100 e 1000  $\mu\text{g/mL}$ ) na presença de eritrócitos humanos do tipo sanguíneo AB. Hemólise expressa como média  $\pm$  erro padrão da média (n=3).



**FIGURA 14:** Atividade hemolítica da ConM II (1000  $\mu\text{g/mL}$ ) na presença de eritrócitos humanos do tipo sanguíneo O. Hemólise expressa como média  $\pm$  erro padrão da média (n=3).



Na avaliação da atividade hemolítica sobre eritrócitos humanos as concentrações de 10, 100 e 1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  da ConM II, observou-se um baixo efeito hemolítico quando comparados com o controle positivo (tratados com o Triton X-100), indicando que não houve danos à membrana celular dos eritrócitos humanos, ou seja, uma baixa citotoxicidade para as células eucarióticas. Sendo verificado hemólise significativa apenas à concentração 1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , maior concentração testada, e apenas frente aos eritrócitos do tipo sanguíneo B.

Para estudo de citotoxicidade os eritrócitos ou células vermelhas do sangue são utilizados em muitos estudos relacionados à composição e ao comportamento de membrana, contribuindo com informações para estimar o comportamento de outras membranas celulares. Vários trabalhos têm demonstrado que qualquer alteração da membrana dos eritrócitos, seja em sua composição ou estabilidade, serve de ferramenta diagnóstica para uma série de doenças e para estudos sobre o comportamento de membranas celulares mediante ganho de idade, exercícios físicos, dieta, etanol e praguicidas (MARIGLIANO *et. al.* 1999; MAZZANTI *et. al.* 2002; GOUVÊA; SILVA, 2006; SRINIVASAN; KEMPAIAH, 2006; BATISTA *et. al.* 2007; FIRMINO, 2007).

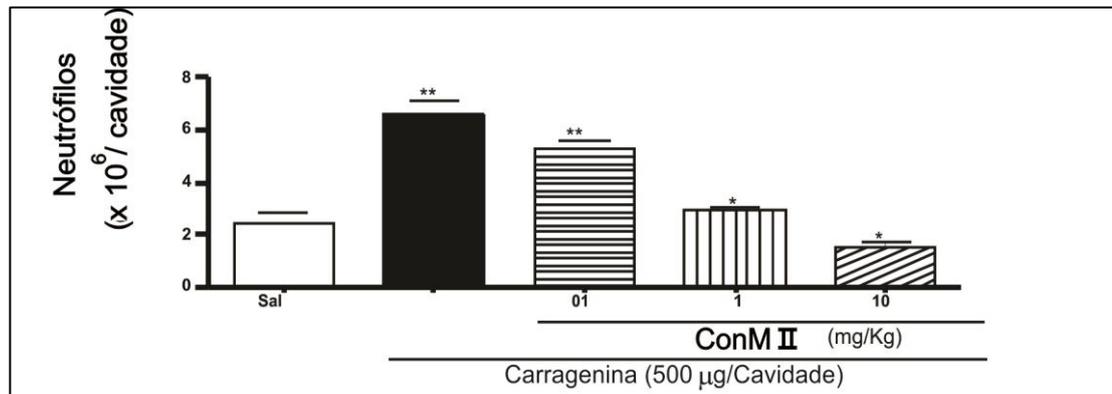
A ocorrência de hemólise após a exposição das lectinas ConM e ConM II pode ser diretamente correlacionada com a sua citotoxicidade e utilizada como o primeiro passo na triagem toxicológica *in vitro* (SCHIAR *et. al.* 2007) (Tabelas 6 e 7).

#### 4.5.4. Atividade Antiinflamatória

##### 4.5.4.1. Influência na Migração de Neutrófilos e Permeabilidade Vascular em Camundongos da ConM II.

Visando verificar a influência da nova lectina na migração de neutrófilos, camundongos foram tratados e.v. com salina, ou ConM II (0,1, 1 e 10 mg/kg) 15 min antes de receberem Cg i.p. (500  $\mu\text{g/cav}$ ). 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 finais são representados pela média  $\pm$  E.P.M. do nº de neutrófilos (n=6). Os resultados obtidos (Figura 15) mostram que ConM II inibe a migração de neutrófilos induzida por carragenina para a cavidade peritoneal de camundongos.

**FIGURA 15:** Influência da ConM II na Migração de Neutrófilos.\* indica significância estatística ( $p < 0.05$ ) comparado ao grupo salina \*\*comparado ao grupo Cg (ANOVA, teste de Bonferroni).



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 aderem ao endotélio dos capilares antes de se infiltrarem nos espaços teciduais. Essa aderência é específica e mediada por proteínas (são as chamadas proteínas ligantes, ou receptoras) 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).

Estudos realizados por Figueiredo e colaboradores (2009) demonstraram que a lectina de *D. rostrata* induz aumento no recrutamento dos neutrófilos na cavidade peritoneal de camundongos. Ainda, outras lectinas veem apresentando efeito inibitório na migração dos neutrófilos, assim como foi evidenciado neste estudo.

Atividade antiinflamatória também foi observada em estudos realizados por Santi – Gadelha e colaboradores (2006) referentes à lectina 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, assim como em estudos sobre a atividade antiinflamatória de *Dioclea violacea*, *Dioclea guianensis* e *Cratylia floribunda*, as

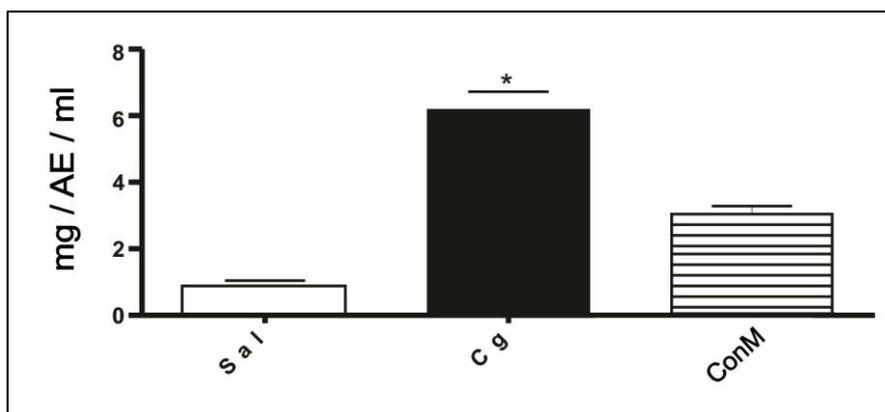
quais diminuem a migração de neutrófilos em 70, 63 e 62%, respectivamente realizados por Asseuy e colaboradores (1997).

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) e *Artocarpus integrifolia* (TOLEDO *et. al.* 2009) também comprovaram sua eficácia na atividade pró-inflamatória e que são capazes de recrutar neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos.

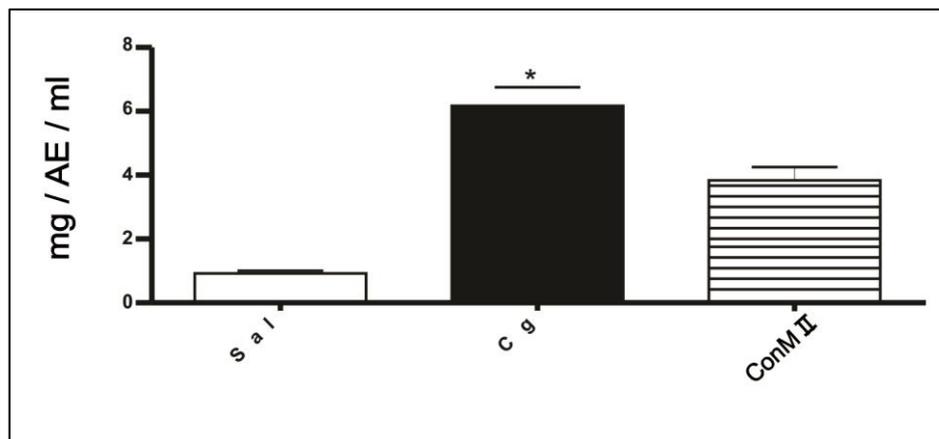
Tais reações, isto é, a função antiinflamatória das lectinas pode subsidiar a busca de drogas de origem vegetal que tenham como alvo a interação leucócito-endotélio no tratamento de doenças inflamatórias agudas e crônicas para que haja uma melhoria nas terapias associadas à inflamação.

No que diz respeito ao ensaio de permeabilidade vascular, animais foram tratados e.v. com salina, ConM e ConM II (1 mg/kg) 30 minutos antes de receberem 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  $\pm$  E.P.M. (n=6). Os resultados obtidos para ConM (Figura 16) e ConMII (Figura 17), permitem constatar que ambas as lectinas reduzem a alteração da permeabilidade vascular induzida por carragenina na cavidade peritoneal de camundongos.

**FIGURA 16:** Influência da ConM na Permeabilidade Vascular em Camundongos.\* indica significância estatística ( $p < 0.05$ ) comparado ao grupo salina e \*\* comparado ao grupo Cg (ANOVA, teste de Bonferroni).



**FIGURA 17:** Influência da ConM II na Permeabilidade Vascular em Camundongos. \* indica significância estatística ( $p < 0.05$ ) comparado ao grupo salina e \*\* comparado ao grupo Cg (ANOVA, teste de Bonferroni).



Estudos realizados por Fernandes (2008) afirmaram que a injeção (s.c) intraplantar da ConM (0,1mg/Kg) induziu no seu pico de ação edematogênica um significativo aumento ( $67,3 \pm 4,8$ ; ASC) de permeabilidade vascular (cerca de 37%) nas patas dos animais em relação aos controles ( $49,1 \pm 4,8$ ; ASC), que receberam o mesmo volume de salina, tal estudo condiz com os resultados apresentado neste estudo com a ConM II.

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

Na cavidade peritoneal ela desencadeia o aumento da permeabilidade vascular e da migração de neutrófilos através da ativação de macrófagos e mastócitos (SOUZA *et. al.* 1988) sendo a reação 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).

O estudo evidenciou que a ConM II possui efeito antiinflamatório quando testada no modelo de peritonite. A alteração na permeabilidade dos vasos pode está relacionada com a ligação da lectina ao endotélio dos vasos, levando à redução da permeabilidade e impedindo a

entrada dos neutrófilos no tecido. Pode ser considerado também a ligação da proteína com glicídios na superfície dos neutrófilos, impedindo sua adesão ao endotélio.

#### 4.5.4.2 Efeito da ConM II no Tratamento Subcrônico em Camundongos

Ao ser administrada em um esquema posológico de dose diária única durante quatorze dias consecutivos, ConM II (1 mg/Kg; e.v.) não afetou de forma significativa a massa corporal e o peso úmido dos órgãos avaliados nos camundongos (fígado, rim e coração), mas alterou baço, quando comparado com os animais do controle que receberam salina estéril no mesmo esquema posológico.

Exceto o baço, todos os órgãos avaliados demonstraram aparência normal e ausência de edema ao final do tratamento subcrônico com as lectinas. Adicionalmente, a avaliação macroscópica do estômago mostrou que sua mucosa permaneceu intacta e sem lesões visíveis nos dois grupos avaliados. Os valores obtidos para uréia e creatinina não foram significativamente diferentes dos animais controle.

Quando comparado com o controle (Salina) a função hepática avaliada pela cinética das enzimas hepáticas (alanina amino transferase-ALT e aspartato amino transferase-AST). O tratamento com a nova lectina também não alterou o número de leucócitos circulantes no sangue o que indica que não houve efeito nos tecidos linfoides. A dose utilizada no tratamento agudo foi à mesma que demonstrou atividade antiinflamatória (Tabela 9).

A nova lectina (ConM II) não promoveu alterações dos parâmetros sanguíneos, bem como nos órgãos dos animais. Esses resultados corroboram com os resultados já obtidos em estudos realizados por Fernandes (2008) com lectinas isoladas de *C. maritima* (ConM), de *C. boliviana* por Figueiredo e colaboradores (2009) e em estudos embasados na alga vermelha *Hypnea cervicornis* (BITENCOURT, 2007).

**Tabela 8** - Efeito da ConM II sobre o peso corporal e o peso úmido dos órgãos de camundongos.

Paramêtros	Tratamento (0.1 mL; i.v.)	
	Salina	ConM II (1 mg/Kg)
Massa corporal (g) antes	26,77 ± 2.4	29.54 ± 1.6
Massa corporal (g) depois	30,89 ± 1.2	31,87 ± 3.2
Fígado (g/20 g peso corporal)	0,967 ± 0.4	1,103 ± 0,5
Rim (g/20 g peso corporal)	0,188 ± 0,45	0,203 ± 0,21
Coração (g/20 g peso corporal)	0,123 ± 0,07	0,114 ± 0,18
Total leucócitos×10 <sup>6</sup> /ml	6,045 ± 3.4	7,102 ± 0.9
Neutrofilos×10 <sup>6</sup> /ml	1,577 ± 1.9	1,456 ± 0.8
Uréia (mg/dl)	51,22 ± 1.4	51,34 ± 1.9
Creatinina (mg/dl)	0,315 ± 0,14	0,302 ± 0,9
ALT (U/l)	45,60 ± 3.2	50,23 ± 1.4
AST (U/l)	86,33 ± 3,1	88,45 ± 2.1

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Pode-se concluir que o referido estudo alcançou todos os objetivos propostos, uma vez que possibilitou a realização do isolamento, purificação e determinação das atividades biológicas de uma nova lectina (ConM II) presente em sementes da leguminosa *Canavalia maritima*.

Quanto às atividades biológicas, foram determinados parâmetros antifúngicos, antibacterianos, de citotoxicidade e antiinflamatórios, onde concluiu-se que a nova lectina de sementes de *Canavalia maritima* é anti-inflamatória, inibe algumas cepas de fungos e na concentração que foi utilizada não apresentou atividade antibacteriana. Observou-se ainda que a nova lectina da *Canavalia maritima* (ConM II) apresenta ação citotóxica para apenas um tipo de eritrócito humano tipo B.

As complicações decorrentes de infecções por fungos ou bactérias são um desafio para a medicina, por este motivo, se faz a busca de produtos bioativos que venha a mitigar esses tipos de infecções que se perpetuam como um grande desafio para a ciência até os dias atuais. Dessa forma, o desenvolvimento de pesquisas que visem o isolamento, purificação e caracterização de novas biomoléculas (lectinas) tornam-se um grande aliado da ciência na busca de compostos que possam combater as infecções por microrganismos patológicos.

Através do presente trabalho, foi estabelecido um protocolo de isolamento e purificação de uma nova lectina (ConM II) presente em extratos de sementes de *Canavalia maritima*. Com a continuidade do trabalho, haverá perspectiva de cristalização da nova lectina, permitindo a resolução de sua estrutura tridimensional, que será usada na elucidação a nível molecular das atividades biológicas aqui relatadas.

## 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.; ASSREUY, A.M.; HAVT, A.; BENEVIDES, R.G.; MOURA, T.R.; SOUSA, R.B.; RIBEIRO, R.A.; CUNHA, F.Q.; CAVADA, B.S. Vaitarea macrocarpa (leguminosae) lectin activates cultured macrophages to release chemotactic mediators. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, v. 374, n. 4, p. 275-282, 2007.
- ALLIGIANAIS, N.; KALPOTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINO, I. B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.40, p.4168-4170, 2001.
- 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. Antiinflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from Brazilian beans. *Mediators Inflamm.*, v. 6, p. 201-210, 1997.
- ATHAMNA, A. et al. Rapid identification of *Mycobacterium* species by lectin agglutination. *Journal of Microbiological Methods*, v. 65, n. 2, p. 209-215, 2006.
- BAUER, A. W. M. M.; KIRBY, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, v.45, n.3, p. 493-496, 1966.
- BALZARINI, J.; HATSE, S.; VERMEIRE, K.; PRINCEN, K.; AQUARO, S.; PERNO, C.F.; DE CLERCQ, E.; EGBERINK, H.; VANDEN MOOTER, G.; PEUMANS, W.; VAN DAMME E.; SCHOLS, D. Mannose-specific plant lectins from the *Amaryllidaceae* family qualify as efficient microbicides for prevention of human immunodeficiency virus infection. *Antimicrob Agents Chemother*. Oct; v. 48, p. 3858-3870, 2004.
- BARRAL-NETTO, M.; SANTOS, S.B.; BARRAL, A.; MOREIRA, L.I.M.; SANTOS, C.F.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, J.T.A.; CAVADA, B.S. Human lymphocyte stimulation by legume lectins from the *Diocleae* tribe. *Immun. Invest.*, v. 21, n. 4, p. 297-303, 1992.

BENEVIDES, N. M. B; HOLANDA, M. L; MELO, F. R; FREITAS, A. L. P; SANPAIO, A. H. Purification and partial characterisation of the lectin from the marine red alga *Enantiocladia duperreyi* (C. Agardh) Falkenberg. *Botanica Manina*. v, 41. n, 5. p, 521-525, 1998.

BLUNDELL, T.L.; & JOHNSON, L.N.; *Protein Crystallography*. London: Academic Press (1976).

BREWER C. F., BHATTACHARYYA L. Specificity of concanavalin A binding to asparagine-linked glycopeptides. A nuclear magnetic relaxation dispersion study. *J. Biol. Chem.* 261:7306–7310. 1986.

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.

BIES, C.; LEHR, C. M.; WOODLEY, J. F. (2004). Lectin-mediated drug targeting: history and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 56, p. 425– 435

BOLINI, R.; CHRISPPEELS, M.J. Characterization and subcellular localization of vicilin and phytohemagglutinin, the two major reserve proteins of *Phaseolus vulgaris* L. *Planta*, v.142, p.292-298, 1978.

BRANDOLT, TM; KLAFKE, GB; CASARIN, T; SANTI-GADELHA, T; PINTO, LS; XAVIER, MO. Avaliação do Potencial antifúngico de Lectinas vegetais frente a fungos leveduriformes de importância em Micologia Médica. FURG - Campus Carreiros, 2012.

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* 8 ( 1), 31 – 36, 1996.

COELHO, M.B.; DE SOUZA, I.A.; FREIRE, M.G.M.; MARANGONI, S.; ANTUNES, E.; MACEDO, M.L.R. Neutrophil migration in mice induced by a mannose-binding lectin isolated from *Annona coriacea* seeds. *Toxicon*, v. 48, n. 5, p. 529-35, 2006.

COELHO, R.R.; SOUZA, E.P.; SOARES, P.M.G.; MEIRELES, A.V.P.; SANTOS, G.C.M.; SCARPARO, H.C.; ASSREUY, A.M.S.; CRIDDLE, D.N. Effects of chloride channel

blockers on hypotonicity-induced contractions of the rat trachea. *Br J Pharmacol*, v. 141, n. 2, p. 367–373, 2004.

CLEELAND, R.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials “in vitro” and in experimental animal infections. In: LORIAN, V. M. D. *Antibiotics in Laboratory Medicine*. Willians & Wilkins, p. 739-788, 1991.

CUNNINGHAM, B.A.; WANG, J.L.; WAXDAL, M.J.; EDELMAN, G.M. The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A II. Amino acid sequence of cyanogen bromide fragment F2. *J. Biol. Chem.*, v. 250, n.4, p.1503-1512, 1975.

DAM, T.K.; CAVADA, B.S.; GRANGEIRO, T.B.; SANTOS, C.F.; DE SOUSA, F.A.; OSCARSON, S.; BREWER, C.F. Diocleinae lectins are a group of proteins with conserved binding sites for the core trimannoside of asparaginelinked oligosaccharides and differential specificities for complex carbohydrates. *J Biol Chem*, v. 273, n. 20, p. 12082-88, 1998.

DELATORRE, P. Crystal structure of a lectin from *Canavalia maritima* (ConM) bin complex with trehalose and maltose reveals relevant mutation in ConA-like lectins. *Journal of Structural Biology* v. 154, p. 280–286, 2006.

DELBAERE, Louis; VANDONSELAAR, Margaret; PRASAD, Lata, QUAIL, Wilson; WILSON, Keith; DAUTER, Zbigniew. Structure of the Lectin IV of *Griffonia simplicifolia* and its Complex with the Lewis b Human Blood Group Determinant at 2.0 Å Resolution. *Journal of Molecular Biology*, v. 230, n. 3, p. 950-965, 1993.

.DUBOIS, M., GILES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A., SMITH, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350–356.

DOYLE. R. J.; SLIFKIN, M. *Lectin–Microorganism Interactions*, New York: Marcel Decker, Inc., 1994.

D’ARCY, W.C. *Canavalia*. Flora of Panamá. (Leguminosae). In: WOODSON, R.; SCHERY, R.W. Eds *Ann Miss Bot Gar*, v. 67, n. 3, p. 562-571, 1980.

ELOFF, J. N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Plnata Medica*, v.64, p.711-713, 1988.

ENGEL M, BACHMANN M, SCHRODER HC, RINKEVICH B, KLJAJIC Z, UHLENBRUCK G, MULLER WEG 1992. A novel galactose and arabinose-specific lectin from the sponge *Pellina semitubulosa*: Isolation, characterization and immunobiological properties. *Biochimie* 74: 527-537. [ [Links](#) ]

ETZLER, M.E. In: The lectins: properties, functions and applications in Biology and Medicine, pp. 371-435. Liemer, I.E.; Sharon, N.; and Goldstein, I.J., Eds, Academic Press, 1986

FARIAS, D. L. “Cristalização de uma lectina de sementes da leguminosa *Dioclea virgata*”, Monografia, Universidade Federal da Paraíba, 2007.

FAVACHO, A. R. M.; CINTRA, E. A.; COELHO, L. C. B. B.; LINHARES, M. I. S. (2007). In vitro activity evaluation of *Parkia pendula* seed lectin against human cytomegalovirus and herpes virus 6. *Biologicals*, v. 35, p. 189-194.

FRANCISCO-DO-PRADO, J.; ZAMBELLI, J.E.; MELO-LIMA M.H; RIBEIRODASILVA, G. The hyperinsulinemia produced by concanavalin A in rats is opioiddependent and hormonally regulated. *Braz J Med Biol Res*, v. 31, p. 697-703, 1998.

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.

FREIRE, M.G.M.; DESOUSA, I.A.; SILVA, A.C.M.; MACEDO, M.L.R.; LIMA, M.S.; TAMASHIRO, W.M.S.C.; ANTUNES, E.; MARANGONI, S. Inflammatory responses induced in mice by lectin from *Talisia esculenta* seeds. *Toxicon*, v. 42, n. 3, p. 275-280, 2003.

GADELHA, C. A. A., MORENO, F. B. M. B., GADELHA, T. S., CAJAZEIRAS, J. B., ROCHA, B. A. M., RUSTIGUEL, J. K. R., FREITAS, B. T., CANDURI, F., DELATORRE, P., AZEVEDO JR, W. F., CAVADA, B. S. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a lectin from *Canavalia maritima* seeds . *Acta Crystallographica F*, Dinamarca, v. F61, p. 87-89, 2005.

GOLDSTEIN, I.J.; HUGHES, R.C.; MONSIGNY, M.; OZAWA, T.; SHARON, N. What should be called a lectin? *Nature*, v. 285, n. 66, p.60, 1980.

GOMES, J.C.; FERREIRA, R.R.; CAVADA, B.S.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, J.T.A. Histamine release induced by glucose (mannose)-specific lectins isolated from Brazilian beans: comparison with concanavalin A. *Ag. Actions.*, v. 41, p. 132-135, 1994.

HAVT, A.; BARBOSA, P.S.; SOUSA, T.M.; MARTINS, A.M.; NOBRE, A.C.; NASCIMENTO, K.S.; TEIXEIRA, E.H.; PINTO, V.P.; SAMPAIO, A.H.; FONTELES, M.C.; CAVADA, B.S.; MONTEIRO, H.S. Renal alterations promoted by the lectins from *Canavalia ensiformis* (ConA) and *Dioclea guianensis* (DguiL) seeds. *Protein Pept Lett.* V. 10, p. 191-197, 2003.

HADACEK, F. GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochemical Analyses*, v. 11, p. 137-147, 2000.

HATAKEYAMA T, NAGATOMO H, YAMASAKI N 1995. Interaction of the hemolytic lectin cel-III from the marine invertebrate *Cucumaria echinata* with the erythrocyte membrane. *J Biol Chem* 270: 3560-3564. [ [Links](#) ]

HOLETZ, F. B.; HOWES, M. J.; LEE, C. C.; STEVENTON, G. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

HOUGHTON, P. J.; HOWES, M. J.; LEE, C. C.; STEVENTON, G. Uses and abuses of in vitro tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. *Journal of Ethnopharmacology*, v.110, p.391-400, 2007.

JANCARIK, J., KIM, S. H. Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. *J. Appl. Crystallogr.* 24, 409-411. 1991

KENNEDY, J. F. et al. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. *Carbohydrate Polymers*, v. 26, n. 3, p. 219-30, 1995.

KAUR, M.; SINGH, K.; RUP, P. J.; SAXENA, A. K.; KHAN, R. H.; ASHRAF, M. T.; KAMBOJ, S. S.; SINGH, J. A tuber lectin from *Arisaema helleborifolium* Schott with anti-insect activity against melon fruit fly, *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) and anti-cancer effect on human cancer cell lines. *Arch.Biochem.Biophys.*, v.445, n.1, p.156-165, 2006.

KOCOUREK, L ; V. HOREJSI. A note of the recent discussion of definition of the term "lectin". In T.e. Bog-Hansen & G.A. Splengler, eds. Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry, vol. 3, pp 3-6, Walter de Gruyter, Berlin. 1983.

KLEHA, J.F.; DEVESLY, P.; JOHNS, A. The effects of lectins on the release of EDRF from rabbit aorta. Br J Pharmacol, v. 104, n.2, p. 287-288, 1991.

LEAL, A. Novo método para marcação com lectinas em fungo filamentoso. In: 5° Congresso Brasileiro de Micologia, Programação e resumos, Recife, 2007.

LESLIE, A.G.W. (1994) MOSFLM User's Guide: MOSFLM Version 5.50. MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, England.

LIS, H. AND N. SHARON, Lectins: Carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. Chem. Rev., 98: 637-674. [PubMed](#). 1998.

LIMA, R.F.; CRIDDLE, D.N.; SOUZA, E.P.; SAMPAIO, A.H.; NASCIMENTO, K.S.; CAVADA, B.S.; ASSREUY, A.M. Red marine alga Bryothamnion triquetrum lectin induces endothelium-dependent relaxation of the rat aorta via release of nitric oxide. Pharm Pharmacol, v. 56, n. 11, p. 1415-21, 2004.

LÓPEZ, BP; GARCIA, JRS; LEDEZMA,JA; SEVILLA, HFA. POTENCIAL DE Canavalia maritima E Indigofera hirsuta COMO FORRAJE PARA RUMIANTES, Revista Verde v.4, n.2, p. 01 – 04, Mossoró – RN – Brasil, 2009.

LOBSANOV, Y.D; GITT, M.A; LEFFLER, H; BARONDES, S.H; RINI, J.M. X – ray crystal structure of the human dimérica S – Lac lectin, L – 14 – II, in complex with lactose at 2.9Å resolution. Journal of Biological Chemistry, v. 268, p. 27034 – 38, 2003.

LORIS, R. Principles of structures of animal and plant lectins. Biochimica Et Biophysica acta – General Subjects, Amsterdam, v. 1572, n. 2-3, p. 198 – 208, 2002.

MORENO, J.; CHRISPEELS, M. J. A lectin gene encodes the a-amylase inhibitor of the common bean. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 86. p. 7885-7889, 1989.

MIRKOV, T.E.; WAHLSTROM, J.M.; HAGIWARA, K.; FINARDI FILHO, F.; KJEMTRUP, S.; CHRISPEELS, M.J. Evolutionary relationships among proteins in the

phytohemagglutinin-arcelin-amylase inhibitor family of the common bean and its relatives. *Plant Mol. Biol.*, v.23, p.1103-1113, 1994.

MIRELMAN, D.; GALUN, E.; SHARON, N.; LOTAN, R. Inhibition of fungal growth by wheat germ agglutinin. *Nature*, v.256, p.414-16, 1975.

MOREIRA, R.A. & CAVADA, B.S. Lectin from *Canavalia brasiliensis* (Mart.). Isolation and characterization and behavior during germination. *Biologia Plantarum*, v. 26, n. 2, p. 113-120, 1984.

MARTINS, A.M.; MONTEIRO, A.M.; HAVT, A., BARBOSA, P.S.; SOARES, T.F.; EVANGELISTA, J.S.; DE MENEZES, D.B.; FONTELES, M.C.; TEIXEIRA, E.H.; PINTO, V.P.; NASCIMENTO, K.S.; ALENCAR, N.M.; CAVADA, B.S.; MONTEIRO, H.S. Renal effects induced by the lectin from *Vatairea macrocarpa* seeds. *J Pharm Pharmacol.*, v. 57, n. 10, p. 1329-33, 2005.

MATOS, A.B., ARTILES, G.R., VALDÉS, L.H., OLIVER, P.H. Revisión Taxonômica del Género *Canavalia* DC. (Leguminosae-Papilionoideae) em Cuba, *Rev Acad Colomb Cienc*, v. 28, n. 107, p. 157-75, 2004.

MITSCHER, L. A.; LEU, R. P.; WU, N. W.; BEAL, J. L.; WHITW, R. Anticicrobial agents from higher plants I: Introduction, rationale and methodology. *Llodya*, v.35, n.2, p.157-166, 1972, 1972.

MOREIRA, R.A.; AINOUS, I.L.; OLIVEIRA, J.T.A.; CAVADA, B.S. Plant lectins, chemical and biological aspects. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 86, p. 211-218, 1991.

NORTHOVER, A.M.; NORTHOVER, B.J. Lectin-induced increase in microvascular permeability to colloidal carbon in vitro may involve protein kinase C activation. *Ag Actions*, v. 41, n. 3-4, p. 136-39, 1994.

NAPIMOGA, M.H; CAVADA, B.S.; ALENCAR, N.M.; MOTA, M.L.; BITTENCOURT, F.S.; ALVES-FILHO, J.C.; GRESPAN, R.; GONÇALVES, R.B.; CLEMENTENAPIMOGA, J.T.; PARADA, C.A.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. *Lonchocarpus sericeus* lectin decreases leukocyte migration and mechanical hypernociception by inhibiting cytokine and chemokines production. *Int. Immunopharmacol.* v.7, p. 824- 35, 2007.

NCCLS, Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica dos Fungos Filamentosos: Norma Aprovada M38-A Vol. 22 No. 16 Substitui a Norma M38-P Vol. 18 No. 3. 2002

NEVES, S.A.; FREITAS, A.L.; SOUSA, B.W.; ROCHA, M.L.; CORREIA, M.V.; SAMPAIO, D.A.; VIANA, G.S. Antinociceptive properties in mice of a lectin isolated from the marine alga *Amansia multifida* Lamouroux. *Braz J Med Biol Res.* v. 40, p.127-34, 2007.

NAQVI, S. H.; KILIAN, M. S. Y.; VOHORA, S. B. Anti-bacterial, antifungal and antihelminthic investigations on Indian medicinal plants. *Fitoterapia*, v. 62, n. 3, p. 221-228, 1991.

NATTINAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS-NCCLS. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. 7 ed. Villanova. PA: NCCLS, 2000.

PANDO, L. A.; CARVALHO, D. D.; TOYAMA, M. H.; DI CIERO, L.; NOVELLO, J. C.; PASCHOLATTI, S. F.; MARANGONI, S. Purification and characterization of a lectin from *Crotalaria paulina* seeds. *The Protein Journal*, v. 23, n. 7, p. 437-444, 2004.

PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E.J.M. Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiol.*, v. 109, n. 2, p. 347-52, 1995.

PARK, R.; KIM, M. S.; SO, H. S.; JUNG, B. H.; MOON, S. R.; CHUNG, S. Y.; KO, C. B.; KIM, B. R.; CHUNG, H. T. Activation of c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK 1) in mistletoe lectin II induced apoptosis of human myeloleukemic U937 cells. *Biochemical Pharmacology*, v. 60, p. 1685-1691, 2000.

PAJIC I, KLJAJIC Z, DOGOVIC N, SLADIC D, JURANIC Z, GASIC MJ 2002. A novel lectin from the sponge *Haliclona cratera*: isolation, characterization and biological activity. *Comp Biochem Phys C 132*: 213-221. [ [Links](#) ]

PIRES, A.F. Atividade Antinociceptiva de uma Lectina de Semente de *Canavalia brasiliensis* MART. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas. Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2008.

RAMOS, M. V; MOREIRA, R.A; CAVADA, B. S; OLIVEIRA, J. T. A; ROUGE, P. Interaction of lectins from the sub - tribe diocleinae with Specific Ligands. R.Bras.Fisiol.Veg., 8(3):193-199, 1996.

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

RINI, J.M. Lectin structure. Annual Reviews of Biophysics and Biomolecular Structure, v.34, p.551-577, 1995.

RÜDIGER, H. Plant lectins-More than just tools for glycoscientists: Occurrence, structure, and possible functions of plant lectins. Acta Anatomica, v.161, p.130-152, 1998.

SHARON, N.; LIS, H. Legume lectins – a large family of homologous proteins. FASEB J, v. 14, n. 4, p. 3198-208, 1990.

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

SEENA, S.; SRIDHAR, K.R.; BHAGYA B. Biochemical and biological evaluation of an unconventional legume, *Canavalia maritima* of coastal sand dunes of India. Tropical and subtropical agroecosystems, v. 5, n.1, p.1-14, 2003.

STILMARK, H. Ricin, a toxic enzyme from seeds of *Ricinus communis*L. and some other Euphobiaceae. Dissertation, Medical School of Dorpat, Estonia, 1988.

SANZ-APARÍCIO, J.; HERMOSO, J.; GRANJEIRO, T.B.; CALVETE, J.J.; CAVADA, B.S. The crystal structure of *Canavalia brasiliensis* lectin suggests a correlation between its quaternary conformation and its distinct lectin biological properties from Concanavalin A. FEBS Letters, v. 405, n. 1, p. 114-8, 1997.

SÁ, R.A.; GOMES, F. S.; NAPOLEÃO, T. H.; SANTOS, N. D. L.; MELO, C. M. L.; GUSMÃO, N. B.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G.; BIEBER, L. W. (2009a). Antibacterial and antifungal activities of *Myracrodruon urundeuva* heartwood. Wood Science and Technology 45, 85-95.

SEPCIC K, BATISTA U, VACELET J, MACEK P, TURK T 1997. Biological activities of aqueous extracts from marine sponges and cytotoxic effects of 3-alkylpyridinium polymers from *Reniera sarai*. *Comp Biochem Phys C* 117: 47-53. [ [Links](#) ]

SOUZA, V.C; LORENZI, H. Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseada em APG II, Instituto Platarum, Nova Odessa, São Paulo, 640p.

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.

TRIGUEROS, V., LOUGARRE, A., ALI-AHMED, D., RAHBÉ, Y., GUILLOT, J., CHAVANT, L., FOURNIER, D., PAQUEREAU, L. Xerocomus chrysenteron lectin: identification of a new pesticidal protein. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1621, p. 292-298, 2003.

TUNKIJJANUKIJ S, OLAFSEN JA 1998. Sialic acid-binding lectin with antibacterial activity from the horse mussel: further characterization and immunolocalization. *Dev Comp Immunol* 22: 39-150. [ [Links](#) ]

VANCARI, Fernando Celestino Moreira, Cristalização e resolução de estrutura das proteínas *Canavalia gladiata* lectin (CGL) e *Canavalia marítima* lectin (CML) complexadas ao açúcar manose 1-6 manose, Tese de Doutorado. São João do Rio Preto, 2010.

VAN DAMME, E. J. M. et al. The NeuAc( $\alpha$ -2,6)-GalNAc-binding lectin from elderberry (*Sambucus nigra*) bark type-2 ribosome-inactivating protein with an unusual specificity and structure. *European Journal of Biochemistry*, v. 235, p. 128-137, 1996.

Plant Lectins: 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. 575-592, 1998.

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. 575-592, 1998.

VIANA, G.S.B.; FREITAS, A.L.P.; LIMA, M.M.L. et al. Antinociceptive activite of sulfated carbohydrates from the red algae *Bryothamnion seaforthii* (Turner) Kutz and *B. triquetrum* (S.G.Gmel.) M. Howe. *Braz. J Med Biol Res*, v. 35, p. 713-722, 2002.

VAN PARIJS, J; BROEKAERT, W.F; GOLDSTEIN, I.J; PEUMANS, W.J. An antifungal pretein from rubber tree ( *Hevea brasiliensis*) latex. *Planta*, v. 183, p. 258 – 262, 1991.

WANG, H. X.; NG, T. B. Concurrent isolation of a Kunitz-type trypsin inhibitor with antifungal activity and a novel lectin from *Pseudostellaria heterophylla* roots. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 342, n. 1, p. 349-353, 2006.

WANG, H.; NG, T.B. Ribosome inactivating protein and lectin from Bitter Melon (*Momordica charantia*) seeds: sequence comparison with related proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.253, p.143-146, 1998.

Weis WI, Drickamer K. base estrutural de reconhecimento lectina-carboidratos. *Annu Rev Biochem.* , 1996; 65 . :441-473 [ [PubMed](#) ]

WOUNG-LEUNG, Y. L. Antimicrobial activities of some Hon-Kong plants used in chinese medicine. *Fitoterapia*, v. 69, n.1, p. 11-16, 1988.

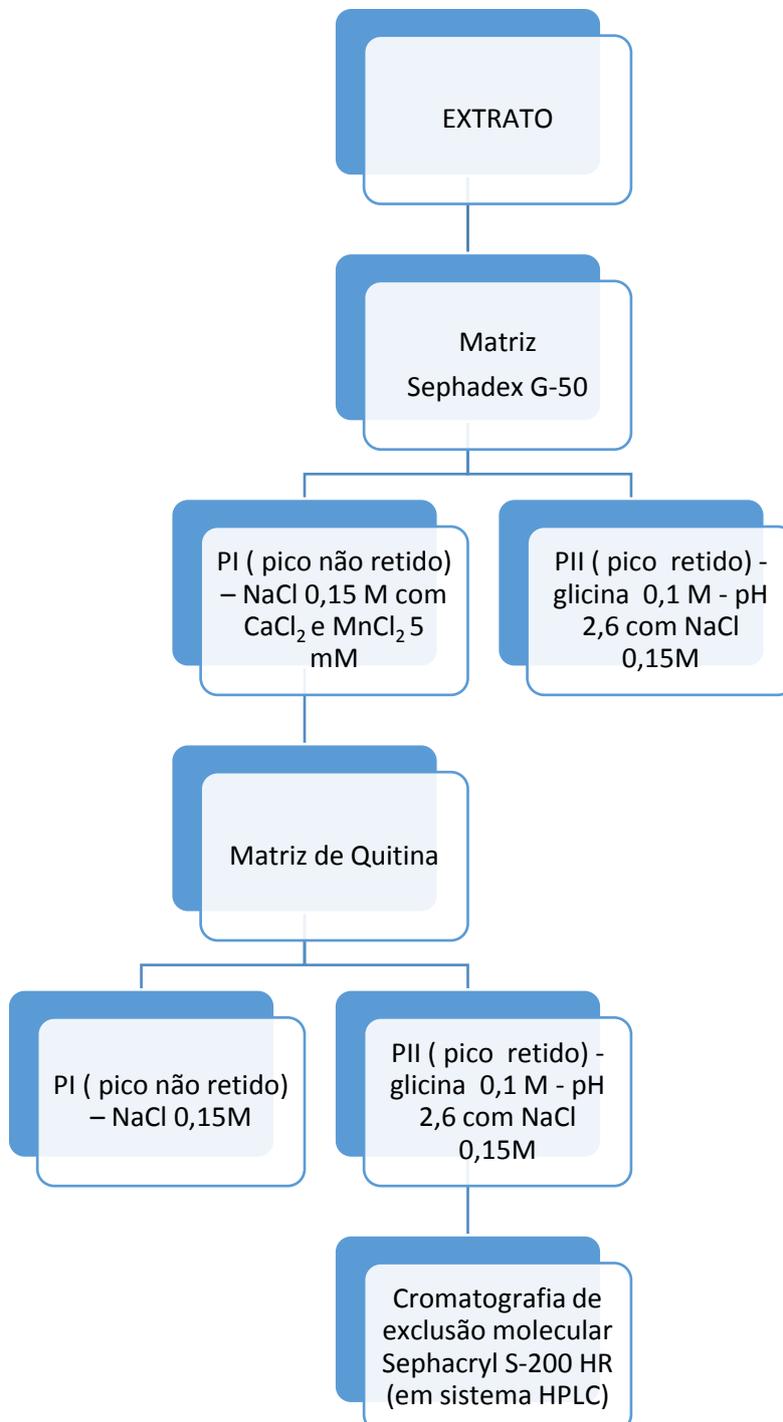
YE, X. Y.; NG, T. B. Peptides from pinto bean and red bean with sequence homology to cowpea 10-KDA protein precursor exhibit antifungal, mitogenic, and HIV-1 reverse transcriptase-inhibitory activities. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.285, p. 424-429, 2001.

ZHANG, L.; HSU, C.H.; ROBINSON, C.P. Effects of ricin administration to rabbits on the ability of their coronary arteries to contract and relax in vitro. *Toxicol App Pharmacol*, v. 129, n. 1, p. 16-22, 1994.

ZANETTI, G.D. Lectinas dos Rizomas de *Arundo donax* L.: Purificação, Caracterização, Propriedades, Imuno-histoquímica e separação das isoformas. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Botânica) – Programa de Pós-graduação em Botânica. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.

# APÊNDICE

## APÊNDICE



**ANEXO**