

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR**

CLÉBIA VIEIRA CRISÓSTOMO

**POLISSACARÍDEO ENDOSPÉRMICO DE *Bauhinia pentandra*:
CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DE INTERAÇÃO COM LECTINAS**

**FORTALEZA
2008**

C949p Crisóstomo, Clébia Vieira
Polissacarídeo endospermico de Bauhinia pentandra: caracterização e estudo de interação com lectinas / Clébia Vieira Crisóstomo, 2008.
100f. ;il. color. enc.

Orientador: Prof. Dr. Renato de Azevedo Moreira
Co-orientadora: Profa. Dra. Daniele Maria Alves Teixeira Sá
Área de concentração: Bioquímica vegetal
Tese (doutorado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências.
Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular, Fortaleza, 2008.

1. Galactomanana 2. Bauhinia 3. Lectina Galactose ligante I. Moreira,
Renato de Azevedo (orient.) II. Sá, Daniele Maria Alves Teixeira (co-
orient.) III. Universidade Federal do Ceará – Pós-graduação em Bioquímica
IV. Título

CDD 574.192

CLÉBIA VIEIRA CRISÓSTOMO

**POLISSACARÍDEO ENDOSPÉRMICO DE *Bauhinia pentandra*:
CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DE INTERAÇÃO COM LECTINAS**

TESE SUBMETIDA À COORDENAÇÃO DO CURSO DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA, COMO
REQUISITO PARCIAL PARA OBTENÇÃO DO GRAU
DE DOUTOR EM BIOQUÍMICA.

ORIENTADOR: PROF. DR. RENATO DE AZEVEDO
MOREIRA

CO-ORIENTADORA: PROFA. DRA. DANIELE MARIA
ALVES TEIXEIRA SÁ

FORTALEZA

2008

CLÉBIA VIEIRA CRISÓSTOMO

**POLISSACARÍDEO ENDOSPÉRMICO DE *Bauhinia pentandra*:
CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DE INTERAÇÃO COM LECTINAS**

Tese submetida à coordenação do curso de pós-graduação em Bioquímica, como requisito parcial para obtenção do grau de doutor em Bioquímica.

Aprovada em / / 2008

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Renato de Azevedo Moreira (Orientador)
Depto. Bioquímica e Biologia Molecular -
Universidade Federal do Ceará.

Profa. Dra. Daniele Maria Alves Teixeira Sá (Co-orientadora)
Universidade Estadual do Ceará – UECE.

Profa. Dra. Ana Cecília Góes Horta.
Depto. Bioquímica e Biologia
Molecular -
Universidade Federal do Ceará.

Profa. Dra. Ana Cristina de O. Monteiro
Moreira.
Centro de Ciências da Saúde -
Universidade de Fortaleza.

Profa. Dra. Maria Izabel Gallão.
Depto. Biologia - Universidade Federal
do Ceará.

Profa. Dra. Maria Izabel Florindo
Guedes.
Universidade Estadual do Ceará.

A Deus,

Por me proporcionar toda uma vida abençoada, colocando em meu caminho pessoas e acontecimentos maravilhosos.

Aos meus pais José e Guedinha

Por tudo que foram e fizeram para que eu chegasse até aqui, ensinando-me sempre a lutar com dignidade e coragem.

Agradeço.

Ao meu esposo Marcelo Neiva

Pelo seu exemplo de determinação e dedicação, bem como, sua ajuda, incentivo e paciência constantes,

Aos meus filhos Caio e Guilherme

Por serem a fonte de inspiração e coragem para eu seguir em frente.

Dedico.

De forma especial a minha tia Sonia

Por está sempre presente em minha vida de forma tão positiva, encorajando-me com seu exemplo de mulher forte e otimista.

Aos meus irmãos

Com muito amor e respeito, por serem um exemplo de força, batalha e perseverança na vida.

Ofereço.

Agradecimentos

Ao professor Renato de Azevedo Moreira pela sua orientação, ensinamentos, amizade e compreensão constantes demonstrados durante todo esse período.

De forma especial à amiga e co-orientadora Daniele Maria Alves Teixeira de Sá, pela sua valiosa colaboração, dedicação, amizade e apoio, fundamentais para a realização desse trabalho.

A professora Ana Cecília pelas sugestões, companheirismo e amizade sempre demonstrados.

A professora Maria Isabel Gallão, por sua ajuda amiga durante muitas vezes ofertadas no decorrer dessa minha jornada.

As profas. Ana Cristina de Oliveira Monteiro Moreira e Isabel Florindo, por aceitar compor a banca de avaliação desse trabalho.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.

A doutora Jeanny da Silva Maciel do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, por sua importante colaboração nesse trabalho.

A professora Carmem Petkowicz do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná pela contribuição valiosa dada em algumas etapas dessa pesquisa.

Especialmente à bolsista e amiga Morgana Vitorino, por sua imensa ajuda e companheirismo durante esse tempo.

A todos os amigos do Laboratório: Álvaro Marcos, Gabriela, Patrícia Gadelha, David Landim, Alexandra Feitosa, Wagner, Sonia, Ana Angélica, Rosa, Fábria, bem como de outros laboratórios, que sempre colaboram tanto de diversas formas na realização desse trabalho.

De maneira especialmente carinhosa as amigas Lia Magalhães, Renata Braga, Gislainy Barbosa e Lúcia Betânia por terem acompanhado de perto minha jornada, sempre ajudando e me dando forças para seguir.

Aos meus sogros, Amadeu Lourenço e Rosa Neiva, por terem me acolhido como filha, dando-me o apoio necessário para a realização desse Doutorado.

Com carinho as minhas queridas cunhadas Deusa, Sandra, Kenia, Fernanda, Andréa e estimável cunhado Alexandre Neiva pela força e confiança.

E a todos que não citei aqui, mas que direta ou indiretamente contribuíram com esse trabalho, meu muito obrigado.

Este trabalho foi realizado graças as seguintes instituições:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), através de convênios firmados com o Curso de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará.

Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior – CAPES

Fundação Cearense de Amparo a Pesquisa – FUNCAP

Laboratório de Carboidratos Vegetais da Universidade Federal do Paraná - UFPR.

Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará.

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

.

RESUMO

Devido às suas diferentes propriedades químicas, tais como capacidade de formar soluções viscosas ou géis em meio aquoso, o isolamento e caracterização de galactomananas têm sido de grande importância.

Nesse trabalho a galactomanana do endosperma da semente de *Bauhinia pentandra* foi isolada e caracterizada, apresentando-se homogênea por GPC. Este polissacarídeo foi demonstrado ser uma galactomanana clássica formada por uma cadeia linear de manose unidas por ligações $\beta(1-4)$ com substituições de galactose em ligação $\alpha(1-6)$ com uma proporção Man:Gal de 2,5:1, e viscosidade intrínseca em água de 10,1 dL/g.

A galactomanana foi avaliada quanto à capacidade de interagir com lectinas galactose ligante. O polissacarídeo foi tratado com epiclórídria e o material obtido foi utilizado para a montagem de coluna cromatográfica de afinidade. Extratos ricos em lectinas de *Artocarpus incisa*, *Artocarpus integrifolia* e *Bauhinia pentandra* foram aplicados e frações lectínicas purificadas foram obtidas.

A capacidade da galactomanana de *B. pentandra* em reter a lectina (LBp) da mesma semente foi comparada com a matriz de galactomanana de *Adenantera pavonina*, *Caesalpineia pulcherrima*, *Sophora japonica* e com a matriz comercial Sepharose 4B. Apesar da galactomanana de *B. pentandra* ter apresentado a menor capacidade de retenção frente às demais, ela mostrou-se semelhante à matriz comercial, sendo viável a sua utilização.

PALAVRAS-CHAVE: Galactomanana; *Bauhinia*; Lectina galactose ligante.

ABSTRACT

Due to the chemical properties differences, such as the ability to make viscous solution or aqueous gels, the study of the galactomannans has been too important.

In this study, the endospermic galactomannans from seeds of *Bauhinia pentandra* was isolated and partially characterized. This polysaccharide is a classical galactomannan constituted by a linear chain of mannose linked by $\beta(1-4)$ linkages with galactose substituents linked by $\alpha(1-6)$ linkages, resulting in a Man:Gal ratio of 2.5:1, and water intrinsic viscosity equal to 10.1 dL/g.

Galactomannan was evaluated in ability to interact with galactose-binding lectins. The polysaccharide was treated with epichlorohydrin and the material obtained was utilized to make the affinity chromatography matrix. Lectin-rich extracts from *Artocarpus incisa*, *Artocarpus integrifolia* and *Bauhinia pentandra* were applied and lectin fractions were obtained, thus, the affinity matrix showed to be efficient to isolate them.

The retention capacity of the galactomannan from *B. pentandra* was compared with galactomannan matrix from *Adenanthera pavonina*, *Caesalpinia pulcherrima*, *Sophora japonica* and commercial matrix of Sepharose 4B in regards to the isolation of the lectin from *B. pentandra* (LBp). Although the galactomannan matrix had been showed the smallest retention capacity in comparison with the others, it is equivalent to the commercial matrix, enabling your utilization.

Key-words: Galactomannan; *Bauhinia*; Lectin.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 -	Classificação taxonômica e detalhes de folha (A), flor (B) e fruto (C) de <i>Bauhinia pentandra</i> .	18
FIGURA 02 -	Estrutura da parede celular vegetal.	23
FIGURA 03 -	Estrutura clássica das galactomananas vegetais.	35
FIGURA 04 -	Esquema de subunidades lectínicas	38
FIGURA 05 -	Estrutura da lectina de <i>Canavalia ensiformes</i> (Con A).	41
FIGURA 06 -	Fluxograma de obtenção do endosperma e obtenção das massas secas dos tecidos da semente de <i>B. pentandra</i> .	49
FIGURA 07 -	Fluxograma de obtenção do polissacarídeo endospermico de <i>B. pentandra</i> .	52
FIGURA 08 -	Fluxograma de obtenção do polissacarídeo endospermico de semente de <i>B. pentandra</i> hidrolizado em TFA 2 M.	53
FIGURA 09 -	Reticulação do polissacarídeo pela epícloridrina.	58
FIGURA 10 -	Fluxograma de extração protéica de farinha delipídada de <i>B. pentandra</i> e cromatografia de afinidade em matriz de galactomanana de <i>B. pentandra</i> .	61
FIGURA 11 -	Cromatografia em Camada Delgada do polissacarídeo endospermico da semente de <i>B. pentandra</i> .	67
FIGURA 12 -	Cromatografia de Permeação em Gel do Polissacarídeo Endospermico da Semente de <i>B. pentandra</i> .	67
FIGURA 13 -	Cromatografia líquido-gasosa do polissacarídeo endospermico hidrolizado da semente de <i>B. pentandra</i> .	68
FIGURA 14 -	Espectro de ^1H da galactomanana de <i>B. pentandra</i> .	70
FIGURA 15 -	Espectro de ^1H expandido da galactomanana de <i>B. pentandra</i> .	70
FIGURA 16a -	Espectro de HSQC da galactomanana de <i>B. pentandra</i> .	72
FIGURA 16b -	Espectro de HSQC da galactomanana de <i>B. pentandra</i> .	72

FIGURA 17 -	Espectro de COSY da galactomanana de <i>B.pentandra</i> .	73
FIGURA 18 -	Viscosidade da galactomanana de <i>B. pentandra</i> em viscosímetro capilar de Ostwald ref. 75	76
FIGURA 19a -	Perfil cromatográfico de afinidade em galactomanana de <i>B. pentandra</i> .	77
FIGURA 19b -	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS da fração retida da cromatografia de extrato total de sementes de <i>A. integrifolia</i> (jacalina).	77
FIGURA 20a -	Cromatografia de afinidade em galactomanana de <i>B. pentandra</i> e atividade hemaglutinante dos picos.	78
FIGURA 20b -	Eletroforese PAGE-SDS da fração retida em cromatografia de afinidade em galactomanana de <i>B. pentandra</i> contra extrato total de sementes de <i>B. pentandra</i> .	78

LISTA DE TABELAS

TABELA 01 -	Aplicações industriais de gomas exsudadas	27
TABELA 02 -	Algumas características dos principais polissacarídeos de reserva de parede celular e sua ocorrência	30
TABELA 03 -	Distribuição da proporção manose: galactose em espécies de <i>Leguminosae</i>	33
TABELA 04 -	Principais Galactomananas utilizadas comercialmente.	34
TABELA 05 -	Reticulação do polissacarídeo de <i>B. pentandra</i> .	57
TABELA 06 -	Caracteres morfológicos das sementes de <i>Bauhinia pentandra</i> e <i>Bauhinia unguolata</i> L.	63
TABELA 07 -	Massa seca média dos tecidos da semente de <i>B. pentandra</i> .	64
TABELA 08 -	Composição química do endosperma da semente de <i>B. pentandra</i> .	65
TABELA 09 -	Composição em monossacarídeo do polissacarídeo endospermico de <i>B. pentandra</i> avaliado por cromatografia líquido-gasosa (GLC).	69
TABELA 10 -	Deslocamento químico de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C (ppm) da galactomannana de <i>B. pentandra</i> .	73
TABELA 11 -	Posição e interpretação dos deslocamentos de ^{13}C a partir do HSQC para a galactomanana de <i>B. pentandra</i> a partir dos valores de α -galactopirranose e β -manopirranose.	74
TABELA 12 -	Valores de viscosidade intrínseca (solvente água) e relação M:G do polissacarídeo endospermico de <i>B. pentandra</i> comparado com os de outras leguminosas.	75
TABELA 13 -	Massa retida de Lectina de <i>B. pentandra</i> (LBp) em diferentes matrizes cromatográficas.	79

LISTA DE ABREVIATURAS

$\begin{array}{c} \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{CH} - \text{Cl} \\ \backslash \quad / \\ \text{O} \end{array}$	Epicloridrina
RMN	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
PAGE-SDS	Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
GLC	Cromatografia Líquido-Gasosa
TFA	Ácido Trifluoroacético
UH	Unidade Hemaglutinante
$[\eta]$	Viscosidade Intrínseca
η_o	Viscosidade Absoluta do Solvente
η_{rel}	Viscosidade Relativa
η_{esp}	Viscosidade Específica
T	Tempo de Escoamento da Solução
t_o	Tempo de Escoamento do Solvente
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
BSA	Albumina Sérica Bovina
GPC	Cromatografia de Permeação em Gel
D.O.	Densidade Ótica
KDa	Kilodalton
Man	Manose
Gal	Galactose
MN	Massa Molar Numérica Média
MW	Massa Molar Ponderal Média
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	12
LISTA DE ABREVIATURAS	13
1. INTRODUÇÃO	18
1.1. Considerações sobre o gênero <i>Bauhinia</i>	18
1.2. Característica da planta	21
1.3. Semente	21
1.4. Parede celular	22
1.4.1. Parede celular primária	24
1.4.1.1. Parede celular primária tipo I	24
1.4.1.2. Parede celular primária tipo II	24
1.4.2. Parede celular secundária	25
1.5. Gomas	25
1.5.1. Modificação química das gomas	27
1.6. Polissacarídeos de Reserva de Parede Celular (PRPC)	29
1.6.1. Grupo das Xiloglucanas	29
1.6.2. Grupo das Galactanas	30
1.6.3. Grupo das Mananas	31
1.6.3.1. Galactomananas	32
1.7 Lectinas	36
1.7.1. Definição	36
1.7.2. Classificação	37
1.7.2.1. Classificação quanto à estrutura protéica	37
1.7.2.2. Classificação quanto à especificidade por açúcares	38

1.7.3. Ocorrência	39
1.7.4. Atividade biológica	40
1.7.5. Detecção	42
1.7.6. Isolamento e Purificação	43
1.7.7. Aplicações	43
2. OBJETIVOS	45
2.1. Objetivo Geral	45
2.2. Objetivos Específicos	45
3. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL	46
4. MATERIAIS	47
4.1. Sementes	47
4.2. Substâncias químicas e reagentes	47
4.3. Hemácias	47
5. MÉTODOS	48
5.1. Caracterização morfológica da semente de <i>B. pentandra</i>	48
5.2. Obtenção do endosperma da semente de <i>B. pentandra</i>	48
5.3. Determinação da massa seca dos tecidos da semente	48
5.4. Determinação dos teores dos constituintes químicos do endosperma	49
5.4.1. Carboidratos totais	49
5.4.2. Nitrogênio total	50
5.4.3. Proteínas solúveis totais	50
5.4.4. Umidade	50
5.4.5. Cinzas	51
5.5. Obtenção de polissacarídeos do endosperma da semente de <i>B. pentandra</i>	51

5.6. Análise química do polissacarídeo de <i>B. pentandra</i>	51
5.7. Análise estrutural do polissacarídeo de <i>B. pentandra</i>	52
5.7.1. Hidrólise ácida	52
5.7.2. Cromatografia em camada delgada	53
5.7.3. Estimativa da massa molar por cromatografia de permeação em gel (GPC)	54
5.7.4. Redução e Acetilação	54
5.7.5. Cromatografia líquido-gasosa (GLC)	55
5.7.6. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear	55
5.8. Análise viscosimétrica	55
5.9. Modificação química do polissacarídeo de <i>B. pentandra</i>	57
5.9.1. Reticulação da galactomanana de <i>B. pentandra</i> com epiclorigrina	57
5.9.2. Reticulação das demais galactomananas estudadas	57
5.9.3. Montagem das colunas cromatográficas	58
5.10. Avaliação da matriz de afinidade da galactomana de <i>B. pentandra</i> no isolamento de lectinas galactose ligantes.	58
5.11. Interação da lectina galactose específica de <i>B. pentandra</i> (LBp) com a matriz de galactomanana de <i>B. pentandra</i>	59
5.11.1. Obtenção da farinha dos cotilédones	59
5.11.2. Obtenção da farinha delipidada de cotilédone de semente de <i>B. pentandra</i>	59
5.11.3. Extração protéica	59
5.11.4. Cromatografia de afinidade em galactomanana de <i>B. pentandra</i>	60
5.12. Interação da lectina galactose específica de <i>B. pentandra</i> em diferentes matrizes cromatográficas	60

5.13. Atividade hemaglutinante	61
5.14. Eletroforese em gel de poliacrilamida	62
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
6.1. Caracterização morfológica das sementes de <i>B. pentandra</i>	63
6.2. Determinação da massa seca dos tecidos da semente	63
6.3. Determinação dos teores dos constituintes químicos do endosperma da semente de <i>B. pentandra</i>	64
6.4. Isolamento do polissacarídeo do endosperma de semente de <i>B. pentandra</i>	65
6.5. Análise química do polissacarídeo obtido do endosperma de <i>B. pentandra</i>	66
6.6. Análise estrutural do polissacarídeo de <i>B. pentandra</i>	66
6.6.1. Cromatografia em camada delgada (CCD)	66
6.6.2. Cromatografia de permeação em gel (GPC)	66
6.6.3. Cromatografia gás-líquido (GLC)	68
6.6.4. Ressonância magnética nuclear (RMN)	69
6.7. Análise viscosimétrica do polissacarídeo endospermico de <i>B. pentandra</i>	74
6.8. Avaliação da galactomanana de <i>B. pentandra</i> como matriz de afinidade para lectinas galactose-ligantes.	76
6.9. Interação da lectina galactose ligante de <i>B. pentandra</i> em matriz de galactomanana de <i>B. pentandra</i>	77
6.10. Interação da lectina galactose específica de <i>B. pentandra</i> em diferentes matrizes cromatográficas	79
7. CONCLUSÕES	80
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações sobre o gênero *Bauhinia*

O gênero ***Bauhinia*** pertence à família *Fabaceae*, também conhecida como ***Leguminosae*** (VIANA *et al.*, 1999), a qual é a terceira maior família das angiospermas, com aproximadamente 700 gêneros e 18.000 espécies (POLHILL; RAVEN, 1981), muitas de importância econômica (TUCKER, 2003).

Na família *Fabaceae* três subfamílias são classificadas de acordo com dados morfológicos e análises moleculares de seqüências de DNA, em: ***Mimosoideae***, ***Caesalpinioideae*** e ***Faboideae*** também chamada de ***Papilionoideae*** (JUDD *et al.*, 1999; DOYLE *et al.*, 2000).

A classificação da espécie em estudo está descrita abaixo:

Reino: *Plantae*

Divisão: *Magnoliophyta*

Classe: *Magnoliopsida*

Ordem: *Fabales*

Família: *Fabaceae*

Subfamília: *Caesalpinioideae*

Tribo: *Cercideae*

Subtribo: *Bauhininae*

Gênero: *Bauhinia*

Espécie: *pentandra*.



A



B



C

Figura 1: Classificação taxonômica e detalhes de folha (A), flor (B) e fruto (C) de *Bauhinia pentandra*.

Amplamente distribuído nas áreas tropicais do planeta, o gênero *Bauhinia* contém aproximadamente 300 espécies, das quais pelo menos 200 ocorrem em território brasileiro na forma de árvores, arbustos ou cipós (VAZ; TOZZI 2005). São conhecidas popularmente por Pata-de-vaca, Unha-de-vaca ou Casco-de-vaca, devido ao formato de suas folhas, ou ainda Mororó. A maioria é de origem do continente asiático mas existem espécies nativas do Brasil como a *B. longifolia* e a *B. forficata*. Podem atingir até 10 m de altura, algumas espécies tem acúleos, como a *Bauhinia pentandra* e seu fruto é tipicamente um legume, também chamado de vagem.

Várias espécies do gênero *Bauhinia* têm sido usadas na tradicional medicina popular brasileira como, antiinflamatório, diurético, contra diarreia e principalmente como anti-diabético, propriedades estas, confirmadas por estudos farmacológicos e bioquímicos (JULIANI, 1941; PEPATO *et al* 2002). Quem defende suas propriedades medicinais a indica também contra colesterol, elefantíase, males do estômago, do fígado, do intestino, gases, vermes e outros males.

Extratos aquosos de raiz, caule e folha de espécies do gênero *Bauhinia*, principalmente de *B. cheilandra*, *B. forficata*, *B. glabra*, *B. rufenses*, *B. splendens* e *B. unguolata*, são amplamente usadas no Brasil (bem como em outros países) no tratamento de várias doenças, especialmente infecções, processos dolorosos e diabetes (ACHENBACH *et al.*; 1988; RITERR *et al.*; 2002; PEREIRA *et al.*; 2004; MACEDO, 2004; MORAIS *et al.* 2005; SILVA *et al.*; 2006; ALMEIDA *et al.*; 2006).

Lino e colaboradores (2003) observaram que extratos das partes aéreas de *B. forficata* reduziram o nível de triglicerídeos, colesterol total e HDL em ratos com diabetes induzida com aloxano. Akhtar e colaboradores (1995) observaram que o extrato metanólico da flor de *B. racemosa* apresentou uma redução significativa no índice de úlcera em ratos tratados com ácido acetilsalisílico.

O extrato metanólico da casca de *B. guianenses* apresentou atividade analgésica em camundongos tratados com ácido acético, bem como atividade antiinflamatória ao mostrar uma significativa inibição de edema de pata em ratos tratados com carragenana, dextrana e histamina (SILVA; CECHINEL-FILHO, 2002; FALCÃO *et al.*; 2005).

O gênero *Bauhinia* está entre os que mais possuem espécies com efeito hipoglicemiante usados na medicina popular, sendo a *B. forficata* a espécie que apresenta um maior número de estudos sobre esse efeito (SILVA *et al.* 2002;

PEPATO *et al.* 2002; LINO *et al.* 2003). Recentemente estudos realizados com extrato das folhas de *B. candicans*, *B. forficata* e *B. manca* demonstraram atividade hipoglicêmica em animais de laboratório (FUENTS; ALARCON, 2006; MENEZES *et al.* 2007).

Uma ação similar a da insulina foi observada na utilização do extrato da folha de *B. forficata* em ratos e camundongos tratados com veneno de escorpião (*Tityus serrulatus*), já que, o mesmo causou redução da hiperglicemia por atrasar o processo de glicogenólise induzido pela ação de hormônios como a adrenalina, a qual é ativada pela ação do veneno (VASCONCELOS *et al.*; 2004). Esses resultados são semelhantes aos de Correia e colaboradores (1997) realizados com insulina.

Também foram detectadas ação anticoagulante e antifibrinogenolítica para *B. forficata* quando testada contra veneno de cobra (*Bothrops jararacussu* e *Crotalus durissus terrificus*) em plasma sanguíneo humano, ações essas, causadas provavelmente por inibidores potentes encontrados na planta, de uma enzima coagulante semelhante à trombina existente no veneno de animais peçonhentos (OLIVEIRA *et al.*; 2004).

Uma lectina galactose específica foi encontrada nas folhas de *Bauhinia monandra*, que por eletroforese em condições desnaturantes apresentou duas bandas protéicas de 33 e 26 kDa (COELHO; SILVA, 2000). Em 2001, SILVA e colaboradores publicaram o isolamento e caracterização parcial da lectina cotiledonária de sementes de *Bauhinia pentandra*, também galactose específica. Esta lectina mostra apenas uma banda protéica de massa molecular aparente de 30 kDa, requer a presença de cátions divalentes (Ca^{+2} e Mn^{+2}) para exercer sua atividade e tem uma composição de aminoácidos caracterizada pelo alto teor de ácido aspártico, ácido glutâmico, alanina e pelo baixo teor de metionina, cisteína e triptofano. Em 2004, Cordeiro-Carlos ao caracterizá-la físicoquímica e biologicamente, observou que seu conteúdo de estrutura secundária é predominantemente β -folha e que se trata de uma proteína não tóxica capaz de induzir edema de pata e migração de neutrófilos em cavidade peritoneal de ratos.

Recentemente, Wu e colaboradores (2004) publicaram um estudo sobre a especificidade fina da lectina de *Bauhinia purpurea* (BPA) demonstrando que esta tem alta afinidade por glicoproteína polivalente de alta densidade tipo: GalNAc α 1-Ser/Thr e “glycotopes” presente sobre macromoléculas Gal α 1-3/4GlcNAc.

1.2. Característica da planta

Bauhinia pentandra é uma árvore de pequeno porte (Arvoreta) podendo atingir até 4 m de altura, escandente com ramos contendo acúleos rígidos em direção ao ápice, com folhas bifoliadas, e inflorescências parciais com pétalas lineares. Seu legume apresenta contorno estreitamente oblongo, sem divisões internas, portanto sem câmaras que alojam as sementes as quais não possuem apêndice unciforme encobrindo o hilo, e sem linhas em leque. Está distribuída nas áreas tropicais do planeta sendo a maioria encontrada em território brasileiro sendo popularmente chamadas de pata-de-vaca (VAZ; TOZZI; 2005).

1.3. Semente

Nas angiospermas a fecundação se dá quando o núcleo masculino (proveniente do grão de pólen) e o núcleo feminino (oosfera, proveniente do óvulo) se encontram, formando o zigoto, ainda no ovário da flor. O zigoto, uma célula simples, sofre então muitas divisões celulares e dá origem a um pequeno embrião, pluricelular. O óvulo fecundado desenvolve-se formando então uma semente normalmente constituída pelo embrião; o resultado da fertilização da célula ovo no saco embrionário, por um dos núcleos espermáticos masculinos do tubo polínico; o endosperma, da fusão de dois núcleos polares do saco embrionário com o outro núcleo espermático do tubo polínico; o perisperma, tecido de reserva, diplóide materno, originário do nucelo, e presente apenas em algumas espécies, por ex., *Beta vulgaris* (beterraba), *Piper nigrum* (pimenta), *Coffea arabica* (café); e testa ou tegumento, formado de um ou ambos os integumentos do óvulo (BUCHANAN *et al.*, 2000).

O embrião maduro é formado por eixo e cotilédones. Eles possuem diferentes taxas de desenvolvimento e ambos são compostos de três camadas básicas de tecidos: protoderme, procâmbio e meristema - que irão formar a epiderme, sistema vascular e parênquima, da jovem planta, respectivamente.

A forma e o tamanho dos embriões com relação às outras estruturas dentro da semente são variáveis. Nas sementes maduras de monocotiledôneas e dicotiledôneas, com um endosperma bem desenvolvido, os cotilédones apresentam-se delgados e membranosos e servem para absorver as substâncias de reserva do

endosperma. Nas sementes que carecem de endosperma, como no girassol, noz, ervilha e feijão, os cotilédones são carnosos e ocupam o maior volume da semente.

Quanto ao endosperma, as sementes podem ser classificadas como endospermicas ou não endospermicas, com relação à presença ou ausência na semente madura, desse tecido de reserva de origem não embrionário completamente formado. Ele possui a função de alimentar o embrião, além de fornecer hormônios para regular seu crescimento (OLSEN, 1998).

O tegumento consiste de várias camadas de tecidos especializados que fornecem proteção ao embrião, atuam na germinação e dispersão das sementes, no fornecimento de nutrientes durante o desenvolvimento da semente (BOESEWINKEL; BOUMAN, 1995; DONGEN *et al.*, 2003), além de atuarem como moduladores na relação entre a semente e o ambiente (SOUZA; MARCOS-FILHO, 2001). Os tecidos do tegumento são oriundos das células dos integumentos do óvulo que se diferenciam em resposta à fertilização.

Quando madura, a semente é a principal forma de dispersão natural da espécie, assim, o sucesso com o qual o novo indivíduo é estabelecido – o tempo, o ambiente, bem como o vigor da jovem plântula é largamente determinado pelas características fisiológicas e bioquímicas da semente. A chave para esse sucesso, é a resposta da semente ao ambiente e as reservas que contém disponíveis para a sustentação da nova planta, durante os estágios iniciais do crescimento, antes de tornar-se um organismo autotrófico e independente (BEWLEY; BLACK, 1994).

1.4. Parede celular

A parede celular é uma estrutura dinâmica e altamente complexa, constituída, basicamente por polissacarídeos, destacando-se a celulose e os componentes da matriz (CARPITA; GILBEAUT, 1993). Ela é a principal diferença entre a célula animal e vegetal, já que várias diferenças com respeito à nutrição, crescimento, reprodução, e mecanismos de defesa, podem ser traçadas a partir do seu estudo (CARPITA; GILBEAUT, 1993; PERRIN, 1999).

Como constituinte principal está a celulose, depositada ao longo de sua extensão como microfibrilas semicristalinas, composta por 30 a 36 cadeias de glucana β -D-(1-4), mantidas juntas ao longo de sua extensão por ligações de hidrogênio, formando um material insolúvel e resistente. As microfibrilas de celulose

são interconectadas com moléculas de hemiceluloses de alto peso molecular (xiloglucanas ou arabinoxilanas) através de ligações de hidrogênio à superfície das microfibrilas e embebidas em uma matriz de pectina (CARPITA; GIBEAUT, 1993), (figura 2).

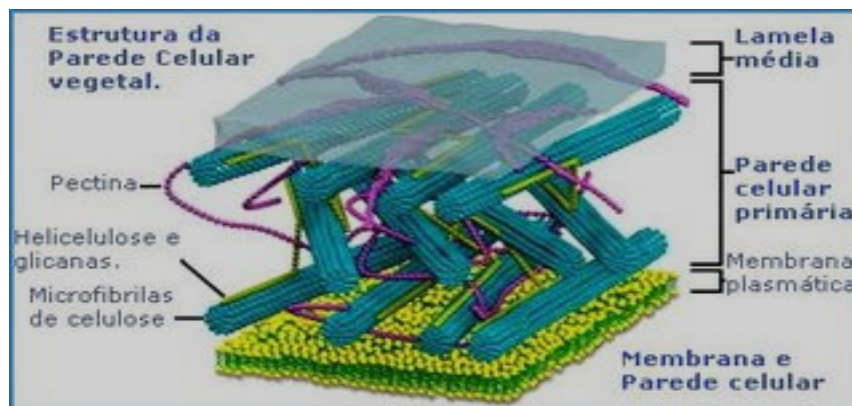


Figura 2: Estrutura da parede celular vegetal.

Algumas proteínas estruturais, como as extensinas contribuem para a complexidade e resistência da parede celular. Elas são uma família de glicoproteínas (HRGPs), ricas em hidroxiprolina e serina, abundantes nas dicotiledôneas, onde são inseridas durante o crescimento da parede primária. Outras proteínas ricas em prolina (PRPs), glicina (GRPs), treonina e as proteínas arabinogalactanas (AGPs) são formadas durante a diferenciação de células específicas (SHOWALTER, 1993).

A estrutura complexa dos polissacarídeos da parede celular combina força com plasticidade que é requerida para expansão e crescimento do vegetal. Para isso, ela deve possuir sinalizadores que controlam os aspectos mecânicos de desenvolvimento do vegetal, tais como, síntese da própria parede, expansão entre células adjacentes e conseqüentemente o desenvolvimento do organismo como um todo. Essa parede também tem a função de proteger a planta contra o ataque de predadores (CAMPBELL; BRAAM, 1999; PILLING; HOFTE, 2003), e sua composição varia significativamente entre um tipo de célula e outra, entre diferentes espécies e em resposta a patógenos, simbioses e outros fatores patogênicos (RAE *et al.*, 1992; BUCKERIDGE *et al.*, 1995; VORWERK *et al.*, 2004).

A parede celular é expandida para permitir o turgor dirigido pela expansão celular (COSGROVE, 2000). Um dos mistérios do crescimento celular vegetal, que

pesquisadores têm estudado por décadas, é como essas glucanas entrelaçadas afrouxam-se sem comprometer a resistência da parede vegetal (PEÑA *et al*, 2004).

Duas camadas de paredes celulares podem ser descritas: a parede celular primária e a parede celular secundária.

1.4.1. Parede celular primária

A parede celular primária é a camada mais externa da parede celular formada durante o crescimento da célula. Na sua composição entram celulose (30 %), hemiceluloses (30 %), pectinas (30 %) e proteínas (10 %). Ela precisa ser estável mecanicamente e suficientemente extensível para permitir a expansão celular.

A celulose é um polímero de unidades de glucose ligados β -1-4, gerada na membrana plasmática na forma de microfibrilas.

As hemiceluloses (xiloglucanas, arabinoxilanas ou mananas) são sintetizadas no complexo de Golgi, definidas como polissacarídeos que formam ligações cruzadas, não covalentes e fortes com as microfibrilas de celulose (FRY, 1989).

De acordo com a estrutura química de seus componentes Carpita e Gibeaut, (1993) classificaram a parede celular em dois tipos: parede celular primária tipo I e parede celular primária tipo II.

1.4.1.1. Parede celular primária tipo I

A parede celular primária do tipo I é característica da maior parte das espécies das dicotiledôneas e monocotiledôneas. São constituídas fundamentalmente, por uma rede de microfibrilas de celulose noveladas e envolvidas por cadeias de xiloglucanas (FRY *et al*, 2003), principal componente da fração hemicelulósica, que possui ainda pequenas quantidades de xilana galactoglucomananas, galactomananas, (1 \rightarrow 3) β -D-glucanas e glucurono-arabinoxilanas.

1.4.1.2. Parede celular primária tipo II

A parede celular primária do tipo II é encontrada apenas em monocotiledôneas (nas gramíneas). O principal polímero (glucanas) que envolve e

interliga as microfibrilas de celulose é formado por cadeias de glucuronoarabinoxilanas, (uma cadeia linear de unidades β -D-(1 \rightarrow 4)-xilosil, frequentemente ramificada na posição O-2 com unidades arabinosil terminal). As pectinas também se encontram presentes, formadas pelas cadeias de ácido poligalacturônico e ramnogalacturonana do tipo I (RG-I), contendo cadeias laterais de arabinanas, galactanas ou arabinogalactanas. Uma proteína, rica em treonina, também está presente na matriz. (NISHITANI; NEVINS, 1991; CARPITA; GIBEAUT, 1993; ISHII, 1997; LAM *et al*, 1994; YOKOYAMA; NISHITANI, 2004).

1.4.2. Parede celular secundária

É a camada mais interna da parede celular, depositada em alguns tipos de células, sob a parede primária após ter cessado o alongamento celular, formada por celulose (50-80 %), hemiceluloses (5-30 %) e lignina (15-35 %).

A estrutura microfibrilar de celulose é geralmente organizada e disposta em camadas. Cada camada possui uma orientação própria das microfibrilas de celulose entre as quais se encontram localizada porções de lignina e hemiceluloses. Ela é bem espessa, constituindo cerca de 90 % da parede celular o que confere estabilidade mecânica sobre tipos celulares especializados tais como os elementos dos vasos do xilema e as células do esclerênquima (EMONS; MULDER, 1998).

1.5. Gomas.

O termo goma é definido como sendo polissacarídeos e seus derivados, que se hidratam em água, fria ou quente, formando soluções viscosas ou dispersões (PAULA, 1995). As gomas naturais são geralmente insolúveis em solventes orgânicos, são hidrofílicas e se decompõem a temperaturas elevadas. São substâncias amorfas e não possuem ponto de fusão característico (MANTELL, 1947). São compostas principalmente por heteropolissacarídeos complexos, podendo conter ainda compostos protéicos em baixa proporção (CHURMS *et al.*, 1986).

Estruturalmente, as gomas são moléculas de elevada massa molar, com longas cadeias lineares ou ramificadas compostas de unidade glicosídicas, podendo apresentar de cem a mil unidades. São chamadas de heteroglicanas, por serem

constituídas por mais de um tipo de açúcar, diferentemente do amido e da celulose, que são homoglicanas, compostos por apenas um tipo de unidade de açúcar, a glucose.

As gomas são bastante empregadas na indústria farmacêutica (na preparação de emulsão, mucilagens e pastilhas), alimentícia, cosmética, na medicina (em aplicações locais como agente anti-ressecamento e internamente, nas inflamações, pela sua ação protetora das mucosas) (MANTELL, 1947), na fabricação de papéis, de tintas, entre outras.

Quanto à classificação as gomas naturais são classificadas de acordo com a sua origem em: gomas de algas, gomas de origem microbiológica, gomas exsudadas de plantas e gomas de sementes.

Em algas, as gomas são geralmente extraídas dos tecidos com água quente, ácido diluído ou álcalis, como é o caso do agar (um polissacarídeo extraído de algas marinhas da classe Rodophyceae), dos alginatos e da carragenana, polissacarídeos insolúvel em água fria e bastante solúvel em água quente. O agar é um dos agentes capazes de formar gel, sendo o mais usado na indústria alimentícia como estabilizante e em laboratório é corriqueiramente usado como suporte em técnicas de eletroforese, imunoeletroforese, imunodifusão e filtração em gel.

Diferentemente das gomas descritas anteriormente, as gomas de origem microbiológica não estão sujeitas a alterações estruturais dependentes do clima, poluição ou localização geográfica (KENNEDY; WHITE, 1988). Através do controle da composição do meio de cultura das bactérias fermentadoras pode se desenvolver polissacarídeos com estruturas e propriedades específicas. As gomas dextrana e xantana são exemplos deste grupo. As dextranas são amplamente utilizadas na indústria alimentícia como estabilizantes. Em laboratório de pesquisa são intensamente empregadas em técnicas cromatográficas tipo filtração em gel (PHARMACIA, 1993) e afinidade para isolar lectinas específicas por glucose (MOREIRA *et al.*, 1991).

Quanto às gomas exsudadas de plantas, várias famílias incluem espécies que produzem exsudados gomosos, destacando-se as *Leguminosae*, *Combretaceae*, *Proteaceae* e *Anacardiaceae*. Estes exsudados são principalmente produzidos em galhos e no caule das plantas em resposta a agressões externas, tais como, ferimentos ou doenças.

Vários polissacarídeos obtidos de gomas exsudadas têm sido explorados comercialmente (WHISTLER, 1993), incluindo goma arábica (*Acacia senegal* e *Acacia seyal*), goma ghati (*Anogeissus latifolia*), goma tragacante (*Astragalus gummifer*) e goma caraia (*Sterculia urens*), sendo a goma arábica a mais utilizada (Tabela 1).

TABELA 1 – Aplicações industriais de gomas exsudadas

Goma	Espécie	Aplicação
Arábica	<i>Acacia senegal</i>	Estabilizador coloidal, adesivo, estabilizador de emulsões.
Ghati	<i>Anogeissus latifolis</i>	Estabilizador coloidal, adesivo, estabilizador de emulsões.
Caraia	<i>Sterculia urens</i>	Espessante
Tragacante	<i>Astragalus sp</i>	Formador de filmes e géis, espessante.

Fonte: Whistler (1993)

As gomas de sementes são comumente chamadas de gomas endospérmicas. Algumas sementes, principalmente de leguminosas, contêm um endosperma gomoso, cuja principal função seria a de absorver água, em quantidade de até 10 vezes superior à sua massa, aparentemente destinado à defesa das plantas jovens contra o estresse hídrico. Diversas sementes já tiveram suas gomas endospérmicas investigadas estruturalmente e todas mostraram ser basicamente constituídas de galactose e manose em diferentes proporções.

O crescimento da utilização industrial dessas gomas em nível internacional tem sido um impulso para a pesquisa de descobertas de novas gomas de sementes, para a produção industrial. Atualmente a de maior importância comercial é a de *Cyamopsis tetragonolobus* (goma de guar), a qual predomina no mercado desde 1953.

1.5.1. Modificação química das gomas

Para aplicação de gomas naturais em colunas cromatográficas é indispensável à formação de uma malha, para se ter a formação de um gel com resistência mecânica apropriada. Assim, o polissacarídeo precisa ser estabilizado

através de ligações cruzadas. Um dos reagentes responsáveis pela obtenção dessas ligações cruzadas é a epiclorigrina. Um exemplo de reação de epiclorigrina com polissacarídeo é a formação do gel de Sephadex (FLODIN, 1962).

Quando o polissacarídeo é misturado com uma solução alcalina de epiclorigrina, ocorre uma reação endotérmica e as cadeias do polissacarídeo são ligadas por pontes glicerol 1-3 éter. A epiclorigrina reage com dois grupos hidroxila de duas cadeias diferentes.

Uma série de reações laterais pode ocorrer com a epiclorigrina sendo hidrolisada em solução aquosa, o cloro removido e o epoxi monofuncional esterificando apenas um grupo hidroxila. Esta hidrólise também pode ocorrer após a epiclorigrina ter reagido com o polissacarídeo. Isto resulta em apenas uma substituição pelo glicerol e a ligação cruzada não é formada. A propriedade de intumescimento do gel formado é influenciada pela concentração do polissacarídeo, sua massa molar e a relação massa polissacarídeo-epiclorigrina.

O primeiro estudo de formação de ligações cruzadas de glicerol éter, com gomas naturais, foi desenvolvido por Fugita e colaboradores (1975) usando goma arábica como substrato, sendo testado como matriz cromatográfica de afinidade para um filtrado de cultura de *Streptomyces sp.* contendo uma lectina específica por galactose.

Procedimento semelhante foi desenvolvido por Appukuttan e colaboradores (1977) para a goma de guar, utilizando epiclorigrina em baixas concentrações para obter um gel insolúvel sendo também testada como matriz cromatográfica de afinidade, para isolar uma fração protéica de *Ricinus communis*, rica em lectina.

Tavares (1998) reticulou com epiclorigrina a goma endospermica de *Adenantha pavonina* L. (carolina) para ser empregada como suporte em cromatografia de afinidade, para isolar as lectinas ligantes a galactose de sementes de *Artocarpus incisa*, *Artocarpus integrifolia*, *Vaitarea macrocarpa*, *Abrus precatorius* e *Abrus pulchellus*, e a mesma apresentou um grau de retenção, na separação dessas moléculas.

Posteriormente as gomas endospermicas de *Schizolobium parahybae* e *Delonix regia* (MATOS, 2000), *Parkinsonia aculeata* (GARROS-ROSA, 2000) *Caesalpinia puclherrima* (BRAGA, 2001), a goma cotiledonária de *Mucuna sloanei* (TEIXEIRA, 2005) e as gomas exsudadas de *Spondias purpurea* (TEIXEIRA, 2001) e de *Anacardium occidentale* (LIMA, 2002) foram também caracterizadas e por

tratamento com epiclóridrina, foram utilizadas como matrizes para o isolamento de lectinas galactose-ligantes.

1.6. Polissacarídeos de Reserva de Parede Celular (PRPC).

Os polissacarídeos de reserva de parede celular (PRPC) são principalmente encontrados em sementes, raízes, rizomas, tubérculos e bulbos.

Muitas sementes possuem em seus tecidos de reserva paredes celulares muito espessas devido ao acúmulo de grande quantidade de polissacarídeos de reserva, formados pelas células vegetais em estágios do desenvolvimento, em períodos de intensa atividade fotossintética, que serão mobilizados durante a germinação (tabela 2).

Os polissacarídeos de reserva da parede celular têm sido usualmente classificados em três grupos: mananas, xiloglucanas e galactanas (BUCKERIDGE; REID, 1996; REID, 1985). Esta classificação é essencialmente baseada na estrutura, sendo que as mananas podem também ser divididas em mananas puras, glucomananas e galactomananas (BUCKERIDGE; REID, 1996).

1.6.1. Grupo das Xiloglucanas

As xiloglucanas estão presentes em grandes quantidades nas paredes celulares de cotilédones de diversas espécies. Elas são constituídas por uma cadeia principal de β -D-(1 \rightarrow 4)-glucana ramificada com ligações α -(1 \rightarrow 6) por unidades de D-xilopiranosídeos ou β -D-galactopiranosídeo-(1 \rightarrow 2)-D-xilopiranosídeos onde substituintes são ligados. Primeiramente as xiloglucanas foram detectadas em sementes de *Impatiens balsamina*, *Tropaeolum majus* e em *Cyclamen europaeum* (HEINRICHER, 1888; REISS, 1889).

Em muitas sementes de dicotiledôneas, as xiloglucanas são encontradas como um polissacarídeo de reserva de parede celular secundária (REID, 1985; BUCKERIDGE *et al.*, 2000) e nas paredes primárias de tecidos em crescimento, xiloglucana possui uma função estrutural na orientação das microfibrilas e formação da rede fibrilar da parede.

A função de reserva das xiloglucanas foi primeiramente evidenciada em cotilédones de *Tropaeolum majus* (EDWARDS *et al.*, 1985), que mostrou a

participação de quatro hidrolases: endo- β -(1 \rightarrow 4)-glucanase ou xiloglucana endotransglicosilase (XTH), β -galactosidase, α -xilosidase e β -glucosidase (ROSE *et al.*, 2002).

TABELA 2 - Algumas características dos principais polissacarídeos de reserva de parede celular e sua ocorrência.

Polissacarídeo	Unidade de açúcar na cadeia Principal	Unidade de açúcar nas ramificações	Nucleotídeo açúcar necessário para a biossíntese	Enzimas hidrolíticas envolvidas na mobilização	Localização na planta
Manana	Manose	Galactose (raramente)	GDP-manose UDP-galactose	Endo- β -mananase	Sementes (Palmae café, gergelim)
Glucomanana	Manose e Glucose	Galactose (raramente)	GDP-manose UDP-glucose UDP-galactose	Endo- β -mananase Endo- β -glucanase α -galactosidase	Sementes (alface, tomate) e órgãos subterrâneos (Liliaceae)
Galactomanana	Manose	Galactose	GDP-manose UDP-galactose	Endo- β -mananase α -galactosidase Exo- β -mananase	Sementes (Leguminosae, Convolvulaceae, Annonaceae)
Xiloglucana	Glucose	Xilose, galactose, arabinose	UDP-xilose UDP-galactose UDP-glucose	XET β -galactosidase α -xilosidase β -glucanase β -glucosidase	Sementes (Leguminosae, Tropacolaceae, Myrcinaceae)
Galactana	Galactose	Arabinose	UDP-galactose UDP-arabinose	Exo-galactanase α -arabinosidase	Sementes (leguminosas), Café

Fonte: BUCKERIDGE *et al* (2000).

1.6.2. Grupo das Galactanas

As galactanas foram primeiramente detectadas em sementes de lupino (*Lupinus albus*) em 1892 por Schulze e Steiger, sendo somente caracterizadas como

polissacarídeos distintos em 1947 (HIRST *et al.*, 1947). Em 1992 Al-Kaisey e Wilkie encontraram em sementes de quatro espécies de lupinos, dois tipos de galactanas, um com ligações β -(1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 6) e algumas ligações (1 \rightarrow 4) e outro com ligações β -(1 \rightarrow 4), possuindo uma substituição a cada 16-21 unidades por L-arabinofuranose.

Recentemente, Boi e colaboradores (2006) desenvolveram uma membrana de celulose com açúcares acoplados para ser utilizada na purificação de lectinas e observaram que uma galactana ramificada (arabinogalactano) foi o polissacarídeo que apresentou a melhor capacidade de adsorção, facilidade de uso e baixo custo quando comparado com outros açúcares testados como, por exemplo, a goma de guar.

1.6.3. Grupo das Mananas

Esse grupo é o mais amplamente distribuído e consiste de quatro subfamílias denominadas, mananas lineares (com menos de 5 % de galactose), glucomananas, galactoglucomananas e galactomananas (HEGNAUER; GRAYER-BARKMEIJER, 1993).

As mananas são definidas como mananas “puras” por possuírem 90 % ou mais de uma cadeia linear de unidades manopiranosil ligados β (1 \rightarrow 4), com até 10 % das unidades substituídas com galactose ligadas α -(1 \rightarrow 6). As mananas têm sido descritas em tecidos não embrionários (endosperma e perisperma) de monocotiledôneas, como por exemplo, em endospermas de Palma (*Phytelephas macrocarpa* e *Phoenix dactylifera*) e dicotiledôneas (REID, 1985). Também foram detectadas em endospermas de *Coffea arabica* (WOLFRON *et al.*, 1961), *Carum carvi* (HOPF; KANDLER, 1977) e *Schizolobium amazonicum*, primeira manana isolada de sementes de leguminosas (PETKOWICZ *et al.*, 2001).

Além da função de reserva (principalmente nas sementes de monocotiledôneas), as mananas conferem resistência e dureza às sementes, protegendo-as contra danos mecânicos, mesmo após terem sido expostas a água. No entanto, recentemente Petkowics e colaboradores (2007) observaram que para *Schizolobium parahybae* (guapuruvu), esse polissacarídeo não é utilizado como reserva por ter sido conservado durante a germinação, e sim como um provável polissacarídeo de função estrutural substituindo a celulose.

As glucomananas e as galactoglucomananas são constituídas por uma cadeia linear β (1 \rightarrow 4), contendo quantidades iguais de unidades β -glucopiranosil e β -manopiranosil e alguns pontos de ramificação (3-6%) com unidades α -galactopiranosil ligadas (1 \rightarrow 6) (REID, 1985).

1.6.3.1 Galactomananas

Os estudos sobre a natureza química desses polissacarídeos tiveram início em 1897, quando Effront investigou um carboidrato presente na mucilagem de alfarroba (*Ceratonia siliqua*). Dois anos mais tarde, Bourquelot e Hérissé (1899) demonstraram que a goma era constituída de 83,5 % de D-manose e 16,5 % de D-galactose, cuja proporção M/G de 5,0:1 está próxima aos valores atualmente determinados. A partir do desenvolvimento de novas técnicas, mais de 70 galactomananas tiveram a proporção M/G determinada, tendo sido encontradas variações na proporção M/G de 1:1 para galactomanana de *Medicago sativa* (COURTOIS *et al*, 1958) até 5,26:1 para a galactomanana de *Sophora japonica* (KOOIMAN, 1971), razão esta, confirmada por Smirnova e colaboradores (2003).

Essa proporção das unidades manose:galactose é dependente da espécie, e assim podem ser classificadas em dois grupos: os de elevada concentração de galactose e os de baixa concentração de galactose. Têm sido sugerido, que a proporção M/G e a distribuição das unidades de galactose na cadeia de manana, poderiam ser usadas em estudos quimiotaxonômicos e evolutivos. Em geral, galactomananas com poucas substituições são obtidas de sementes de espécies pertencentes à família mais primitiva Caesalpiniaceae e galactomananas com substituições médias e elevadas pertencem a famílias mais recentes, por exemplo, *Fabaceae* (REID; EDWARDS, 1995). A razão Man/Gal é responsável por muitas das propriedades apresentadas pelo polímero, como solubilidade e grau de interação com moléculas de celulose na parede celular, bem como interações com outros polímeros.

Galactomananas de muitas leguminosas tem sido caracterizada e suas razões manose:galactose determinadas (tabela 3), visto que essa característica pode ter não só importância taxonômica como também reflete o padrão de evolução da família (BUCKERIDGE *et al* 1995).

TABELA 3 – Distribuição da proporção manose: galactose em espécies de *Leguminosae*.

Origem	Man:Gal
<i>Bowdichia virgilioides</i>	0,9:1
<i>Mimosa platyphylla</i>	0,9:1
<i>Trigonella folium-graecum</i>	1,0:1
<i>Indigofera suffruticosa</i>	1,1:1
<i>Mimosa scrabela</i> ²	1,1:1
<i>Leucaena pulverulenta</i>	1,2:1
<i>Prosopis jutiflora</i>	1,2:1
<i>Stryphnodendron barbatiman</i>	1,5:1
<i>Cyamopsis tetragonolobus</i> ⁵	1,6:1
<i>Cassia grandis</i>	1,7:1
<i>Adenantha pavonina</i>	1,8:1
<i>Sesbania marginata</i> ³	2,0:1
<i>Delonix regia</i> ⁴	2,0:1
<i>Crotalaria micans</i>	2,1:1
<i>Crotalaria juncea</i>	2,5:1
<i>Caesalpinia spinosae</i> ⁷	2,7:1
<i>Caesalpinia pulcherrima</i> ⁶	2,8:1
<i>Cassia fastuosa</i> ¹	3,0:1
<i>Ceratonia siliqua</i> ³	3,0:1
<i>Schizolobium amazonicum</i> ¹	3,0:1
<i>Schizolobium parahybae</i> ¹	3,0:1
<i>Parkinsonia aculeata</i> ⁸	3,1:1

Fonte: Modificado de BUCKERIDGE *et al*, (1995);¹ PETKOWICZ *et al* (1998); ²GANTER (1997); ³BUCKRIDGE *et al* (1996); ⁴ KAPOOR (1972); ⁵DAAS *et al* (2000); ⁶AZERO (1999); ⁷GANTER; REICHER (1999) ⁸ GARROS-ROSA (2000).

As galactomananas são encontradas em sementes de diversas famílias, entretanto, é na família *Fabaceae* onde se encontram o maior número de galactomananas estudadas. Nas sementes, elas são depositadas em grande quantidade na parede celular do endosperma, correspondendo a 40-48 % do peso

fresco da semente. São constituídas de uma cadeia principal, linear, de unidades β -D-manopiranosil com ligações (1 \rightarrow 4), muitos destes substituídos em O-6 com resíduos α -D-galactopiranosil (DEA; MORRISON, 1975).

Galactomananas são amplamente usadas na indústria farmacêutica, têxtil, papel, cosméticos e de alimentos (WHISTLER, 1973; DAVIDSON, 1980). As de maior importância comercial estão mostradas na tabela 4, e a utilização das mesmas está diretamente relacionada às suas propriedades em solução, incluindo suas interações com outras macromoléculas. A goma de Guar, obtido da semente de *Cyamopsis tetragonoloba*, é a principal goma usada em diferentes indústrias do mundo todo. Enquanto as gomas de *Sesbania bispinosa* e *Cássia tara* são usadas principalmente nas indústrias têxtil e de papel (SRIVASTAVA; KAPOOR, 2005).

O estudo da estrutura fina das galactomananas tem sido realizado a partir da caracterização das estruturas de oligossacarídeos, obtidos por hidrólises parciais enzimáticas e ácidas do polímero (SRIVASTAVA; KAPOOR, 2005).

Em sementes de *Adenantha pavonina*, a galactomanana apresenta uma estrutura convencional formada por uma cadeia linear constituída por unidades monossacarídicas de manose com ligações glicosídicas do tipo β (1-4) e ramificações com unidades de D-galactose ligadas à cadeia principal de manose por ligações glicosídicas do tipo α -(1-6), distribuídas na cadeia principal de manose na proporção molar de manose:galactose de 1,8:1 (TAVARES, 1998).

TABELA 4 - Principais Galactomananas utilizadas comercialmente.

Nome Comum	Espécies
Guar	<i>Cyamopsis tetragonolobus</i>
Caroba	<i>Ceratonia siliqua</i>
Tara	<i>Caesalpinia spinosae</i>
Dhaincha	<i>Sesbania bisbinosa</i>
Cássia	<i>Cássia tora</i>

Fonte: Srivastava; Kapoor (2005).

Várias galactomananas, apresentando a mesma estrutura convencional, têm sido isoladas de sementes de não leguminosas, onde as galactomananas diferem apenas na relação entre os monômeros e sua distribuição das unidades de galactosil ao longo da cadeia (figura 3).

As galactomananas isoladas de alfarroba (*Ceratonia siliqua*), guar (*Cyamopsis tetragonolobus* L.) e fenogrego (*Trigonella foenum-graecum*) apresentaram massa molecular (M_w) de $1,2 \times 10^6$ kDa, $1,3 \times 10^6$ kDa e $1,4 \times 10^6$ kDa, respectivamente. Entretanto, os valores para viscosidade intrínseca e raio de giros (R_g) obtidos, foram 14,38 dL/g para alfarroba (R_g 82,88 nm), 10,5 dL/g para guar (R_g 76,64 nm) e 9,61 dL/g para fenogrego (R_g 75,08 nm). Portanto, embora a goma de fenogrego tenha a maior massa molecular, esta apresenta o menor valor de viscosidade intrínseca (BRUMMER *et al.*, 2003). Considerando que as três gomas apresentam valores próximos de M_w , é lógico esperar que a goma de alfarroba (M/G=4:1) tenha uma viscosidade intrínseca significativamente maior comparada à da goma de guar (M/G=2:1) e da goma de fenogrego (M/G=1,1;1).

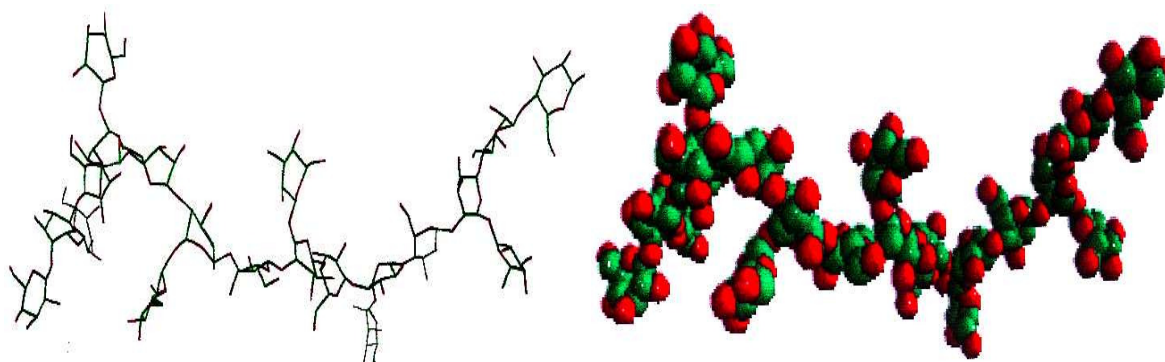
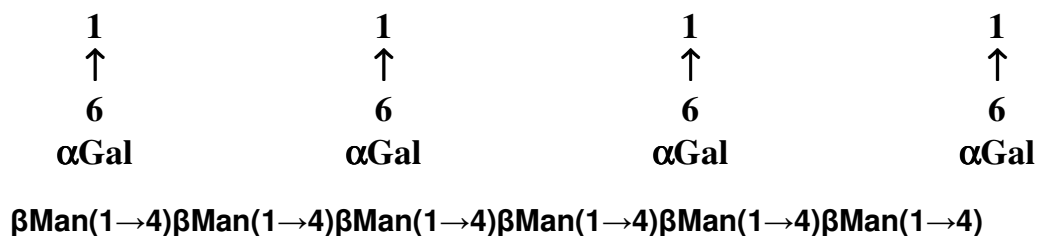


Figura 3: Estrutura clássica das galactomananas vegetais.

Esses resultados sugerem que a agregação molecular diminui com o grau de substituição da cadeia de manana por unidades galactosil. O alto grau de substituição por unidades galactosil da goma de fenogrego, implica em uma menor

tendência em formar interações intermoleculares. A goma de guar possui uma viscosidade intrínseca um pouco maior que a de fenogrego, embora apresentando um M_w menor. De forma análoga, esses resultados podem ser interpretados para as interações intermoleculares em alfarroba, embora esses efeitos sejam menos freqüentes para goma de guar, em virtude de seu alto grau de substituição por galactose. Portanto, o baixo valor de viscosidade intrínseca para a goma de fenogrego comparada com as gomas de guar e de alfarroba, a despeito das massas moleculares, sugere que um M_w maior é consequência da alta substituição da cadeia de manana (BRUMMER, *et al.*, 2003).

As galactomananas apresentam duas funções biológicas importantes: retenção de água (durante a embebição da semente) e fornecimento de energia (durante a germinação). Certos autores sugerem ainda que elas apresentem uma terceira função, a de defesa (DAOUD, 1932). Assim é que, por possuírem uma alta capacidade de retenção de água (60 % do peso da semente), as galactomananas, não apenas protegem as sementes contra desidratação, mas também criam um ambiente propício para o seu desenvolvimento permitindo que a germinação ocorra. Embora essa capacidade seja a mais importante, esses carboidratos também atuam como substâncias de reserva sendo então colocados no grupo dos polissacarídeos de reserva de parede celular (BUCKERIDGE *et al.*, 2000).

1.7. Lectinas

1.7.1. Definição.

Atualmente a definição mais aceita e mais apropriada para as lectinas foi a proposta por Peumans e Van Damme (1995), que definiram as lectinas como proteínas de origem não imune possuindo pelo menos um domínio não catalítico de ligação a carboidratos, capaz de ligar-se a mono ou oligossacarídeos específicos. Essa ligação não é capaz de alterar as estruturas covalentes dos resíduos de carboidratos de glicoconjugados complexos (SMART, 2004), sendo tanto do tipo interações hidrofóbicas como ligações de hidrogênio (WOLF; BRETT, 2000).

1.7.2. Classificação

Por serem um grupo heterogêneo de proteínas oligoméricas que variam de tamanho, estrutura, organização e constituição dos seus sítios ligantes (SHARON; LIS, 2001), duas classificações são essenciais para facilitar a compreensão e a utilização destas proteínas. Uma é em relação à estrutura protéica e a outra é com relação à especificidade por açúcares.

1.7.2.1. Classificação quanto à estrutura protéica

Peumans e Van Damme em 1998 dividiram as lectinas com respeito à estrutura global de suas subunidades em quatro grupos, **merolectinas**, **hololectinas**, **quimerolectinas**, **superlectinas**. Esta divisão foi ampliada em 2002 por Monteiro-Moreira incluindo um grupo denominado **multilectinas** (Figura 4).

Merolectinas: proteínas que apresentam exclusivamente um único domínio ligante a carboidratos, portanto, incapazes de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados em função de sua natureza monovalente. O exemplo mais conhecido deste grupo é a heveína (obtida a partir do látex de *Hevea brasiliensis*), proteína ligante de quitina e as proteínas monoméricas ligantes de manose

Hololectinas: proteínas que apresentam pelo menos dois domínios de ligação a açúcares idênticos ou homólogos que se ligam tanto ao mesmo açúcar ou açúcares estruturalmente semelhantes. Por serem di ou multivalente têm a capacidade de aglutinar células e/ou precipitar glicoconjugados. A maioria das lectinas de plantas pertence a este grupo.

Quimerolectinas: proteínas que possuem, além do domínio ligante a carboidratos, outro domínio com atividade catalítica ou outra atividade biológica que age independentemente do domínio ligante de açúcar. Nesta classe incluem-se as RIPs II e as quitinases do tipo I. Em alguns casos elas podem agir como merolectinas ou hololectinas dependendo do número de domínios ligantes a carboidratos.

Superlectinas: proteínas que possuem no mínimo, dois sítios de ligação a carboidratos não relacionados, como por exemplo, a lectina de tulipa com um domínio N-terminal para manose e um segundo domínio específico para N-acetil-galactosamina.

Multilectinas: consistem de proteínas com dois domínios ligantes a carboidratos que são idênticos ou homólogos, entretanto reconhecem açúcares estruturalmente não relacionados, ou seja, têm especificidade múltipla. É o caso da jacalina (lectina de sementes de *Artocarpus integrifolia* - Moreira e Ainouz, 1981) e da frutalina (lectina de sementes de *Artocarpus incisa* - Moreira et al., 1998) que ligam tanto D-galactose como D-manose.

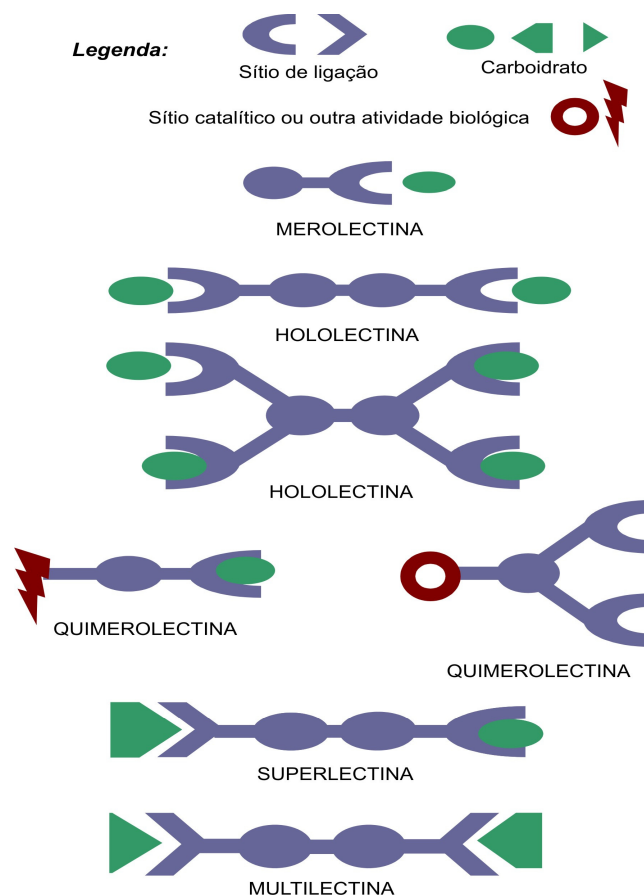


Figura 4: Esquema de subunidades lectínicas

1.7.2.2. Classificação quanto à especificidade por açúcares

Com base na sua reatividade com monossacarídeos que diferem na configuração do carbono 3 ou carbono 4 do anel piranosídico, Makela (1957) sugeriu que lectinas poderiam ser divididas em quatro grupos. Wu e colaboradores (1988) modificaram um pouco esta classificação e separou cinco grupos levando em conta os carbonos 2, 3 e 4.

O grupo de lectinas ligantes a **L-fucose** como *Lotus tetragonolobus* e *Ulex europeus* L; o grupo das lectinas ligantes a **D-galactose** e **N-acetil-D-galactosamina**, como *Glycine max*, *Artocarpus incisa*, *Artocarpus integrifolia* e *Phaseolus lunatus* ; o das lectinas que ligam **D-manose** e **D-glucose** como *Vicia faba*, *Canavalia ensiformis*, *Lens culinaris*, *Pisum sativum* e *Dioclea grandiflora*; o das lectinas que ligam a **N-acetilglucosamina** e o das ligantes a **ácido siálico**, neste dois últimos grupos encontram-se algumas lectinas de origem animal.

1.7.3. Ocorrência

As lectinas estão presentes em uma grande diversidade de organismos, desde vírus e bactérias até animais e vegetais superiores (HAJTÓ, *et al.*, 2005; SILVA-LUCCA *et al.*, 1999). No entanto, o maior número de estudos de isolamento e caracterização dessa proteína, tem sido em plantas superiores (PEUMANS; VAN DAMME, 1993^a; SING *et al.*, 1999), principalmente nos órgãos de reserva, tais como sementes, tubérculos, bulbos, rizomas e casca onde são mais encontradas. Nas outras partes da planta, como folhas, caule, raízes e flores elas aparecem em menor quantidade (DUVERGER *et al.*, 2003; RUDIGER, 1998; MOREIRA, 1998, PEUMANS; VAN DAMME, 1998; PUSZTAI, 1991).

A maioria das lectinas já estudadas foi isolada de sementes de dicotiledôneas, sendo encontradas principalmente nas sementes da família das leguminosas (CARLINI; GROSSI-DE-SÁ, 2002), fontes ricas dessas proteínas. Estas sementes contêm grandes quantidades de lectinas similares àquelas encontradas em outros tecidos da mesma planta (SOUZA *et al.*, 2005), chegando a representar 10 % do total de proteínas deste órgão (CHRISPELLS; BOLLINI, 1982).

A distribuição das lectinas difere entre as várias famílias. Nas leguminosas, embora pequenas quantidades de lectinas possam estar presentes nos eixos, e mesmo nas cascas das sementes, a maior parte se encontra nos cotilédones, em organelas conhecidas como corpos protéicos (SHARON; LIS, 1989). Nas solanáceas, a maior parte das lectinas está associada aos tubérculos e não às sementes (MARINKOVICH, 1964; ALLEN; NEUBERGUER, 1973).

Nos vírus, as lectinas têm sido observadas mediando à adesão do vírus à célula alvo (SHARON; LIS, 1989). Dugan e colaboradores (2008) mostraram a

atuação de lectinas de vírus (JCV e BKV) no reconhecimento de células hospedeiras humanas e interação com ácido siálico para posterior infecção.

Lectinas foram também encontradas em fungos, como *Kuehneromyces mutabilis* (MUSILEK *et al.*, 1990) e *Rhizoctonia solani* (KELLENS; PEUMANS, 1991). Bhowal e colaboradores (2005) isolaram, purificaram e caracterizaram uma lectina do fungo *Macrophomina phaseolina*, considerada rara por ser específica para ácido siálico.

Lectinas já foram encontradas em todas as classes de vertebrados (BARONDES, 1988). De um modo geral, as lectinas têm sido detectadas em intestino delgado de galinha, fígados de ratos. Kohnke-Godt e Gabius (1991) isolaram e purificaram uma lectina de placenta humana que se liga especificamente a Heparina.

Em algas marinhas, o primeiro relato da ocorrência de lectinas foi ao trabalho de Boyd e colaboradores (1966), onde foram publicados os resultados de 24 espécies de algas tropicais, as quais se mostraram capazes de aglutinar eritrócitos humanos.

1.7.4. Atividade biológica.

Apesar da grande quantidade de informações disponíveis sobre as seqüências e especificidade de lectinas, pouco se sabe sobre sua verdadeira significância biológica (DAMIAN *et al.*, 2005) sendo, portanto, uma molécula de reconhecimento ambíguo com funções e aplicações indeterminadas (SHARON, 2004).

As diferentes atividades biológicas apresentadas pelas lectinas vêm da sua propriedade de interagir com carboidratos. Diversos estudos demonstram que carboidratos servem como mediadores determinantes no reconhecimento pelas lectinas em interações célula-molécula e célula-célula (SHARON; LIS, 1989; DOOD; DRICKAMER, 2001). Dessa forma, é que elas estão associadas a diversos processos biológicos, tais como endocitose, translocação intracelular, migração, adesão, fagocitose e ligação de microorganismo em células hospedeiras (SHARON; LIS, 1993; CARVALHO *et al.*, 2001; GABIUS *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 2000; IMBERTY *et al.*, 2004).

Duas funções biológicas bastante discutidas e evidenciadas para lectinas vegetais são de mediadores da simbiose entre bactérias fixadoras de nitrogênio e raízes de Leguminosas (HIRSCH, 1999; WANG *et al.*, 2000), e agentes de defesa das plantas contra patógenos e predadores (VASCONCELOS; OLIVEIRA, 2004; WANG *et al.*, 2000; SHARON; LIS, 2004), visto que propriedades tóxicas para bactérias, fungos, insetos e nematóides determinadas *in vitro* e *in vivo*, aliado à sua resistência à proteólise e alta estabilidade em uma ampla faixa de pH, confirmam esta função (VASCONCELOS; OLIVEIRA, 2004). A concanavalina A, uma lectina de *Canavalia ensiformes*, cuja estrutura já é bem definida (figura 5) apresenta propriedade inseticida.

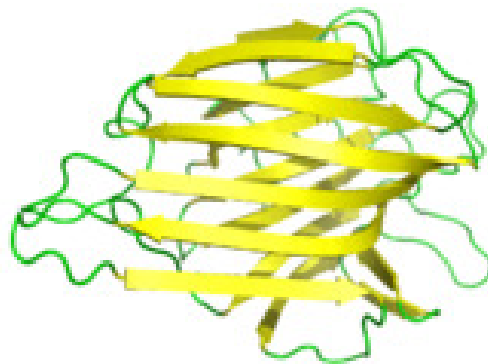


Figura 5: Estrutura da lectina de *Canavalia ensiformes* (Con A).

Também foi sugerido que as lectinas sejam proteínas com função de reserva (PEUMANS; VAN DAMME, 1993b; PLÁ *et al.*, 2003), já que durante a germinação ela é degradada e contribui com aminoácidos para o desenvolvimento da plântula. Por outro lado, já foi observado que esta degradação não segue o padrão geral das proteínas de reserva típicas (MOREIRA; OLIVEIRA, 1993; CAVADA *et al.*, 1994; OLIVEIRA *et al.*, 1998), Peumans e Van Damme (1993b) sugerem que elas poderiam ser uma classe especial de proteínas envolvidas nessa função. Rudiger (1998) sugere ainda que elas participem na organização da deposição de proteínas de reserva nos corpos protéicos, durante o desenvolvimento da semente.

Lectinas presentes nas membranas estão envolvidas no transporte celular assim como no reconhecimento célula-célula (DUVERGER *et al.*, 2003; GABIUS, 2004).

Sharon e Lis (2004) sugerem para lectinas animais as funções de imunidade inata, regulação de crescimento e ciclo celular, reconhecimento óvulo espermatozóides entre outros.

Outra importante função proposta para as lectinas seria a estimulação mitogênica de linfócitos uma vez que, a estimulação destes é um fenômeno chave na resposta imunológica. A primeira lectina mitogênica a ser descoberta foi a de *Phaseolus vulgaris* (NOWELL, 1960). Posteriormente, a capacidade de ativar linfócitos foi conferida a outras lectinas como a concanavalina A (ConA), purificada de sementes de *Canavalia ensiformis*, o mitógeno “pokeweed” (*pokeweed mitogen*, PWM), isolada de *Phytolacca americana*, e a WGA, extraída do germe de trigo, as quais são amplamente utilizadas em diversos ensaios imunológicos, induzindo diferentes efeitos biológicos sobre populações de linfócitos (PEACOCK *et al.*, 1990).

Várias lectinas da sub-tribo *Diocleinae* foram testadas quanto a indução de mitose em linfócitos humanos e proliferação de interferon- λ . Os resultados mostram não somente que essas proteínas são fortemente ativas nestes dois aspectos, mas mostram também respostas peculiares, com diferentes intensidades (BARRAL-NETO *et. al.* 1992).

1.7.5. Detecção

A propriedade mais conhecida das lectinas é sua capacidade de aglutinar hemácias ou precipitar polissacarídeos e glicoproteínas de diferentes espécies, sendo esta, uma das maneiras mais fáceis para detectar a presença de lectina em um material biológico. Assim, utilizando hemácias humanas ou de animais, numa concentração a 2 % e incubando com diluições seriadas do extrato protéico, a 27 °C, e então evidenciando a aglutinação, é que podemos confirmar a presença de lectinas no material testado. A fim de se potencializar a atividade hemaglutinante, tratam-se as células eritrocitárias com enzimas proteolíticas como tripsina, papaína, bromelaína ou ainda com neuraminidase ou pronase que remove ácido siálico de polissacarídeos complexos, deixando os sítios ligantes das hemácias mais expostos facilitando a aglutinação. Também podem ser utilizadas hemácias tratadas com glutaraldeído ou formaldeído com a finalidade de estabilizá-las e obter um padrão de células que poderá ser usado por longos períodos de tempo (LIENER, 1975).

Outros métodos de detecção podem ser utilizados; como: precipitação de polissacarídeos e glicoconjugados (SHARON; LIS, 1989); Elisa, utilizado na detecção de lectinas e sua distribuição nos diferentes tecidos vegetais durante o desenvolvimento da planta (VAN DAMME; PEUMANS, 1990) métodos imunológicos como radioimunoensaio (MISHKIND *et al.*, 1980), e ainda eletroforese de afinidade que combina os princípios da cromatografia de afinidade com a eletroforese (HOREJSI; KOCOUREK, 1977) em que a lectina é submetida à eletroforese em matriz de poliacrilamida contendo glicosídios, que conforme a especificidade da mesma irá retardá-la ou não.

1.7.6. Isolamento e Purificação

Para o isolamento e purificação de lectinas vegetais, em geral, é feito primeiramente a preparação da farinha do material a ser estudado e extração desta com solução salina ou solução tamponada. Quando necessário, pode ser efetuada uma pré-extração da mesma com solventes orgânicos (PEUMANS *et al.*, 1991; YAMASKI *et al.*, 1992) ou ainda, o extrato pode ser submetido a purificações parciais por métodos como diálise exaustiva (SAGE; GREEN, 1972), fracionamento dependente de pH (SUZUKI *et al.*, 1979) ou fracionamento salino, em especial com sulfato de amônio (SIDDIQUI, 1995).

Para a purificação utiliza-se a cromatografia de afinidade a qual se baseia na capacidade que a lectina tem em reconhecer e se ligar reversivelmente a carboidratos ou glicoconjugados. Assim, a lectina contida numa determinada solução é capaz de interagir com um açúcar inibidor específico que, por sua vez, está ligado covalentemente à matriz. Posteriormente, sua eluição é feita com uma solução do açúcar específico ou por diminuição do pH do eluente. Se necessário, a lectina parcialmente purificada por afinidade pode ser submetida a uma segunda cromatografia de afinidade ou purificação adicional por técnicas clássicas tais como: filtração em gel, troca iônica, e interação hidrofóbica (MONTEIRO-MOREITA, 2002).

1.7.7. Aplicações

Por consequência de suas diversas propriedades, tais como alta estabilidade e diferentes especificidades, as lectinas se tornaram proveitosas ferramentas no

campo da pesquisa biológica tais como biologia celular, engenharia genética, imunologia, estudo do câncer, etc. (BENEVIDES *et al.*, 2001). Também em diversas áreas da histoquímica, citoquímica e na agricultura têm sido demonstradas boas perspectivas de seu uso no combate a predadores (MOREIRA, 1998). Lectinas mostraram ainda ser ferramentas inestimáveis na investigação funcional e estrutural de carboidratos complexos, especialmente glicoproteínas, e para a avaliação de mudanças estruturais que ocorrem na superfície celular durante processos patológicos e fisiológicos, como na diferenciação celular no caso de células cancerígenas (SHARON; LIS, 2001; FERREIRA, 2001). Assim, por serem capazes de reconhecer e ligar-se de forma específica a células que apresentam um padrão de glicosilação diferenciado, elas têm sido utilizadas para diagnóstico precoce e acompanhamento de terapias de câncer (NANGIA-MAKKER *et al.*, 2002; MILHOME, 2003; BASU *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2000; TIMOSHENKO *et al.*, 1996; BIES *et al.*, 2004; SUMI *et al.*, 2001). Karasaki e colaboradores (2001) demonstraram que uma lectina extraída de *Allium sativum*-L reduziu fortemente o crescimento e síntese de DNA em células de tumor humano, numa relação tempo e dose dependentes. Além disso, esta lectina induziu apoptose em células à baixa concentração.

O fato das lectinas reconhecerem proteínas e carboidratos às faz de uma importância primordial em muitos processos biológicos (LORIS *et al.*, 1998; PLÁ *et al.*, 2003), sendo utilizadas, por exemplo, como marcadores celulares seletivos. Athamna e colaboradores (2005) desenvolveram uma técnica rápida e barata de identificar espécies de micro bactérias através do método por aglutinação com lectinas.

Recentemente Balzarini e colaboradores (2004 e 2005), consideraram os efeitos preventivos de lectinas contra infecção pelo vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e Wang e colaboradores (2005), isolaram uma lectina (CLV) galactose específica de um poliqueta marinho (*Chaetopterus variopedatus*) que apresentou atividade anti-HIV em células hospedeiras.

Labsky e colaboradores (2003) utilizaram lectinas como marcadores histoquímicos e propuseram um modelo para teste de produtos cosméticos e tratamentos de doenças de pele *in vitro*, baseados nas distribuições de glicanos nas células epiteliais e sua interação com a Concanavalina A (Con A).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral.

Considerando a diversidade dos recursos naturais disponíveis no país e a importância da caracterização estrutural e das propriedades dos polissacarídeos para a sua ampla aplicação, este trabalho tem como objetivo caracterizar estruturalmente o polissacarídeo de endosperma da semente de *Bauhinia pentandra*, avaliar sua capacidade de reter lectinas como matriz cromatográfica e estudar sua possível interação com a lectina endógena (LBp), bem como com lectinas de outras espécies.

2.2. Objetivos específicos.

Isolar o polissacarídeo endospermico da semente de *B. pentandra*.

Determinar a homogeneidade, composição em monossacarídeos e a viscosidade intrínseca do polissacarídeo isolado de *B. pentandra*.

Preparar matriz de afinidade com o polissacarídeo de *B. pentandra* e avaliar sua capacidade de interagir com lectinas ligantes de galactose, bem como com a lectina cotiledonária de semente de *B. pentandra* (LBp).

Isolar a lectina de *B. pentandra* em diferentes matrizes cromatográficas e comparar seu comportamento frente à matriz de galactomanana endógena.

3. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL.

Caracterização da semente de *B. pentandra*

- Análise dos caracteres morfológicos
- Determinação da massa seca dos tecidos

Caracterização da composição química do endosperma

- Análise química elementar

Caracterização do polissacarídeo

- CCD
- GPC
- GLC
- RMN
- Determinação da viscosidade

Avaliação da galactomanana como matriz de afinidade

- Isolar lectinas galactose-ligantes
- Comparar com outras matrizes

4. MATERIAIS

4.1. Sementes

As sementes de *Bauhinia pentandra* utilizadas no desenvolvimento desse trabalho foram coletadas no Parque Botânico localizado no município de Caucaia no Estado do Ceará.

4.2. Substâncias químicas e reagentes

Açúcares: D(+)-glucose, D(+)-galactose, D(+)-xilose, D(+)-manose, D(-)-arabinose, D(-)-frutose, sacarose, α -lactose, foram adquiridos da Sigma Chemical Co.

Polissacarídeos endospérmicos de *Adenantha pavonina*, *Caesalpinia pulcherrima*, e *Sophora japonica* foram gentilmente cedidos pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Lectinas e Glicoconjugados (LABLEC) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará.

Reagentes: Epiclorigrinal, Coomassie Brillhante Blue G-250, Nitrato de Prata, TEMED, Acrilamida, N-N' Metilenobisacrilamida, e Albumina Sérica Bovina (BSA) foram obtidas da Sigma Chemical Co. (St. Louis, EUA), Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), Beta-Mercaptoetanol, e Ácido Trifluoracético (TFA), da E. Merk (Dormstadt, Alemanha). Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

4.3. Hemácias

Hemácias de coelhos albinos foram obtidas de animais adultos provenientes do Biotério do Lablec.

5. MÉTODOS

5.1. Caracterização morfológica da semente de *Bauhinia pentandra*.

Sementes maduras de *B. pentandra* foram caracterizadas morfológicamente por avaliação da largura, do comprimento e da espessura através da medida individual, com um paquímetro. A média dos valores foi obtida de uma amostra de 50 sementes.

5.2. Obtenção do endosperma de sementes de *Bauhinia pentandra*.

Sementes quiescentes de *B. pentandra* foram fragmentadas manualmente utilizando um martelo para obter cotilédone e tegumento + endosperma. Para separar o endosperma do tegumento, 20 g desse material foram submetidos à aquecimento (ebulição) com metanol (66 %) e água em manta térmica, sob refluxo, durante 40 minutos. Após esse tempo, o material foi lavado com água corrente e em seguida deixado em água destilada (200 mL) na geladeira por 24 horas. Uma vez intumescido, foi feita a separação manual do endosperma (Figura 6).

5.3. Determinação da massa seca dos tecidos da semente.

Após a separação manual do tegumento e endosperma intumescidos, os mesmos foram deixados secar em temperatura ambiente. Em seguida, pesa-filtros previamente tarados, contendo amostras desses tecidos, bem como dos cotilédones, foram colocados em estufa a 110 °C por 24 horas para a determinação das suas respectivas massas secas. Após esse tempo foram retirados da estufa, e deixados em um dessecador, sobre sílica, até atingir o equilíbrio com a temperatura ambiente, sendo então pesados, e assim sucessivamente, até que os pesos permanecessem constantes. O teor de umidade da semente foi calculado pela diferença entre o somatório da massa seca de cada tecido individualmente e a massa fresca da semente inteira, e expresso em percentual (Figura 6).

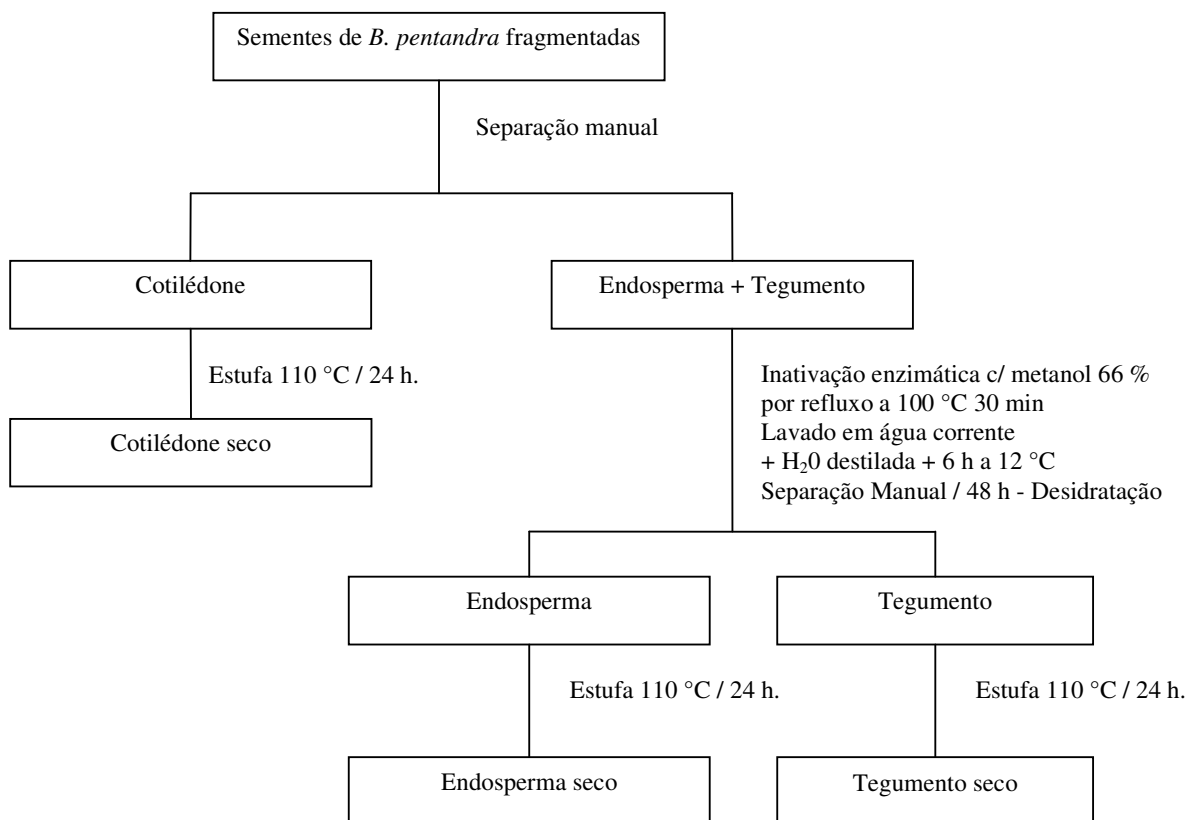


Figura 06 – Fluxograma de obtenção do endosperma e obtenção das massas secas dos tecidos da semente de *B. pentandra*.

5.4. Determinação dos teores dos constituintes químicos do endosperma.

5.4.1 Carboidratos totais.

O teor de carboidrato do endosperma de *B. pentandra* foi determinado pelo método do fenol-sulfúrico (DUBOIS *et al*, 1956) usando-se como padrão de referência uma solução de manose na concentração de 100 µg/mL. Todas as leituras foram feitas a 490 nm em espectrofotômetro Spectronic 20.

5.4.2. Nitrogênio total.

A dosagem de nitrogênio total do endosperma de *B. pentandra* foi realizada pelo método semi-micro Kjeldahl (HILLER *et al.*, 1948), adaptado por Baethgen e Alley (1989). Para mineralização foram utilizadas amostras de 20 mg, às quais foram adicionados 1,5 mL de ácido sulfúrico concentrado e 1,1 g da mistura catalítica (sulfato de potássio e sulfato de cobre, 9:1), sendo a mistura colocada em mineralizador por 30 minutos. Após mineralização, as amostras foram diluídas com água bidestilada para um volume de 10 mL. A uma alíquota desta solução final (100 µL) foram adicionados 900 µL de diluente, 5,5 mL de tampão e 4,0 mL da solução de salicilato de sódio (15 %), nitroprussiato de sódio (0,03 %) e 2 mL de hipoclorito de sódio a 6 %. A mistura em seguida foi deixada reagir por 15 minutos a 37 °C, em banho-maria e posteriormente teve sua absorbância determinada a 650 nm em espectrofotômetro (modelo LKB Ultrospec III, Pharmacia). O teor de nitrogênio na amostra, foi calculado com o auxílio de uma curva padrão e o teor de proteína total (%) foi calculado multiplicando-se o valor de nitrogênio total por 6,25.

5.4.3. Proteínas solúveis totais.

A presença e a dosagem de proteínas no endosperma de *B. pentandra* foram feitas pelo método de Hartree (1972). A curva padrão comparativa utilizada foi a de albumina sérica bovina (BSA) 100 µg/mL e a leitura colorimétrica, foi feita em espectrofotômetro, a 660 nm.

5.4.4 Umidade.

Para a determinação de umidade, pesa-filtros previamente tarados, contendo 1g do endosperma de *B. pentandra*, foram colocados em estufa a 110 °C por 24 horas. Em seguida, foram deixados em um dessecador, sobre sílica, até atingir o equilíbrio com a temperatura ambiente, sendo então pesados, e assim sucessivamente, até que as massas permanecessem constantes. O teor de umidade foi calculado pela diferença entre as massas iniciais e finais das amostras, sendo este valor expresso em percentagem (AOAC, 1990).

5.4.5. Cinzas.

Para a determinação do teor de cinzas, cadinhos de porcelana previamente tarados e incinerados, contendo 1 g do endosperma de *B. pentandra* foram colocados em mufla a 600 °C até a incineração completa da matéria orgânica, sendo posteriormente mantidos em um dessecador sobre sílica, até atingir a temperatura ambiente. A seguir, os cadinhos foram pesados e o teor de cinzas calculado pela relação entre a massa do resíduo e a massa inicial da amostra sendo o resultado expresso em percentagem (AOAC, 1990).

5.5. Obtenção de polissacarídeo do endosperma da semente de *Bauhinia pentandra*.

Aos endospermas de *B. pentandra* intumescidos foram adicionados 200 mL de água destilada e a mistura triturada em liquidificador, sendo posteriormente deixada sob agitação por 1 hora e em seguida centrifugado a 8.000 g por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi precipitado com etanol 1:3 (v/v) por 24 horas. O polissacarídeo obtido foi colocado em acetona por mais 24 horas, sendo então, seco a vácuo usando um dessecador. O precipitado foi redissolvido em água até que não se obtivesse mais polissacarídeo solúvel no sobrenadante (Figura 7).

5.6. Análise química do polissacarídeo de *Bauhinia pentandra*.

O polissacarídeo obtido do endosperma da semente de *B. pentandra* foi avaliado quanto ao seu grau de pureza através de análise química por determinação de carboidrato total, nitrogênio total e proteína solúvel.

Nitrogênio total e proteína solúvel foram determinados seguindo as mesmas metodologias utilizadas para o endosperma já descritas no item 5.4.2. e 5.4.3., respectivamente.

O teor de carboidrato do polissacarídeo de *B. pentandra* foi determinado pelo método do fenol-sulfúrico (DUBOIS *et al*, 1956) tendo uma solução de D- manose e D-galactose na razão de 3:1 como padrão. As amostras de polissacarídeo de *B. pentandra* foram solubilizadas em água destilada nas concentrações de 20, 40, 60, 80 e 100 µg/mL e a uma alíquota de 500 µL de cada amostra foram adicionados 500 µL de fenol 5 % e 2500 µL de ácido sulfúrico concentrado. Após agitação, a mistura

foi deixada em repouso por 15 min. Em seguida, após o término da reação, a absorbância das amostras, em 490 nm foram medidas e a concentração de carboidrato foi estimada com relação a uma curva padrão de galactose-manose variando de 5 a 100 µg/ mL de concentração.

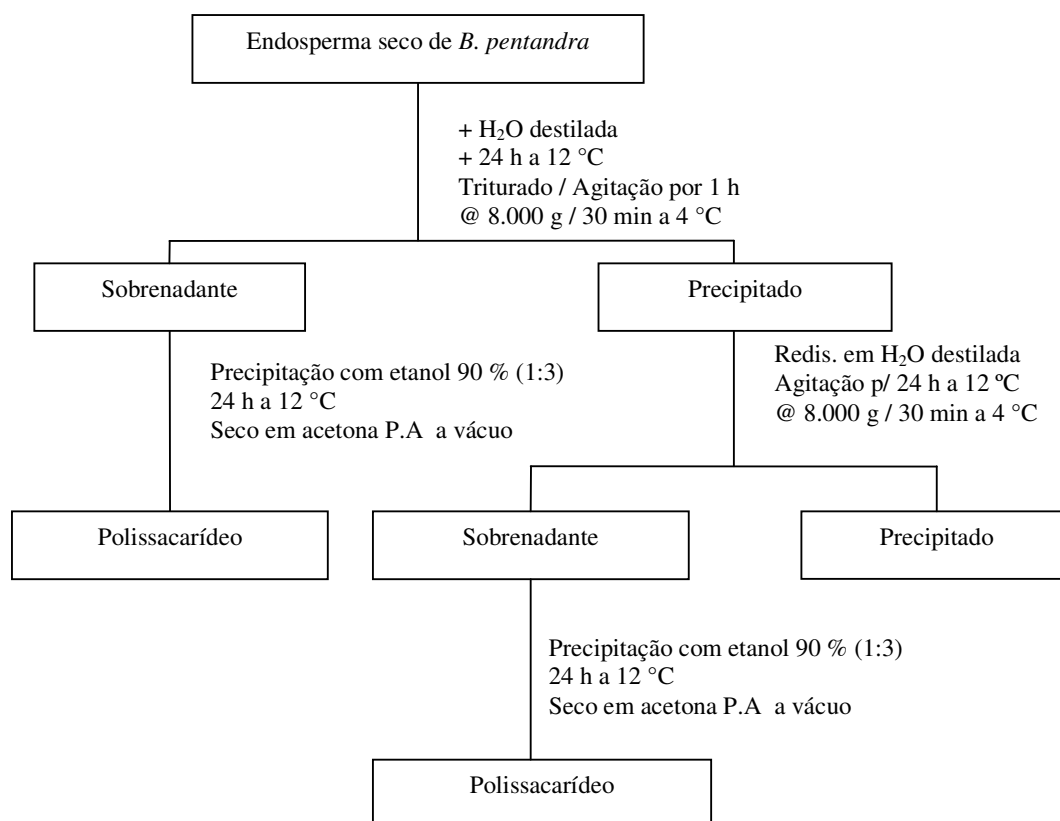


Figura 07 - Fluxograma de obtenção do polissacarídeo endospermico de *B. pentandra*.

5.7. Análise estrutural do polissacarídeo de *Bauhinia pentandra*.

5.7.1. Hidrólise ácida.

O polissacarídeo seco (10 mg) de *B. pentandra* foi dissolvido em 1 mL de água destilada, deixado sob agitação por 12 horas, e então, submetido a hidrólise ácida total em tubo devidamente fechado, utilizando 1 mL de ácido trifluoroacético (TFA) 2 M. Posteriormente foi colocado em estufa a 100 °C por 1 hora e 40 minutos.

Ao término da hidrólise, as amostras foram colocadas separadamente em placas de petri por 12 horas a temperatura ambiente, para a remoção por evaporação do excesso do ácido (Figura 8).

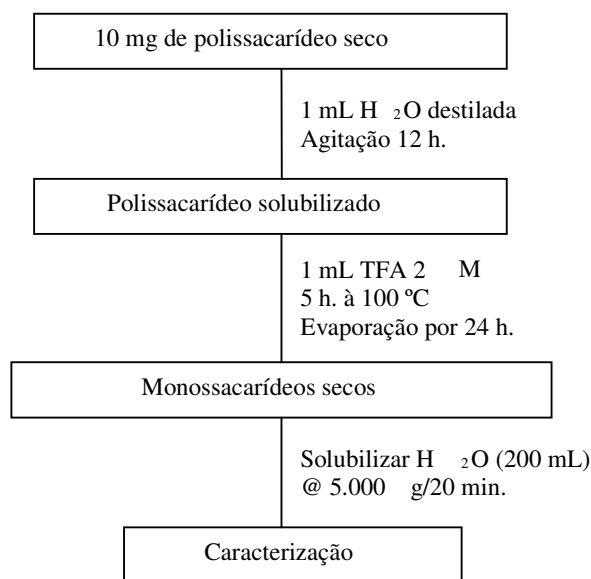


Figura 8: Fluxograma de obtenção do polissacarídeo endospérmico de semente de *B. pentandra* hidrolisado em TFA 2 M.

5.7.2. Cromatografia em camada delgada.

Para determinar a composição de açúcares do polissacarídeo endospérmico de *B. pentandra*, as análises por cromatografias em camada delgada foram realizadas em placas de vidro (18 x 16) impregnadas com sílica gel. Como padrão foram utilizados arabinose, manose, xilose, glucose e galactose na concentração de 20 mg/mL. A cromatografia foi eluída, inicialmente com *n*-butanol:etanol:água (4:1:1), após o que a placa foi seca ao ar e novamente eluída em *n*-butanol:ácido acético:água na proporção 4:1:1 (v/v/v) (MULLIMANI; PRASHANTH, 2002) sendo em seguida colocada para secar à temperatura ambiente. A revelação foi feita com uma solução ácida de orcinol (0,2 % de orcinol em solução aquosa de H₂SO₄ 40 %),

seguida de aquecimento em estufa a 100 °C, por 20 min. A partir das manchas reveladas foram calculados os Rfs (fator de retenção) dos padrões e das amostras.

5.7.3. Estimativa da massa molar por cromatografia de permeação em gel (GPC).

O polissacarídeo extraído do endosperma de *B. pentandra* foi submetido à cromatografia de permeação em gel (GPC) para a verificação da homogeneidade. O polissacarídeo foi solubilizado em solução de NaNO₃ 0,1 M (4 mg/mL) e após 12 horas sob agitação a 40 °C foi filtrado em membrana de nylon com poros de 0,2 µm. A solução preparada foi injetada (50 µL), com fluxo de 0,5 mL/min. em uma coluna Ultrahydrogel Linear de 7,8 x 300 mm (Waters), sendo utilizada, como fase móvel, solução de NaNO₃ 0,1 M a temperatura ambiente. As detecções das frações dos polissacarídeos foram realizadas utilizando-se um cromatógrafo LC-10AD (Shimadzu), com detectores de índice de refração (RI) diferencial WATERS modelo 2410 e com detector de espalhamento de luz em multiângulos (MALLS) WYATT TECHNOLOGY modelo DAWN DSP com 18 canais, acoplado em série.

5.7.4. Redução e Acetilação.

Após a hidrólise ácida total, os monossacarídeos resultantes, foram reduzidos e acetilados para análise em cromatografia líquido-gasosa (GLC). Os monossacarídeos reduzidos com boroidreto de sódio, a temperatura ambiente, durante 24 h, foram, em seguida, tratados com resina Lewatit na forma H⁺, para remover os íons Na⁺. Após a filtração, as soluções foram concentradas a 50 °C até uma completa evaporação e lavadas com metanol (três vezes) para remoção do borato de metila produzido. Os alditóis assim formados, foram acetilados com uma mistura piridina:anidrido acético (1:2 v/v) a temperatura ambiente, durante 16 horas, sendo então a reação encerrada pela adição de gelo moído. Os acetatos de alditóis foram extraídos com clorofórmio e o excesso de piridina foi eliminado com uma solução de sulfato de cobre a 5 % e água. Após a evaporação do solvente, os acetatos de alditóis foram analisados por GLC.

5.7.5. Cromatografia líquido-gasosa (GLC).

As cromatografias líquido-gasosas (GLC) foram realizadas em cromatógrafo Hewlett Packard, modelo 5890 serie II, com detector de ionização de chama, utilizando-se como gás de arraste nitrogênio e coluna 3 % de DB-210 sob “gas chrom Q” de 100-200 mesh, em tubo de aço inoxidável 30 m x 0,25 mm (d.i.) com detector a 250 °C, injetor a 250 °C e fluxo de nitrogênio a 40,0 mL/ min. A temperatura da coluna para os produtos de hidrólise na forma de acetato de alditol era de 250 °C.

5.7.6. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear.

O espectro de ressonância magnética nuclear de ^1H (RMN ^1H), e o espectro bidimensional HSQC foram obtidos com aparelho BRUKER, modelo DRX-500, com ressonância de ^1H , de 500 MHz. Os experimentos foram realizados utilizando-se água deuterada como solvente, sendo as amostras colocadas em tubos de 0,5 cm de diâmetro interno, numa temperatura de 80 °C. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em ppm. O solvente CDCl_3 δ de 77.0 ppm foi referenciado com relação ao TMS absorção em 7.25.

5.8. Análise viscosimétrica.

Para a análise viscosimétrica, uma solução de polissacarídeo de *B. pentandra* (2,0 mg/L) foi preparada em água destilada a temperatura ambiente, e deixadas sob agitação em agitador magnético por 12 horas. Diluições posteriores foram realizadas para obtenção de uma ampla faixa de concentrações. Os tempos de escoamento das soluções foram determinados em viscosímetro capilar de Ostwald ref. 75, em banho termostático marca Quimis, a temperatura controlada de 26 °C. As viscosidades relativas, específicas e reduzidas foram calculadas utilizando-se amostras em concentrações variáveis de 0,05 a 0,9 mg/mL. A variação da viscosidade reduzida extrapolada para a concentração zero forneceu a viscosidade intrínseca ($[\eta]$).

A viscosidade relativa (η_{rel}) corresponde à relação entre a viscosidade da solução (η) e a viscosidade do solvente (η_0), no qual o tempo de fluxo da solução (t) e do solvente foram cronometrados.

As determinações das viscosidades específicas das soluções foram feitas de acordo com a equação:

$$\eta_{esp} = \eta_{rel} - 1 \qquad \eta_{rel} = \frac{\eta}{\eta_0} = \frac{t}{t_0}$$

As viscosidades reduzidas (η_{red}), que correspondem à relação entre a viscosidade específica e a concentração da solução, foram determinadas para as soluções acima mencionadas, a diversas concentrações, conforme a equação:

$$\eta_{red} = \frac{\eta_{esp}}{C}$$

As viscosidades intrínsecas $[\eta]$ foram determinadas para as galactomananas medindo-se a viscosidade das soluções em baixas concentrações, em gráficos, na intercessão do eixo os valores de η_{red} contra a concentração do polissacarídeo (dL/g), e então extrapolando a uma diluição infinita, onde $c \rightarrow 0$. O valor da viscosidade para a concentração zero é denominado de viscosidade intrínseca, segundo a equação:

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \eta_{red}$$

A viscosidade intrínseca $[\eta]$ pode ser determinada pela equação de Huggins:

$$\eta_{esp}/C = [\eta] + K_{H[\eta]}^2 C$$

5.9. Modificação química do polissacarídeo de *Bauhinia pentandra*.

5.9.1. Reticulação da galactomanana de *B. pentandra* com epiclorigrina.

O polissacarídeo obtido do endosperma de *B. pentandra* foi modificado quimicamente segundo Apukuttan (1977). Para cada 0,5 g de polissacarídeo foram adicionados 0,15 mL de epiclorigrina 12,38 M e 1,5 mL de NaOH 3 M a 40 °C. A mistura foi agitada manualmente até a homogeneidade, mantida em estufa por 24 horas a 40 °C e por 12 horas a 70 °C. Após este período, o material foi lavado exaustivamente com água destilada, para eliminar todo NaOH e epiclorigrina em excesso presentes no meio. O material foi homogeneizado e passado em peneira de 30 mesh, tendo as partículas finas sido retiradas por lavagem exaustiva com água destilada. As concentrações de polissacarídeo e reagentes utilizados na reticulação estão apresentadas na tabela 5.

TABELA 5 - Reticulação do polissacarídeo de *Bauhinia pentandra*.

Volumes e concentrações usados			Concentração final no meio de reação			Razão	
Goma (g)	NaOH (3 M) (mL)	Epi (μL)*	Goma (g/mL)	NaOH (M)	Epi (M)	Epi/goma (mmol/g)	NaOH/Epi (M/M)
0,5	1,5	150	0,303	2,727	1,125	3,714	2,423

5.9.2. Reticulação das demais galactomananas estudadas.

A reticulação das galactomananas de *Adenantha pavonina*, *Caesalpine pulcherrima* e *Sophora japonica* foram realizadas seguindo a metodologia de Appukutan, 1977. Para cada 1,0 g de galactomanana foram adicionados 0,3 mL de epiclorigrina e 3,0 mL de NaOH 3 M. A mistura foi agitada manualmente, mantida em estufa por 24 horas a 40 °C e por 12 horas a 70 °C. Após este período, o material foi lavado exaustivamente com água destilada, até que o pH ficasse neutro. O

material foi homogeneizado e passado em peneira de 30 mesh, tendo as partículas finas sido retiradas por lavagem exaustiva com água destilada.

Abaixo está representada a reação de reticulação (figura 9).

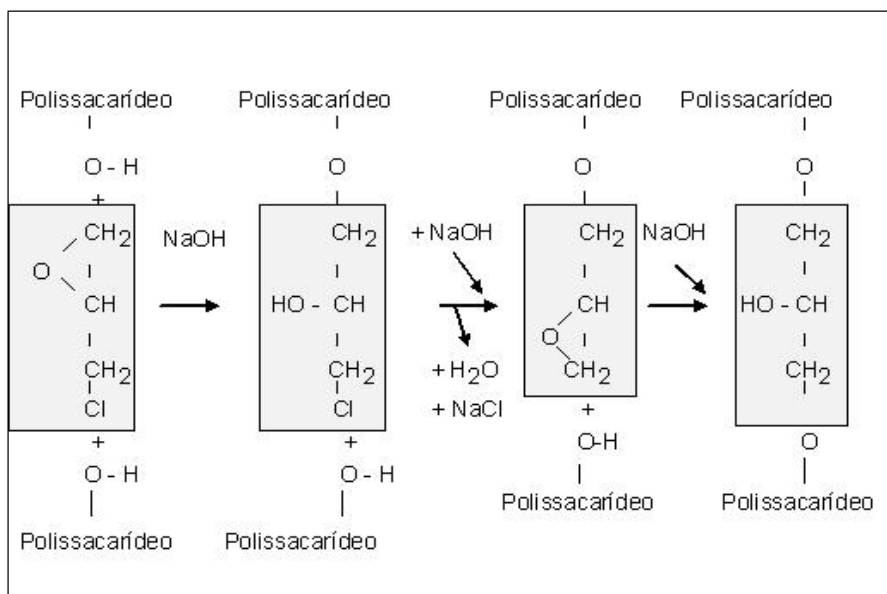


Figura 9: Reticulação do polissacarídeo pela epícloridrina.

5.9.3. Montagem das colunas cromatográficas.

Os géis obtidos a partir das reticulações dos polissacarídeos (*B. pentandra*, *Adenantha pavonina*, *Caesalpineia pulcherrima* e *Sophora japonica*) foram utilizados para a montagem de colunas cromatográficas deixando-os sedimentar por gravidade, lavados exaustivamente com NaCl 0,15 M seguida de tampão glicina 0,1 M pH 2,6 em NaCl 0,15 M e depois equilibrados novamente com NaCl 0,15 M para retirada de todo material solúvel, ainda presente. Com este procedimento foram obtidas colunas com um volume total de aproximadamente 5 mL.

5.10. Avaliação da matriz de afinidade da galactomanana de *Bahuinia pentandra* no isolamento de lectinas galactoses-ligantes.

Extratos brutos de *Artocarpus integrifolia* e *Artocarpus incisa* foram cromatografados em matriz de afinidade de galactomanana de *B. pentandra* no intuito de estudar a interação desta matriz frente às lectinas galactose ligantes.

Cotilédones de *A. integrifolia* e *A. incisa* previamente secos em acetona foram triturados obtendo-se uma farinha que foi extraída em solução salina 0,15 M na proporção de (1:10 m/v) por 30 minutos, sendo a mistura filtrada em nylon, e então centrifugada a 8.000 x g por 20 minutos. Os extratos límpidos (3 mL) foram aplicados separadamente na matriz cromatográfica de afinidade, previamente equilibrada com NaCl 0,15 M. A eluição da fração não retida foi feita com a mesma solução de equilíbrio a temperatura ambiente, em um fluxo constante de 30 mL/h, sendo recolhidas alíquotas de 2,1 mL por tubo. A fração rica em lectina foi eluída com tampão glicina 0,1 M pH 2,6 contendo solução de NaCl 0,15 M. A estimativa do teor de proteínas foi realizada por medida da absorbância a 280 nm.

5.11. Interação da lectina galactose específica de *Bauhinia pentandra* (LBp) com a matriz de galactomanana de *Bauhinia pentandra*.

5.11.1. Obtenção da farinha dos cotilédones.

As sementes de *B. pentandra* tiveram seus cotilédones mecanicamente separados do tegumento, triturados, e a farinha obtida foi armazenada em frascos hermeticamente fechados para posterior utilização.

5.11.2. Obtenção da farinha delipidada de cotilédone de semente de *Bauhinia pentandra*.

A farinha obtida dos cotilédones foi delipidada com hexano a frio. A farinha foi envolta em papel de filtro 5 µm na forma de um cartucho fechado nas extremidades. O cartucho foi imerso em hexano P.A. durante 12 horas a temperatura de 25 °C. O hexano foi substituído após esse período e deixado em contato por mais 12 horas.

5.11.3. Extração protéica.

A farinha delipidada obtida do cotilédone da semente de *B. pentandra* como descrita no item anterior, foi submetida à extração protéica em NaCl 0,15 M na proporção 1:10 (m/v) por 1 hora, sob agitação constante, a temperatura ambiente. Em seguida a amostra foi centrifugada a 8.000 x g por 20 minutos em centrífuga

refrigerada SORVALL RC-5B a 4 °C. O sobrenadante foi então utilizado para o isolamento da lectina por cromatografia de afinidade.

5.11.4. Cromatografia de afinidade em galactomanana de *Bauhinia pentandra*.

No extrato protéico obtido como descrito acima foi adicionado cloreto de cálcio e cloreto de manganês 5 mM e em seguida aplicado na coluna de galactomanana de *B. pentandra* e deixado em contato por uma hora. Após esse tempo, a eluição da fração não retida foi feita com a solução de equilíbrio (NaCl 0,15 M contendo cloreto de cálcio e cloreto de manganês 5 mM) a temperatura ambiente, em um fluxo constante de 30 mL/h com alíquotas de 1,5 mL por tubo. A fração retida foi eluída com tampão glicina 0,1 M pH 2,6 contendo solução de NaCl 0,15 M. A cromatografia foi monitorada por leitura da absorbância em um comprimento de onda igual a 280 nm.

5.12. Interação da lectina galactose específica de *Bauhinia pentandra* em diferentes matrizes cromatográficas.

Com o intuito de avaliar o comportamento da matriz de galactomanana de sementes de *B. pentandra* comparando-a com outras matrizes já descritas na literatura, colunas de *Adenantha pavonina* (TAVARES, 1998), *Caesalpineia pulcherrima* (BRAGA, 2000), *Sophora japonica* (CRISÓSTOMO, 2007), foram preparadas nas mesmas condições utilizadas para a matriz de *Bauhinia pentandra* (citada no item 5.9.3). Nesse estudo, também foi utilizando a matriz comercial Sepharose 4B.

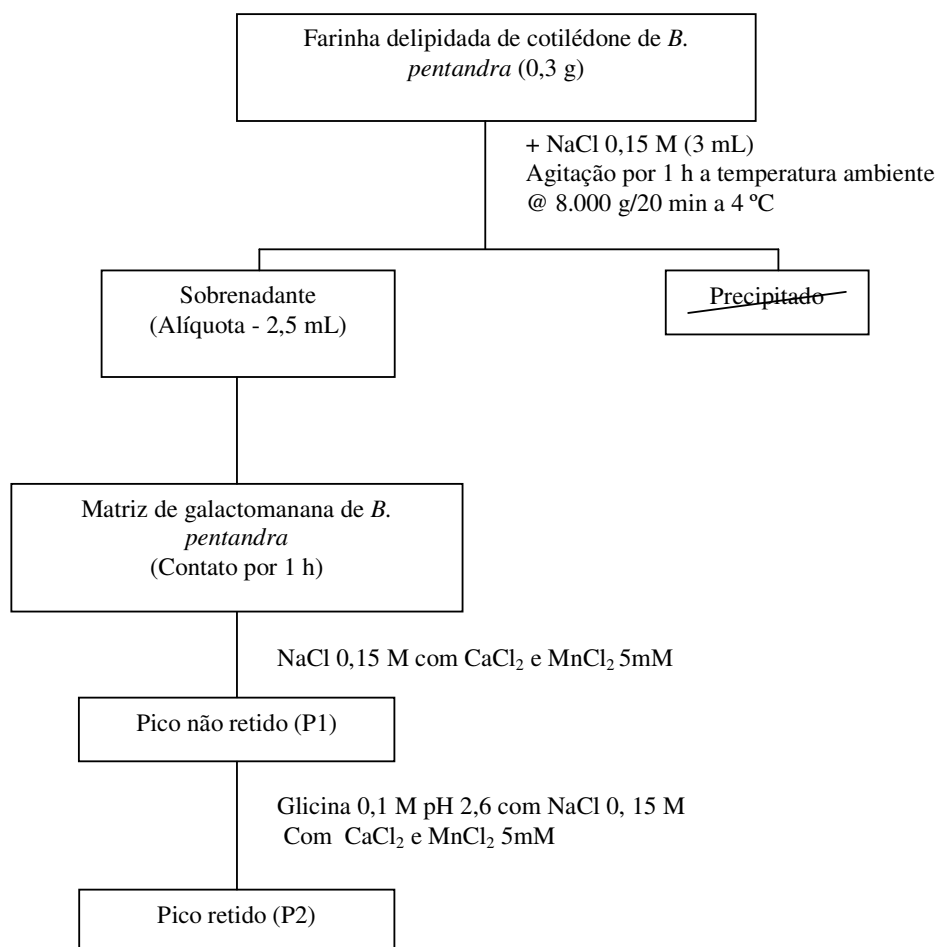


Figura 10: Fluxograma de extração protéica de farinha delipidada de *B. pentandra* e cromatografia de afinidade em matriz de galactomanana de *B. pentandra*.

5.13. Atividade hemaglutinante.

Na determinação da atividade hemaglutinante foi utilizado o método descrito por Moreira e Perrone (1977), segundo o qual hemácias diluídas a 2 % são adicionadas a diluições seriadas da amostra. Os ensaios foram feitos em placas de microtitulação, nas quais foram adicionadas, em cada poço, 50 μ L de NaCl 0,15 M contendo CaCl₂ 5 mM e MnCl₂ 5 mM. Nos primeiros poços, foram acrescentados 50 μ L das amostras e diluições seriadas (1/2, 1/4, 1/8...) foram feitas, homogeneizando-se completamente antes de cada transferência. Em seguida, foram adicionados em

todos os poços 50 μ L de uma suspensão de eritrócitos a 2 %. As placas foram incubadas a 37 °C por 30 minutos e, posteriormente, deixadas em repouso por mais 30 minutos a temperatura ambiente. A visualização dos aglutinados foi feita a olho nu e os resultados expressos como atividade específica (UH/mg P), onde uma UH representa o inverso da maior diluição ainda capaz de aglutinar eritrócitos.

5.14. Eletroforese em gel de poliacrilamida.

Os experimentos de eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS e β -mercaptoetanol foram feitos segundo a técnica de Laemmli (1970), usando-se um gel de aplicação de 3,5 % de acrilamida em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 e um gel de separação contendo 12,5 % de acrilamida em tampão Tris-HCl 0,5, pH 8,8. As placas utilizadas tinham dimensões de 14 cm de largura por 12 cm de altura. A espessura do gel foi de 1 mm. A corrida foi realizada a uma temperatura de 7 °C, com a amperagem inicial fixada em 25 mA e voltagem inicial de 70 Volts. A voltagem foi ajustada para que não excedesse a 150 Volts, evitando assim o aquecimento do sistema. As corridas tiveram duração média de 40 minutos.

As amostras (100 μ L) foram preparadas em tampão Tris-HCl 0,0625 M pH 8,3 contendo SDS 1%, β -mercaptoetanol, sacarose e azul de bromofenol (50 μ L). As amostras foram previamente aquecidas em água (12 min) e centrifugadas por 1 minuto em centrífuga Eppendorf. Após a corrida, as bandas foram visualizadas por revelação com prata segundo procedimento descrito por Blun e colaboradores (1987).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.

6.1. Caracterização morfológica das sementes de *Bauhinia pentandra*.

As sementes de *B. pentandra* apresentam uma coloração marrom escura, possuem uma forma arredondada com aproximadamente 2 mm de espessura, 5,5 mm de comprimento, 5 mm de largura e massa de 92 mg (tabela 6). Essas características são semelhantes às encontradas para a espécie de *B. unguolata* por Lima (2005).

Os resultados encontrados foram utilizados para calcular o teor de umidade da semente e para determinar o rendimento final de polissacarídeo endospermico a partir da massa das sementes íntegras.

TABELA 6 - Caracteres morfológicos das sementes de *Bauhinia pentandra* e *Bauhinia unguolata* L.

Parâmetro	<i>Bauhinia pentandra</i>	<i>Bauhinia unguolata</i> *
Comprimento (mm)	5,4 ± 0,13	4,86 ± 0,16
Largura (mm)	4,94 ± 0,20	4,90 ± 0,26
Espessura (mm)	2,0 ± 0,11	2,50 ± 0,15
Massa (mg)	92,0 ± 4,33	90 ± 6,33
Umidade (%)	10,11	8,75

*Fonte: Lima (2005).

6.2. Determinação da massa seca dos tecidos da semente.

O endosperma representa 42,08 % da matéria seca da semente de *B. pentandra* (tabela 7). Esse resultado indica que o endosperma perfaz 37,83 % da semente íntegra. Resultados similares foram encontrados para outras sementes de leguminosas como *Parkinsonia aculeata* com 33,8 % (GARROS-ROSA, 2006), *Caesalpineia pulcherrima* com 44,4 % (BRAGA, 2001), *Gleditsia ferox* com 43,1 % (EGOROV *et al* 2003) e com as sementes de *Cássia*, que possuem geralmente mais que 40 % de endosperma. *Cássia agustifolia*, por exemplo, é um arbusto cultivado em larga escala no sudeste da Índia, que apresenta sementes com e cerca de 50 % de endosperma, características favoráveis, visto que, para a produção comercial de galactomananas, plantas arbustivas ou ervas e com esse percentual de

endosperma, são preferidas em relação às árvores (SRIVASTAVA; KAPOOR, 2005). Assim, as sementes de *B. pentandra* se enquadram perfeitamente nesse perfil desejável.

TABELA 7 - Massa seca média dos tecidos da semente de *B. pentandra*.

Estrutura	Peso (mg)	%
Tegumento	29,5	35,67
Endosperma	34,8	42,08
Cotilédone	18,4	22,25

6.3. Determinação dos teores dos constituintes químicos do endosperma da semente de *Bauhinia pentandra*.

O endosperma da semente de *B. pentandra* apresentou um teor de carboidrato em torno de 92 % do total de constituintes endospérmicos (Tabela 8). Estes valores estão próximos dos encontrados para o endosperma de outras sementes anteriormente estudadas como: *Adenantha pavonina* (TAVARES; 1998), *Sophora japonica* (SMIRNOVA et al 2003), *Delonix regia* e *Schizolobium parahybae* (MATOS, 2000) que foram de 91 %, 93,5 % e 95,25 % respectivamente.

O valor de proteína total observado foi de 6,75 %, valor próximo aos encontrados para *Cyamopsis tetragonolobus* de 5 % (GYNTHER, 1984), *Parkinsonia aculeata* de 4,5 % (GARROS-ROSA, 2006) e *Caesalpineia pulcherrima* de 4,5 % (BRAGA 2001).

O teor de cinzas obtido no endosperma de semente de *B. pentandra* foi de 0,84 %, valor elevado quando comparado com o obtido para *Adenantha pavonina*, de 0,41 % (TAVARES; 1998), no entanto, bem menor do que o encontrado para o endosperma de *Parkinsonia aculeata* de 2,63 % (GARROS-ROSA, 2006).

O teor de lipídios, obtido por diferença depois de realizadas as demais determinações de constituintes do endosperma, também se mostrou baixo (Tabela 8).

TABELA 8 - Composição química do endosperma da semente de *B. pentandra*.

Frações	%
Proteína	6,75
Lipídios	0,81
Carboidratos	91,60
Cinzas	0,84

6.4. Isolamento do polissacarídeo do endosperma de semente de *Bauhinia pentandra*.

O polissacarídeo do endosperma da semente de *B. pentandra* apresentou um rendimento médio de 15,7 % da massa do endosperma e cerca de 6 % da semente íntegra. Rendimentos inferiores aos obtidos a partir dos endospermas de *A. pavonina*, 24,4 % (TAVARES, 1998) e *Sophora japonica*, de 30 % (SMIRNOVA, 2003), bem como do endosperma de *Parkinsonia aculeata*, 26,2 % e 8,85 % da semente (GARROS-ROSA, 2006). No entanto, esses valores são condizentes com os já obtidos para a maioria das sementes de leguminosas, visto que, de 88 espécies de leguminosas estudadas por Tookey e colaboradores (1962), apenas 11 espécies apresentaram um rendimento de galactomanana maior que 20 %, enquanto 17 entre 15-20 % e a maioria (31 espécies) apresentaram um rendimento menor que 10 % da semente. Egorov e colaboradores (2003) obtiveram um rendimento de galactomanana em torno de 19 % para a semente de *Gleditsia ferox* DESF, valor esse considerado alto.

Outras famílias que não leguminosas também já foram avaliadas quanto ao seu rendimento de galactomananas endospermicas, como *Compositae* (12 espécies), *Malvaceae* (08 espécies), *Umbelliferae* (07 espécies) e todas apresentaram um rendimento inferior a 10 % da massa da semente íntegra (SRIVASTAVA; KAPOOR, 2005), enquanto Vieira e colaboradores (2005) encontraram um rendimento em torno de 10-14 % para *Prosopis juliflor*, uma leguminosa da subfamília *mimosaceae*.

6.5. Análise química do polissacarídeo obtido do endosperma de *Bauhinia pentandra*.

O grau de pureza do polissacarídeo obtido do endosperma da semente de *B. pentandra* foi avaliado pelo teor de nitrogênio total e proteínas solúveis.

O percentual protéico encontrado no polissacarídeo endospérmico de *B. pentandra* foi de 1,52 %, valor compatível com galactomananas extraídas de outras sementes. Tavares (1998), avaliando galactomanana de *Adenantha pavonina* encontrou 1,68 % de compostos protéicos nessa amostra. Um valor maior foi encontrado para a galactomanana endospérmica de *Schizolobium parahybae*, a qual apresentou 2,21 % de proteína como constituinte (MATOS, 2000).

6.6. Análise estrutural do polissacarídeo de *Bauhinia pentandra*.

6.6.1. Cromatografia em camada delgada (CCD).

Quando o polissacarídeo obtido do endosperma da semente de *B. pentandra* foi hidrolisado com ácido trifluoracético (TFA) e avaliado por cromatografia em camada delgada foi observado a presença predominante de unidades de manose e galactose, os quais apresentaram fatores de referência (Rfs) correspondentes aos Rfs dos padrões manose e galactose (0,50 e 0,35 respectivamente). Esses resultados são condizentes para aqueles encontrados para outras galactomananas de leguminosas já estudadas (Figura 11).

6.6.2. Cromatografia de permeação em gel (GPC).

Para a verificação da homogeneidade do polissacarídeo isolado, foi realizada uma cromatografia de permeação em gel utilizando detector de índice de refração (IR) e detector de espalhamento de luz em multiângulos (MALLS).

O cromatograma obtido por GPC da galactomanana *B. pentandra* está mostrado na Figura 12. Pelo perfil apresentado, a galactomanana se mostra homogênea apesar de apresentar dois picos adicionais, quando analisado pelo detector de índice de refração, mas com área bastante inferior (em torno de 3 %) ao pico principal e com tempo de exclusão acima de 60 minutos.

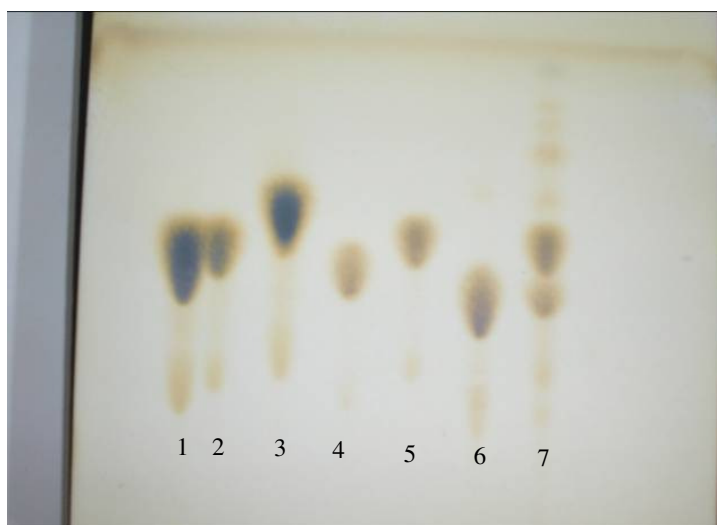


Figura 11. Cromatografia em camada delgada do polissacarídeo endospérmico da semente de *Bauhinia pentandra*. Amostras (20 mg/mL): poço 1 e 2 – Arabinose (1 spot), 3 – Xilose (1 spot), 4 – Glucose (1 spot), 5 – Galactose (1 spot), 6 – Manose (1 spot) e 7 – Polissacarídeo hidrolisado de *B. pentandra* (1 spot).

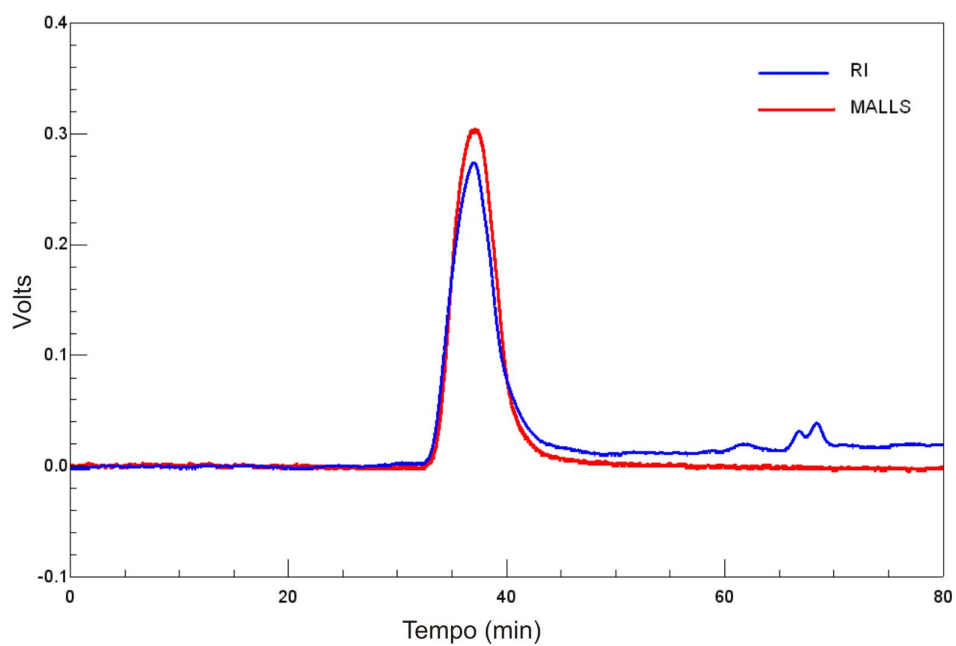


Figura 12 - Cromatografia de permeação em gel do polissacarídeo endospérmico da semente de *B. pentandra*.

6.6.3. Cromatografia gás-líquido (GLC).

Quando o polissacarídeo obtido do endosperma da semente de *B. pentandra* foi hidrolisado e avaliado por cromatografia líquido-gasosa, observou-se a presença de unidades de manose (73,2 %) e galactose (21 %) perfazendo assim 94 % de galactomanana do polissacarídeo endospérmico. Além desses, foram encontrados teores menores de ramnose, glucose e arabinose, formando os 6 % restantes de carboidratos. Valores próximos dos encontrados para *Gleditsia ferox* que apresentou 95 % de galactose e manose juntos e 5 % entre arabinose, xilose e glucose (EGOROV; KAPOR, 2003), e os mesmos encontrados para o polissacarídeo endospérmico de *Sophora japonica* (SMIRNOVA *et al* 2003).

Considerando apenas os resíduos de manose e galactose, encontramos uma proporção (Man:Gal) de 3,5:1 (Figura 13 e Tabela 9). Essa proporção é semelhante com as proporções de galactomananas de muitas leguminosas já determinadas como: *Cássia alata* (3,3:1), *Cássia absus* (3,0:1) *Cássia occidentalis* (3,0:1), *Cassia tora* (3,0:1), *Gleditsia triacanthos* (3,2:1) (SRIVASTAVA; KAPOOR; 2005) e *Schizolobium amazonicum* (3,0:1) (GANTER *et al* 1995), *Caesalpinia pulcherrima* (3,1:1) (ALMEIDA-SILVA; 2005). No entanto, mostrou-se maior que *Adenanthera pavonina* (1,8:1) (TAVARES; 1998); *Dimorphandra mollis* (2,3:1) (PANEGASSI, *et al* 2000); *Stryphnondendron barbatiman* (1,5:1); *Mimosa scabrella* (1,1:1) (GANTER *et al* 1995) *Senna multijuga* (2,3:1) e *Gleditsia ferox* (2,6:1) (EGOROV *et al* 2003).

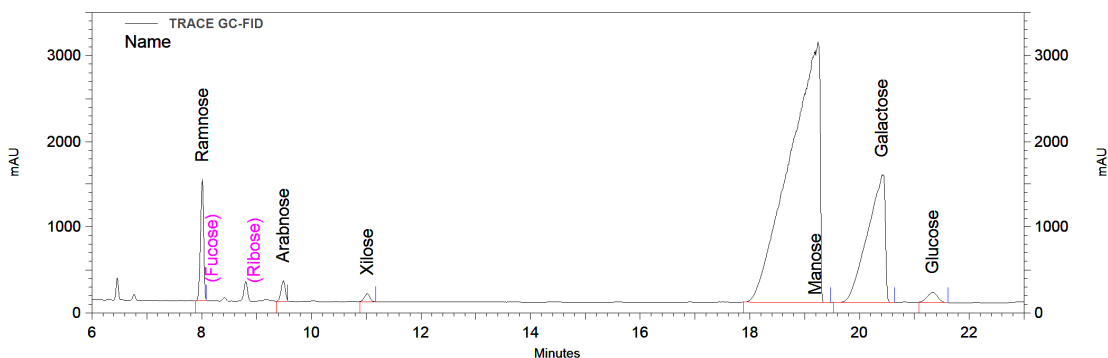


Figura 13 - Cromatografia líquido-gasosa do polissacarídeo endospérmico hidrolisado da semente de *Bauhinia pentandra*.

TABELA 9 - Composição em monossacarídeos do polissacarídeo endospermico de *B. pentandra* avaliado por cromatografia líquido-gasosa (GLC).

MONOSSACARIDEO	Percentual relativo (%)
Ramnose	3,590
Arabinose	0,814
Xilose	0,402
Manose	73,185
Galactose	21,018
Glucose	0,991

6.6.4. Ressonância magnética nuclear (RMN).

Análises uni e bidimensionais de RMN foram empregadas para investigar a estrutura da galactomanana do endosperma da semente de *Bauhinia pentandra*. Os sinais de prótons e carbonos foram assinalados baseados em dados reportados na literatura para diferentes galactomananas (KAPOOR, *et al.*, 1998; RAMESH; ONO; TSUSHIDA, 2001; ISHRUD, *et al.* 2001; CARBONERO, *et al.* 2003, EGOROV, *et al.*, 2004; SMIRNOVA *et al.* 2004; VIEIRA, *et al.*, 2007). O espectro ^1H RMN está mostrado na figura 14. Esse espectro apresenta sinais de deslocamento químico (δ) para os prótons dos carbonos anoméricos dos resíduos de galactose e manose de 5,00 e 4,72 respectivamente. A razão M:G pode ser obtida diretamente das áreas relativas destes sinais (VIEIRA, *et. al* 2007) e para essa galactomanana apresentou uma razão M:G de 2,5:1. Os valores de deslocamentos químicos do espectro de ^1H RMN estão compatíveis com os esperados para a conformação $^4\text{C}_1$ dos anéis de α -D-galactopiranosose e β -D-manopiranosose (ISHRUD, *et al.* 2001).

Os valores de deslocamentos químicos dos prótons anoméricos mostrados na figura 14, estão bem separados. No entanto dois sinais de H-6 foram encontrados sobrepostos tanto na figura 15 como no espectro de HSQC (figura 16a). Nesse espectro o deslocamento químico para o ^1H e para ^{13}C do H-6 e C-6 do resíduo de alfa-D-galactopiranosil é de 3,74 e 61,83 ppm respectivamente. Após expansão do ^1H RMN foi possível evidenciar a separação do sinal de H-6 aparecendo com valores de deslocamento de 3,73 e 3,72 (figura 15).

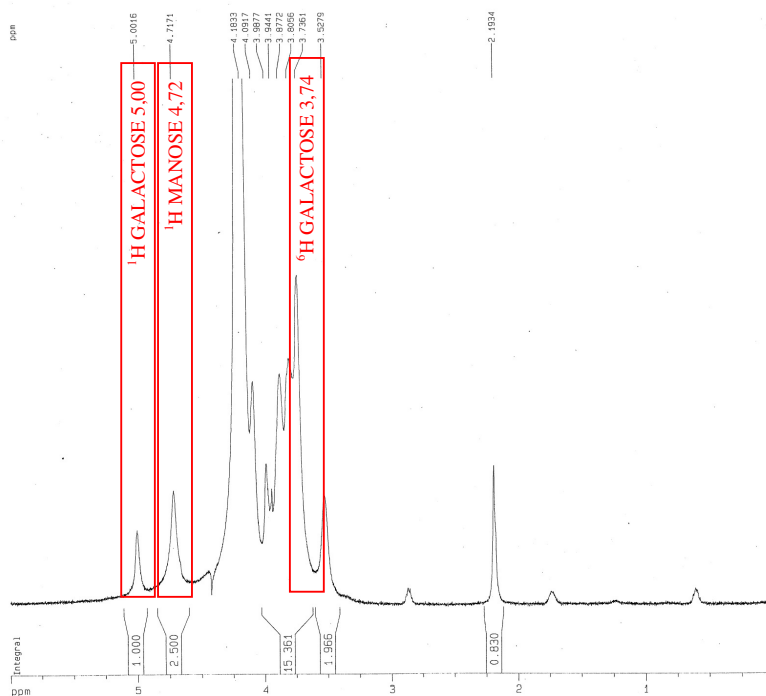


Figura 14: Espectro de ^1H da galactomanana de *B. pentandra*. Os deslocamentos químicos são expressos em δ ppm.

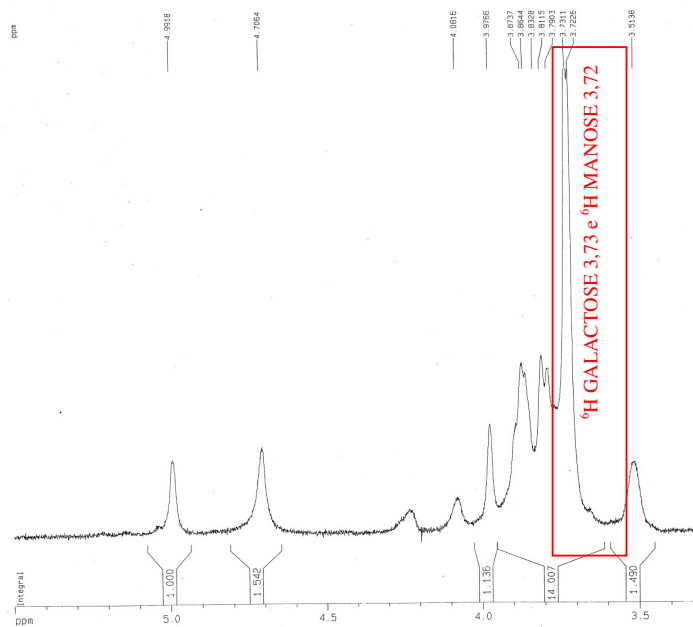


Figura 15: Espectro de ^1H expandido da galactomanana de *B. pentandra*. Os deslocamentos químicos são expressos em δ ppm.

O espectro de HSQC (figura 16a e 16b) mostra a correlação dos carbonos com seus respectivos prótons, resultados mostrados na tabela 10. Uma análise dos deslocamentos de ^{13}C dos resíduos de galactose no polímero mostra que estes resíduos apresentam configuração alfa ($\delta=99,5$ ppm) e corresponde a uma piranose (deslocamento químico de C-6 igual a 61,9 ppm). Estes mesmos resultados foram encontrados para a galactomanana de *Styphnolobium japonicum* (SMIRNOVA *et al.*, 2004) e estão em concordância com os valores de deslocamento químico de resíduos de α -galactopiranose livre, exceto para os sinais de C-1, o qual está deslocado para campo baixo de +6,7 ppm, indicando que apenas o átomo de C-1 está envolvido na formação da ligação covalente, evidenciando que os resíduos de galactose não apresentam substituições (EGOROV, *et al.* 2004). Portanto, o resíduo de α -galactose na galactomanana está representado por um terminal não redutor, o qual está ligado a outro componente do polissacarídeo que é a manose. A análise dos sinais dos resíduos de manose leva-nos às seguintes conclusões: a posição do sinal de C-5 (75,8 ppm) indica que os resíduos de manose do polímero apresentam-se na configuração β . O deslocamento químico de C-6 do resíduo de manose (61,3 ppm) e a ausência de sinais entre 63–64 ppm sugerem que os resíduos de monossacarídeos apresentam-se na forma de piranose (EGEROV, 2004). Uma comparação da posição dos sinais de resíduos de manose no polímero e os sinais de β -manopiranose livre (tabela 11) mostra que os sinais de C-1 e C-4 estão significativamente deslocados para campo baixo (+5,8 ppm e +9,3 ppm, respectivamente) indicando o envolvimento de C-1 e C-4 na formação de ligações covalentes. Portanto na cadeia principal os monossacarídeos de manose estão ligados um ao outro através de ligação β 1-4.

Examinando o espectro de COSY (figura 17) podemos verificar que o próton anomérico do resíduo de galactose está acoplado com um deslocamento químico de 3,81 ppm que corresponde ao H-2 da galactose e com 3,84 ppm que corresponde ao hidrogênio do carbono de manose substituído pelo resíduo de galactose que nesse caso é o H-6 da manose. Enquanto o próton anomérico do resíduo de manose (4,73 ppm) está acoplado apenas ao H-2 (4,11 ppm) do resíduo de manose. (CARBONERO, 2003).

Diante dos resultados obtidos por ressonância magnética nuclear podemos concluir que a estrutura desse polissacarídeo é uma galactomanana clássica formada

por uma cadeia linear de manose unidas por ligações $\beta(1-4)$ com substituições de galactose em ligação $\alpha(1-6)$.

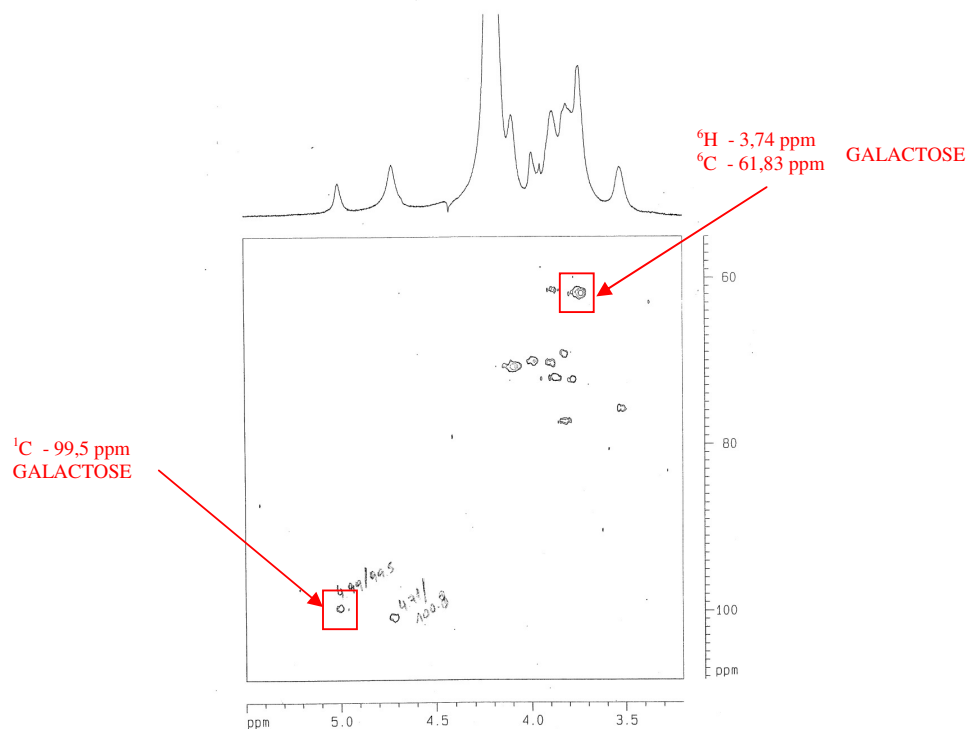


Figura 16a: Espectro de HSQC da galactomanana de *B. pentandra*. Os deslocamentos químicos são expressos em δ ppm.

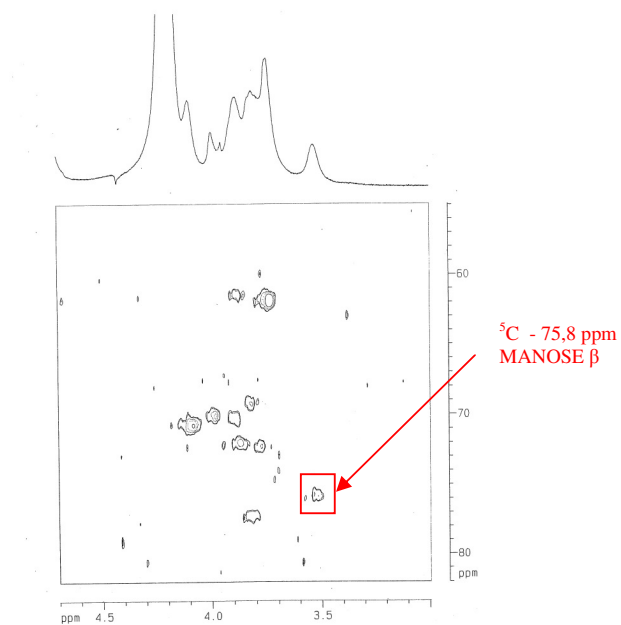


Figura 16b: Espectro de HSQC da galactomanana de *B. pentandra*. Os deslocamentos químicos são expressos em δ ppm

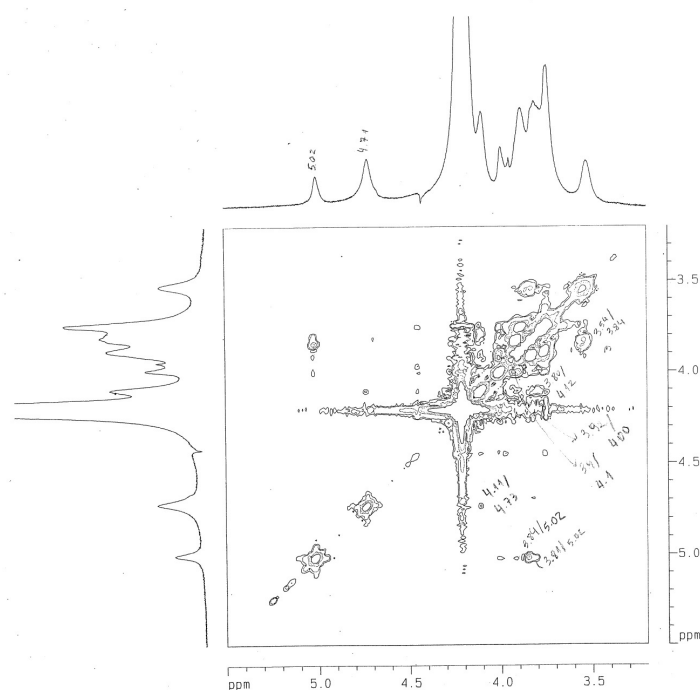


Figura 17: Espectro de COSY da galactomanana de *B. pentandra*. Os deslocamentos químicos são expressos em δ ppm.

Tabela 10: Deslocamento químico de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C (ppm) da galactomannana de *B. pentandra*.

Posição	^1H	^{13}C
Gal		
1	5,00	99,5
2	3,81	69,2
3	3,89	70,2
4	3,99	70,04
5	3,87	71,90
6	3,74	61,83
Man		
1	4,72	100,8
2	4,09	70,7
3	3,77	72,2
4	3,82	77,2
5	3,53	75,7
6	3,88	61,36

Tabela 11: Posição e interpretação dos deslocamentos de ^{13}C a partir do HSQC para a galactomanana de *B. pentandra* a partir dos valores de α -galactopiranosose e β -manopiranosose.

Monossacarídeos	Deslocamentos químicos (δ), ppm.					
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
α - D-galactopiranosil	99,6	69,2	70,1	70,0	71,9	61,9
α -galactopiranosose*	93,5	69,9	70,4	70,6	71,7	62,4
4-O- β -D-manopiranosil	100,7	70,7	72,0	77,2	75,8	61,3
β -manopiranosose*	94,9	72,5	74,3	67,9	77,4	62,3

* Dados para comparação (SMIRNOVA, *et al.* 2004).

6.7. Análise viscosimétrica do polissacarídeo endospérmico de *Bauhinia pentandra*.

As galactomananas de sementes são polissacarídeos hidrossolúveis, geralmente com alta massa molar e com propriedades específicas em solução. Uma das formas para o entendimento dessas propriedades é a análise de sua viscosidade, onde o parâmetro viscosidade intrínseca é uma característica específica de cada molécula em um determinado solvente.

A viscosidade é uma propriedade determinante para usos e aplicações dos materiais fluidos. Além de ser uma medida direta da qualidade do fluido, ela pode fornecer importantes informações sobre mudanças fundamentais em sua estrutura durante um determinado processo, como por exemplo: polimerização, emulsificação e homogeneização.

Para o polissacarídeo do endosperma de *B. pentandra* o valor da viscosidade intrínseca, obtido através de medidas efetuadas em sistema capilar, foi de 10,1 dL/g (figura 18). Esse valor está próximo dos encontrados para a galactomanana de *S. japonica* (10,2 dL/g) (SMIRNOVA, 2003), *Cyamopsis tetragonolobus* (10,5 dL/g) (APPUKUTTAN *et al.*, 1977) e de semente madura de *C. pulcherrima* (10,83 dL/g) (ALMEIDA-SILVA, 2005).

Comparando com *Schizolobium parahybum* (8,50 dl/g); *S. amazonicum* (9,50 dL/g), *Mimosa scabrella* (9,0 dL/g) (GANTER *et al* 1995), *T. foeno-graecum* (9,61 dL/g) (BRUMMER *et al.*, 2003) e *P. aculeata* (4,28 dL/g) (GARROS-ROSA; 2006), podemos dizer que *Bauhinia pentandra* apresentou valor um pouco mais alto, porém

bem menor que o encontrado para a galactomanana endospérmica de *Geditsia ferox* (14,30 dL/g) (EGOROV *et al* 2003).

Essas diferenças de valores de viscosidades intrínsecas para polissacarídeos de diferentes fontes podem ser ocasionadas pelas diversidades estruturais de cada polissacarídeo. Na Tabela 12 podemos evidenciar que galactomananas de mesma relação M:G podem apresentar valores de viscosidade bastante variados dependendo da massa molar.

TABELA 12 – Valores de viscosidade intrínseca (solvente água) e relação M:G do polissacarídeo endospérmico de *B. pentandra* comparado com os de outras leguminosas.

Galactomanana	Relação M:G	Viscosidade (dL/g)
<i>B. pentandra</i>	2,5:1	10,1
<i>S. japônica</i>	5,3:1	10,1
<i>C. pulcherrima</i>	3,1:1	10,8
<i>T. foenum-graecum</i>	1,1:1	9,61
<i>S. amazonicum</i>	3,0:1	9,50
<i>M. scabrella</i>	1,1:1	9,0
<i>S. parahybum</i>	3,0:1	8,50
<i>P. aculeata</i>	3,1:1	4,28

A constante de Huggins (k'), que indica o grau de interação intermolecular foi determinada através de sua fórmula $\eta_{red.} = [\eta] + k' \cdot [\eta]^2 \cdot C$ e apresentou valor igual a 1,45. O valor desse parâmetro pode ser interpretado como uma medida de interação polímero-polímero, polímero-solvente e como um indicativo da efetividade do solvente para uma determinada amostra (WANG *et al* 1994), quando os valores variam entre 0,3 e 0,8 indicam bom solvente, e valor maior que um, sugere associações intermoleculares.

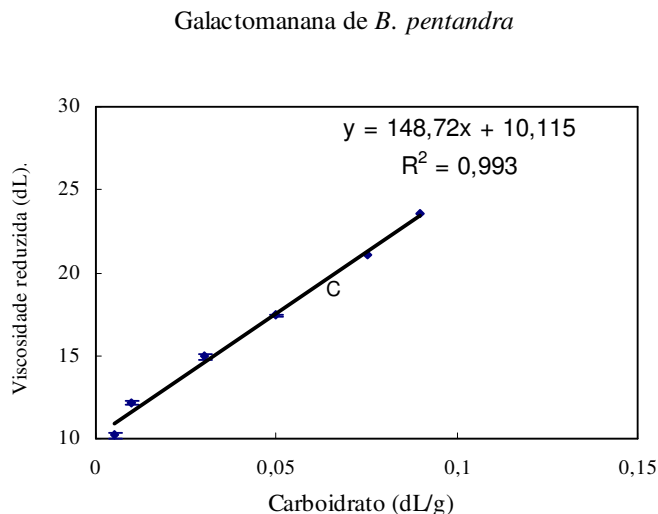


Figura 18: viscosidade da galactomanana de *B. pentandra* em viscosímetro capilar de Ostwald ref. 75, em banho termostático Marca Quimis, a temperatura controlada de 26 °C em água.

6.8. Avaliação da galactomanana de *Bauhinia pentandra* como matriz de afinidade para lectinas galactoses-ligantes.

A galactomanana de *B. pentandra* após ser reticulada com epícloridrina foi capaz de interagir com as lectinas α -D-galactose ligante de *A. integrifolia* (jacalina) e *A. incisa* (frutalina), como pode ser evidenciado na figura 19 A.

Após ter saturado a matriz de afinidade com extrato total (3 mL) de sementes de *A. integrifolia* e *A. incisa*, resultado comprovado pela atividade hemaglutinante realizada com eritrócitos de coelho a 2 %, dos picos não retidos, foi evidenciado que a matriz obtida a partir da reticulação de 0,5 g de galactomanana de *B. pentandra* e com volume de 5 mL, reteve 0,73 mg e 0,44 mg de jacalina e frutalina respectivamente por cromatografia realizada.

A menor interação da matriz por frutalina já foi anteriormente evidenciada em outras galactomananas como *Parkinsonia aculeata* (GARROS ROSA, 2006), *Caesalpinia pulcherrima* (BRAGA, 2005), *Schizolobium parahybae* e *Delonix regia*, (MATOS, 2000). Esta diferença na interação da galactomanana com as referidas lectinas deve-se, provavelmente, a diferenças na estrutura fina dos sítios ligantes das mesmas.

A pureza da lectina de *A. integrifolia* (jacalina) isolada pela matriz de afinidade foi comprovada por eletroforese em gel de poliacrilamida (figura 19 B).

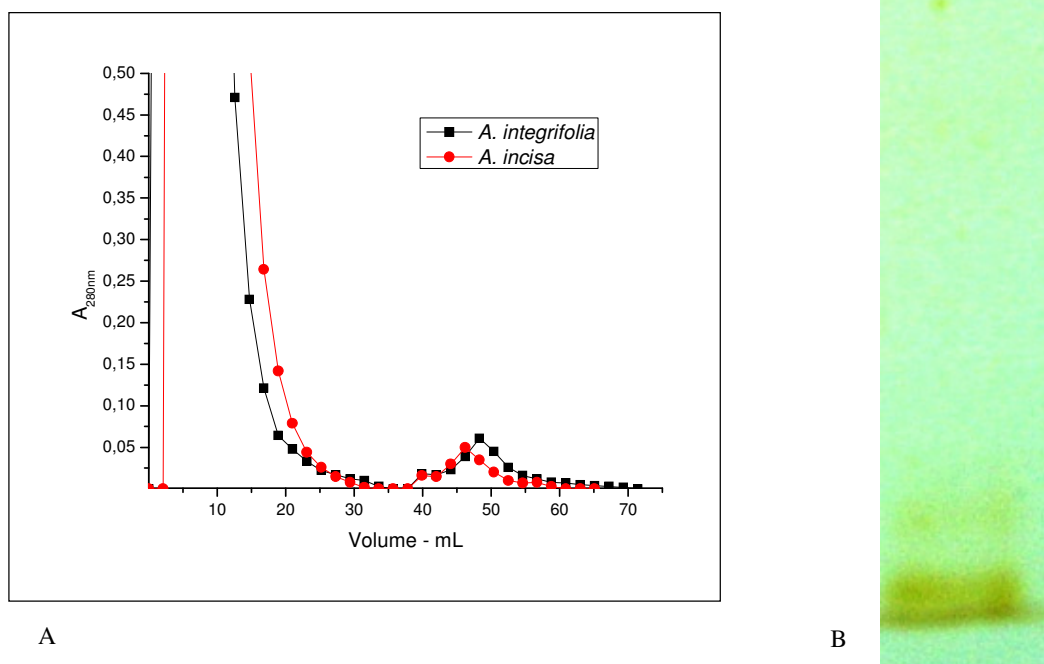


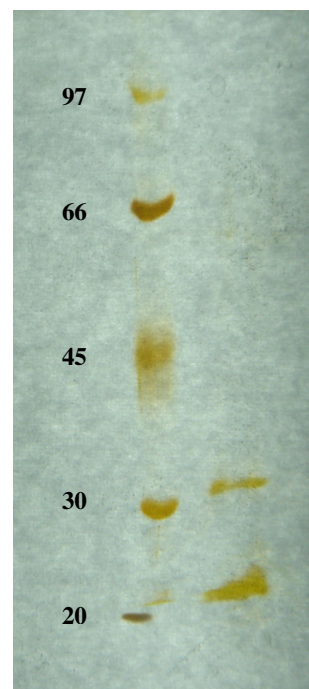
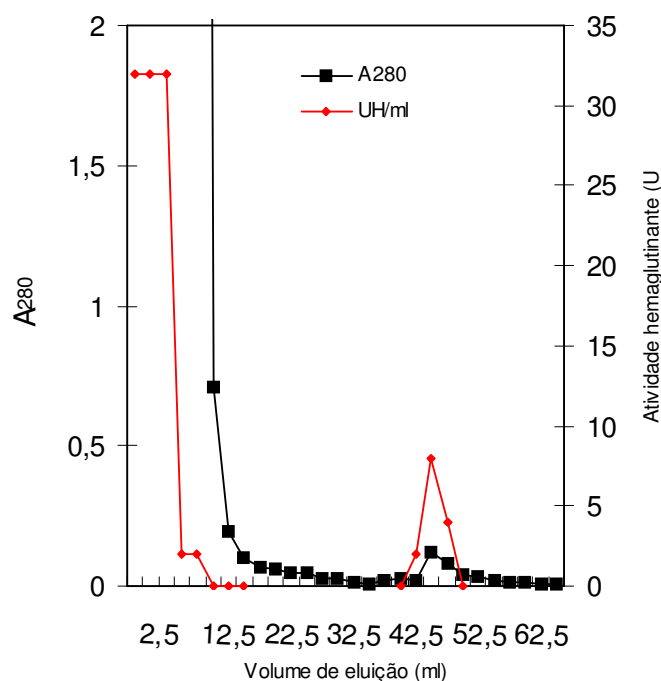
Figura 19A- Perfil cromatográfico de afinidade em galactomanana de *B. pentandra*. Volume da coluna: 5 mL. Amostras: Extratos totais de sementes de *A. integrifolia*, *A. incisa* (3 mL). Eluição: NaCl 0,15 M para o pico não retido e tampão glicina-HCl 0,1M pH 2,6 com NaCl 0,15 M para o pico retido. Fluxo: 30 mL/h; fração: 2,1 mL/tubo. B - Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS da fração retida da cromatografia de extrato total de sementes de *A. integrifolia* (jacalina).

6.9. Interação da lectina galactose ligante de *Bauhinia pentandra* em matriz de galactomanana de *Bauhinia pentandra*.

Com a finalidade de avaliar a capacidade de interação da matriz de galactomanana de *B. pentandra*, com a lectina cotiledonária da mesma semente, foi realizada uma cromatografia de afinidade após a galactomanana ser insolubilizada com epiclridrina. Foi utilizado, para tal, o extrato total obtido da farinha delipidada de cotilédones de *B. pentandra*. A coluna foi saturada com 3 mL de extrato total, resultado comprovado pela atividade hemaglutinante do pico não retido realizada com eritrócitos de coelho a 2 %. Uma alíquota de 50 μ L do pico retido com densidade óptica a 280 nm de 0,123 apresentou atividade hemaglutinante de 8

UH/mL (Figura 20 A). Este ensaio indica que o pico retido nesta cromatografia é referente à hololectina galactose ligante de cotilédone de semente *B. pentandra*. Para avaliar a pureza dessa proteína foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS na presença e ausência de β -mercaptoetanol.

Analisando o perfil eletroforético podemos observar duas bandas nos valores de 30 e 20 kDa (figura 20 B) quando a eletroforese foi realizada em condições não redutoras.



A

B

FIGURA 20A: Cromatografia de afinidade em galactomanana de *B. pentandra* e atividade hemaglutinante dos picos. Amostras: 2,5 ml de extrato total da farinha delipidada de *B. pentandra*. Eluição: NaCl 0,15 M com CaCl_2 e MnCl_2 5mM para o pico não retido e tampão glicina-HCl 0,1M pH 2,6 com NaCl 0,15 M com CaCl_2 e MnCl_2 5mM para o pico retido. Fluxo: 30 mL/h; fração: 2,5 ml/tubo. 20B: Eletroforese PAGE-SDS da fração retida em cromatografia de afinidade em galactomanana de *B. pentandra*, contra extrato total de sementes de *B. pentandra*.

6.10. Interação da lectina galactose específica de *Bauhinia pentandra* em diferentes matrizes cromatográficas.

A capacidade de retenção da lectina de *B. pentandra* (LBp) em diferentes matrizes de galactomanana foi avaliada. Um estudo comparativo foi realizado, utilizando matrizes de *Adenanthera pavonina*, *Sophora japonica* e *Caesalpinia pulcherrima* assim como a matriz comercial Sepharose 4B. A lectina foi capaz de interagir com todas as matrizes testadas. Diferenças foram notadas com referência à capacidade das matrizes em reter a lectina. O melhor rendimento foi observado para a matriz de galactomanana de *S. japonica* (3,60 mg/g) seguida da de *C. pulcherrima* (3,15 mg/g), *A. pavonina* (2,98mg/g), e Sepharose 4B (2,86 mg/g), tendo a matriz de galactomanana de *B. pentandra* apresentado valores inferiores (2,22 mg/g), porém ainda muito significativos (tabela 13).

Provavelmente esse comportamento diferente acontece devido a diferenças relacionadas com a quantidade e forma de distribuição, na molécula do polissacarídeo, das unidades de galactose disponíveis para a interação com a lectina, característica intrínseca de cada uma delas, o que pode possibilitar uma maior ou menor interação entre o açúcar e a proteína.

Ensaio de atividade hemaglutinante utilizando hemácias de coelho a 2 %, realizado a partir do pico retido mostrou valores semelhantes, indicando que todas as matrizes foram capazes de isolar a lectina.

TABELA 13 - Massa retida de lectina de *B. pentandra* (LBp) em diferentes matrizes cromatográficas.

Matriz	Razão man/ galactose	Massa de lectina retida por g de matriz (mg/g)	A _{280 nm} do pico retido de valor mais alto	UH do pico retido de valor mais alto
<i>B. pentandra</i>	2,5:1	2,22	0.191	2 ³
<i>A. pavonina</i>	1,8:1	2,98	0.172	2 ³
<i>S. japonica</i>	5,26:1	3,60	0.343	2 ⁴
<i>C. pucherrima</i>	3,6:1	3,15	0.144	2 ³
<i>Sepharose 4B</i>	-	2,86	0.171	2 ³

7. CONCLUSÕES.

O polissacarídeo endospermico da semente de *B. pentantra* é formado por 94% de uma galactomanana clássica com uma proporção de Man:Gal de 2,5:1 e viscosidade intrínseca de 10,1 dL/g. Este polissacarídeo após reticulado com epícloridrina foi capaz de interagir com lectinas galactose ligante sendo capaz de purificar estas lectinas em um único passo cromatográfico.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHENBACH, H.; STOCKER, M.; CONSTENLA, M.A. F.; Flavanoid and other constituents of *Bauhinia manca*. **Phytochemistry**. v. 27. p. 1835-1841, 1988.

ALLEN, A. K.; NEUBERGUER, A. The Purification, composition and specificity of germ agglutinin. **Biochemistry Journal**, v.131, p. 155-162, 1973.

AL-KAISEY, M. T.; WILKIE, C. B. The Polysaccharides of agricultural lupin seeds. **Carbohydrate Research**. v. 227, p. 147-161, 1992.

ALMEIDA, E. R.; GUEDES, M. C.; ALBUQUERQUE; XAVIER, H. Hypoglycemic effect of *Bauhinia cheilandra* in rats. **Fitoterapia**. v. 77, p. 276-278, 2006.

ALMEIDA-SILVA, L. M. **Galactomanana de *Caesalpinia pulcherrima*: Biossíntese, estrutura e aplicação em matrizes cromatográficas**, Fortaleza, Universidade Federal do Ceará, Tese de Doutorado, Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 153pp., 2005.

AKHTAR, A. H.; AHMAD, K. U. Anti-ulcerogenic evaluation of the methanolic extracts of some indigenous medicinal plants of pakistan in aspirin-ulcerad rats. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 46, p. 1-6, 1995.

APPUKUTAN, P.S.; SUROLIA, A.; BACHHAWAT, B.K. Isolation of two galactose binding protein from *Ricinus communis* by affinity chromatography. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, v. 14, p. 382-384, 1977.

Association of official analytical chemists, 1995. **Official Methods of analysis of AOAC**. 16 th ed. USA. Washington.

ATHAMNA, A.; COHEN, D.; ATHAMNA, M.; OFEK, I.; STAVRI, H. Rapid identification of *Mycobacterium* species by lectin agglutination. **Journal of Microbiological Methods**. v. 20, p. 1-7, 2005

BAETHGEN, N.W.E.; ALLEY, M. M. A Manual colorimetric procedure for measuring ammonium nitrogen in soil and kjeldahl digest. **Communications in Soil Sciences and Plant Analysis**. v. 20, p. 961-969, 1989.

BALZARINI, J. ; HATSE, S.; VERMEIRE, K.; PRINCEN, K.; AQUARO, S.; PERNO, C-F.; CLERCQ, E.; EGBERINK, H.; MOOTER, G. V.; PEUMANS, W.; DAMME, E. V.; SCHOLS, D. Mannose-specific plant lectins from the *Amaryllidaceae* family qualify as efficient microbicides for prevention of human immunodeficiency virus infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 48, n.10, p. 3858-3870, 2004.

BALZARINI, J.; LAETHEM, K. V.; HATSE, S.; FROEYEN, M.; PEUMANS, W.; VAN DAMME, E.; SCHOLS, D. Carbohydrate-binding agents cause deletions of highly conserved glycosylation sites in HIV GP120. **Journal of Biological Chemistry**. v. 280, n.49, p. 41005-41014, 2005.

BARONDES, S. H. Bifunctional properties of lectins; lectins redefined. **TIBS**. v.13, n.12, p. 480-482, 1988.

BARRAL-NETO, 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. **Immunological Investigations**, v. 21, n. 4, p.297-303, 1992.

BASU, P. S.; MAJHI, R.; BATABYAL, S. K. Lectin and serum-PSA interaction as a screening test for prostate cancer. **Clinical Biochemistry**. v. 36, p. 373-376, 2003.

BENEVIDES, N. M. B.; HOLANDA, M. L.; MELO, F. R.; PEREIRA, M. G.; MONTEIRO, A. C. O.; FREITAS, A. L. P. Purification and partial characterization of the lectin from marine green alga *Caulerpa cupressoides* (Vahl) C. Agardh. **Botanica Marina**. v. 44, p. 17-22, 2001.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds. Physiology of Development and Germination**. Plenum Press. New York and London 2^a edição, 421p.,1994.

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

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

BLUN, H.; BEIR, H.; GROSS, J. K. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA. **In Gels Eletrophoresis**, 8:93-99, 1987.

BOESEWINKEL, F. D.; BOUMAN, F. **The seed: structure and function.** In: Kigel J., Galili G., eds. Seed development and germination. New York: Marcel Dekker, 1-24, 1995.

BOI, C.; CATTOLI, F.; FACCHINI, R.; SORCI, M.; SARTI, G. C. **Journal of Membrane Science.** v. 273, p. 12-19, 2006.

BOURQUELOT, E.; HÉRISSEY, H. **Compt. Rend.** v. 129, n. 228 p. 391-395, 1899. Citado por Dea; Morrison, 1975.

BOYD, W.C.; REGUERA, R. M.; Hemagglutinating substances for human cells in various plants. **Journal of Immunology.** v. 62, p. 333-339, 1949.

BOYD, W. C.; ALMODOVAR, L.R.; BOYD, L. G. Agglutinins in marine algae for human erythrocytes. **Transfusion.** v. 6, p. 82-83, 1966.

BRAGA, R.C. **Goma endospérmica de *Caesalpinia pulcherrima*. Utilização como matriz de afinidade no isolamento de lectinas galactose-ligantes.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, 2001.

BRUMMER, Y.; CUI, W.; WANG, Q. Extraction, purification and physicochemical characterization of *Fenugreek gum*. **Food Hydrocolloids,** v.17, p. 229-236, 2003.

BUCKERIDGE, M. S.; Lima, D U ; Santos HP ; TINÉ, M. A. S. Polissacarídeos de reserva de parede celular em sementes, estrutura, metabolismo, funções e aspectos ecológicos. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal.** v. 12, p. 137-162, 2000.

BUCKERIDGE, M. S.; PANEGASSI, V. R.; ROCHA, D. C.; DIETRICH, S. M. C. Seed galactomannan as marker in the taxonomy and evolution of the leguminosae. **Phytochemistry.** v. 38, n. 4, p. 871-875, 1995.

BUCKERIDGE, M. S.; REID, J. S. G. Major cell wall storage polysaccharides in legume seeds: structure, catabolism and biological functions. **Ciência e Cultura.** v. 48, n. 3, p. 153-162, 1996.

BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry and Molecular Biology of Plants,** American Society of Plant Physiologists-USA, 1367 pg, 2000.

BUCKERIDGE, M. S.; SANTOS, H. B.; TINÉ, M. A. Mobilisation of storage cell wall polysaccharides in seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 38, p. 141-156, 2000.

CAMPBELL, P; BRAAM, J. Xyloglucan endotransglycosylases: diversity of genes, enzymes and potential wall-modifying functions. **Trends In Plant Science Review**. v. 4, n. 9, p.361-366, 1999.

CARLINI, C. R.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. **Toxicon**. v. 40, p. 1515-1539, 2002.

CARPITA, N. C.; GIBEAUT, D. M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: Consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **Plant Journal**. v. 3, p. 1-30, 1993.

CARVALHO, D. D.; SCHMITMEIER, S.; NOVELLO, J. C.; MARKLAND, F. S. Effect of BJcuL (a lectin from the venom of snake *Bothros jararacussu*) on adhesion and growth of tumor and endothelial cells. **Toxicon**, **39**: 1471-1476, 2001.

CAVADA, B.S.; GRANGEIRO, T.B., RAMOS, M.V., CRISÓSTOMO, C.V., SILVA, L.M.A., MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, J.T.A. Lectin from *Dioclea guianensis* Var. *Lasiophylla* Duke seeds mobilization during germination and seedling growth in the dark. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, 6:21-25, 1994.

CHRISPEELS, M. J.; BOLLINI, R. Characteristics of membrane-bound lectin in developing *Phaseolus vulgaris* cotyledons. **Plant Physiology**. v. 70, p. 1425-1428, 1982.

CHURMS, S. C.; STEPHEN, A. M.; STEYN, C. B. Analytical comparison of gums from *Acacia hebeclada* And other gummiferae species. **Phytochemistry**. v. 25, p. 2807, 1986.

COELHO, L.C.B.B.; da SILVA, M. B. R. Simple method to purify miligram quantities of the galactose-specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*. **Phytochemical Analysis**. v.11, n. 5, p. 295-300, 2000.

CORDEIRO-CARLOS, E. R. **Caracterização Físico-química e Biológica da Lectina galactose-ligante de sementes de *Bauhinia pentandra***. Tese de Doutorado em Bioquímica, 102 pp. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, 2004.

CORREA, M. M.; SAMPAIO, S. V.; LOPES, R. A.; MANCUSO, L. C.; CUNHA, O. A. B.; FRANCO, J. J.; GIGLIO, J. R. Biochemical and histopathological alterations induced in rats by *Tityus serrulatus* scorpion venom and its major neurotoxin tityustoxin-I. **Toxicon** v. 35, p. 1053-1067, 1997.

COSGROVE, D. J. Expansive growth of plant cell walls. **Plant Physiology Biochemistry**. v. 38, p. 109, 2000.

COURTOIS, J. E.; ANAGNOSTOPOULOS, C.; PETEK, F. **Bulletin Society Chemistry Biology**, 40:1277-1285, 1958.

DAMIAN, L.; FOURNIER, D.; WINTERHALTER, M.; PAQUEREAU, L. Determination of thermodynamics parameters of *Xerocomus chrysenteron* lectin interaction with n-acetylgalactosamine and thomsen-friedenreich antigen by isothermal titration calorimetry. **BMC Biochemistry**. v. 6, n. 11, 2005.

DAOUD, K. M. **Biochemical Journal**. v. 26, p. 255-263, 1932. Citado por DEA; MORRISON, 1975.

DAVIDSON, R. L. **Handbook of water-soluble gums and resins**, New York: McGraw Hill Book Co, 1980.

DEA, I. C. M.; MORRISON, A. Chemistry and interaction of seed galactomannan. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.** v. 31, p. 241, 1975. Citado por AZERO; ANDRADE, 2002

DONGEN, Van J. T.; AMMERLAAN, A. M. H.; AELST, Van M. W.A.C. C.; BORSTLAP, A. C. Structure of the developing pea seed coat and the post-phloem transport pathway of nutrients. **Annals of Botany**. v. 91, p. 729-737, 2003.

DODD, R. B.; DRICKAMER, K. Lectin-like proteins in model organisms: Implications for evolution of carbohydrate-binding activity. **Glycobiology**. v. 11, p. 71-79, 2001.

DUGAN, A.S.; GASPAROVIC, M.L.; ATWOOD, W.J. Direct correlation between sialic acid binding and infection of cells by two human polyomaviruses (JC virus and BK virus). **Journal of Virology**. v. 82, n. 5, p. 2560-2564, 2008.

DUVERGER, E.; FRISON, N.; ROCHE, A-C.; MONSIGNY, M. Carbohydrate-lectin interactions assessed by surface plasmon resonance. **Biochimie**. v. 85, p. 167-179, 2003.

DOYLE, J. J. DNA data and legume phylogeny: A progress report. In: **CRISP, M.; DOYLE, J. J. Advanced in Legume Systematics part 7. Phylogeny.** Richmond: Royal Botanic Gardens, Kew, v. 7 p.11-30, 1995. Citado por ZAIA 2004.

DOYLE, J. J.; CHAPPIL, J. A.; BAILEY, C. D.; KAJITA, T. Towards a comprehensive phylogeny of legumes: Evidence from *rbcL* sequences and non molecular data. In **HERENDEEN, P. S.; BRUNEAU, A. ed. Advances in legume systematic part 9.** Royal Botanic Gardens, Kew, v. 9, p. 1-20, 2000. Citado por ZAIA, 2004.

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

EDWARDS, M.; DEA, I. C. M.; BULPIN, P. V.; REID, J. S. G. Xyloglucan (amyloid) mobilisation in the cotyledons of *Tropaeolum Majus* L. seeds following germination. **Planta** v. 163, p.133-140, 1985.

EFFRONT, J. **Compt. Rend.** v. 125, p. 38-40, 1897. Citado por Dea; Morrison, 1975.

EGOROV, A. V.; MESTECHKINA, N. M.; SHCHERBUKHIN, V. D. Composition and structure of galactomannan from the seed of *Gleditsia ferox* Desf. **Applied Biochemistry and Microbiology.** v. 40, n. 3, p. 314-318, 2003.

EMONS, A. M. C.; MULDER, B. M. The making of the architecture of the plant cell wall: How cells exploit geometry. **Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America.** v. 95, n. 12, p. 7215-7219, 1998.

FALCÃO, H.S.; LIMA, I.O.; SANTOS, V.L.; DANTAS, H.F.; DINIZ, M.F.F.M.; BARBOSA-FILHO, J.M.; BATISTA, L.M. Review of the plants with anti-inflammatory activity studied in Brazil. **Rev Bras Farmacogn.** v. 15, p. 381-391, 2005.

FERREIRA, M. V. P. **Frutalina, lectina α -D galactose ligante de *Artocarpus incisa* L. um estudo com câncer de mama.** Fortaleza, Universidade Federal do Ceará, Tese de doutorado, Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, 98pp, 2001.

FLODIN, P. **Dextran gels and their applications in gel filtration.** Dissertation, 85 p., AB Pharmacia, Uppsala, Sweden, 1962.

FRY, S. C. Primary cell wall metabolism: tracking the careers of wall polymers in living plant cells. **New Phytologist**. v. 161, p. 641-675, 2003.

FRY, S. C. Analysis of crosslinks in the growing cell-walls of higher plants. In **Modern Methods of Plant Analysis**., New Series. Linskens, H. F.; Jackson, J. F. (Eds.). Berlin:Springer, v. 10, p. 12-36, 1989.

FUENTES O.; ALARCÓN J. *Bauhinia candicans* stimulation of glucose uptake in isolated gastric glands of normal and diabetic rabbits. **Fitoterapia** 77: 271-275, 2006.

FUENTES, O.; ARANCIBIA- AVILA, P.; ALARCÓ, J. Hypoglycemic activity of *Bauhinia candicans* in diabetic induced rabbits. **Fitoterapia**. v. 75, p. 527-532, 2004.

FUJITA, Y., OISHI, K.; SUZUKI, K.; IMA, H.K. Purification and properties of an anti-B hemagglutinating produced by *Streptomyces* sd. **Biochemistry**. v. 14, p. 4465-70, 1975.

GABIUS, H. -J. The sugar code in drug delivery, **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 56, p. 421-424, 2004.

GANTER, J. L. M. S.; HEYRAUD, A.; PETKOWICZ, C. L. O.; RINAUDO, M.; REICHER, F. Galactomannans from Brazilian seeds: Characterization of the oligosaccharides produced by mild acid hydrolysis. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 17, n.1, p. 13-19, 1995.

GYNTHER, J.; HUBTIKANGAS, A. Review: guar gum, chemistry and applications. **Acta Pharmaceutica Fennica**. v. 93, p.175-184, 1984.

GABIUS, H. J.; ANDRÉ, S.; KALTNE, H.; SIEBERT, H. C. The sugar code: Functional lectinomics, **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1572, p. 165-177, 2002.

GARROS-ROSA, I.; Reicher, F.; O. Petkowicz, C. L. O.; Sierakowski, M. R.; Moreira, R. A. Characterization of the galactomannans from *Parkinsonia aculeata* seeds and their application on affinity chromatography. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**. v.16, n. 2, p. 99-103, 2006

GUPTA, M.; MAZUMDER, U. K.; KUMAR, R. S.; GOMATHI, P.; RAJESHWAR, Y.; KAKOTI, B. B.; SELVEN, V. T. Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic effects of methanol extract from *Bauhinia racemosa* stem bark in animal models. **Journal of**

Ethnopharmacology. v.98, p. 267-273, 2005.

HAJTO, T.; HOSTANSKA, K.; BERKI, T.; PALINKAS, L.; BOLDIZSAR, F.; NEMETH, P. Oncopharmacological Perspectives on a Plant Lectin (*Viscum album* Agglutinin-I): Overview of Recent Results from *In vitro* Experiments and *In vivo* Animal Models, and Their Possible Relevance for Clinical Applications. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine.** v. 2, n. 1, p. 59-67, 2005.

HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry.** v. 48, p. 422-427, 1972.

HEGNAUER, H.; GRAYER-BARMEIJER, R. J. Relevance of seed polysaccharides and flavonoids for the classification of the leguminosae; a chemotaxonomic approach. **Phytochemistry.** v. 34, p. 3-16, 1993.

HEINRICHER, E. Zur Biologie der gattung Impatiens. **Flora Jena,** 71, 1888.

HIRSCH, A. M. Role of lectins (and rhizobial exopolysaccharides) in legume nodulation. **Current Opinion in Plant Biology.** v. 2, p. 320-326, 1999.

HILLER, A.; PLAZIN, J.; VAN-SLYKE, B. A Study of conditions for kjeldahl determination of nitrogen in proteins. description of methods with mercury as catalyst and titrimetric and gravimetric measurement of the ammonia formed. **Journal of Biological Chemistry.** v. 176, n. 3, p. 1401-1420, 1948. Citado por ALMEIDA-SILVA, 2005.

HOPF, H.; KANDLER, O. Characterization of the "reserve cellulose" of the endosperm of *Carum carvi* as a $\beta(1-4)$ -Mannan. **Phytochemistry.** v. 16, p. 1715-1717, 1977.

HOREJSI, V.; TICHÁ, M.; KOCOUREK, J. Studies of lectins xxxii. application of affinity electrophoresis to the study of the interaction of lectins and their derivatives with sugars. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects.** v. 499, n. 2, p. 301-308; 1977.

HIRST, E. L.; PERCIVAL, E. Methylation of polysaccharides and fractionation of the methylated products. **Methods Carbohydr. Chem.,** v.5, p.287-298, 1965.

IMBERTY A.; WIMMEROVÁ, M.; MITCHELL, E. P.; GILBOA-GARBER, N. Structures

of the lectins from *Pseudomonas aeruginosa*: Insights into the molecular basis for host glycan recognition. **Microbes and Infections**. v. 6, p. 221-228, 2004.

ISHII, T. Structure and functions of feruloylated polysaccharides. **Plant Science**. v. 127, n. 2, p. 111-127, 1997

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F. **Plant Systematics a Phylogenetic Approach**. Sinauer Associates Sunderland, USA: p. 283-288, 1999. Citado por ZAIA, 2004.

JULIANI, C. Hypoglycemic action of bauhintrato (*Bauhinia forficata* preparation) new experimental study. **Clin**. v. 22, p. 17, 1941.

KARASAKI, Y.; TSUKAMOTO, S.; MISUZAKI, K.; SUGIURA, T.; GOTOH, S. A garlic lectin exerted an antitumor activity and induced apoptosis in human tumor cells. **Food Research International**. v. 34, p. 7-13, 2001.

KALLIKORM A, BOG-HANSEN T. C. **Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry** v. 8, p.101-104. Textop, Hellerup (Denmark), 1993, citado por Ramos, 1998.

KELLENS, J. T. C.; PEUMANS, W. J. Biochemical and serological comparison of lectins from different anastomosis groups of *Rizoctonia solani*. **Mycology Research**. v. 95, n. 10 p. 1235-1241, 1991.

KENNEDY, J. F.; WHITE, C. A. **Carbohydrate Chemistry**, Clarend Press Oxford. New York, 1988.

KOHNKE-GODT, B.; GABIUS, H.J. Heparin-binding lectin from human placenta: further characterization of ligand binding and structural properties and its relationship to histones and heparin-binding growth factors. **Biochemistry (American Chemical Society)** v. 30, p. 55-65, 1991.

KOOIMAN, P. Structures of the galactomannans from seeds of *Annona muricata*, *Arenga saccharifera*, *Cocos nucifera*, *Convolvulus tricolor*, and *Sophora japonica*. **Carbohydrate Research**. v. 20, p. 329-337, 1971.

LABSKY, J.; DVORANKOVA, B.; SMETANA, K.; HOLIKOVA, Z.; BROZ, L.; GABIUS, H. J. Mannosides as crucial part of bioactive supports for cultivation of human epidermal keratinocytes without feeder cells. **Biomaterials**. v. 24, p. 863-872, 2003.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4, **Nature**. v. 227, p. 680-685, 1970.

LAM, T. B. T.; IYAMA, K.; STONE, B. A. An approach to the estimation of ferulic acid bridges in unfractionated cell-walls of wheat internodes. **Phytochemistry**. v. 37, n. 2, p. 327-333, 1994.

LIMA, A. M. P. **Isolamento e caracterização da lectina de sementes de *Bauhinia unguolata***. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, 2005.

LIMA, R. da S. N. **Utilização da goma exsudada de cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) como biossensor para proteínas vegetais**. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-Ceará, 2002.

LINO, C. de S.; DIOGENES, J. P. L.; PEREIRA, B. A.; FARIA, R. A. P. G.; NETO, M. A.; ALVES, R. S.; QUEIROZ, M. G. R.; SOUSA, F. C. F.; VIANA, G. S. B. Antidiabetic activity of *Bauhinia forficata* extracts in alloxan-diabetic rats. **Biol. Pharm. Bull.** v. 27, n. 1, p. 125-127, 2003.

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

MACEDO M.; FERREIRA A. R. Plantas hipoglicemiantes utilizadas por comunidades tradicionais na Bacia do Alto Paraguai e Vale do Guaporé, Mato Grosso-Brasil. **Rev Bras Farmacogn** 14(Supl. 1): 45-47, 2004.

MANTELL, C. L. **The water soluble gums**. Reinhold publishing corporation, 1947. Citado por PAULA, 1990.

MAKELA, O. Studies in haemagglutinins of leguminosae seeds. **Ann. Med. Exp. Biol. Fenn.** v. 35, p. 1-156, 1957.

MARINKOVICH, V. A. Purification and characterization of the hemagglutinin present in potatoes. **Journal of Immunology**. v. 93, p. 732-741, 1964.

MATOS, V. C. **Gomas endospermicas de *Delonix regia* e *Schizolobium parahybae***. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, 2000.

MENEZES, F. S.; MINTO, A. B. M.; RUELA, H. S.; KUSTER, R. M.; FRANKISH, H. Hypoglycemic activity of two brazilian *Bauhinia* species: *Bauhinia forficata* L. and *Bauhinia monandra* Kurz. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 17, n. 1, p. 08-13, 2007.

MILHOME, M. V. L. **Frutalina, lectina α -D-galactose ligante de *Artocarpus incisa* L., no estudo do câncer de tireóide humana: análise comparativa com a galectina-3**. Fortaleza, 2003. 69f. Dissertação (mestrado) em Bioquímica – Universidade Federal do Ceará, Departamento de Bioquímica, Fortaleza, 2003.

MISHKIND, M.; RAIKHEL, N. V.; PALEVITZ, B. A.; KEEGSTRA, K. Distribution of wheat germ agglutinin in young plants. **Plant Physiology**. v. 66, p. 950-955, 1980.

MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O. **Caracterização estrutural de três lectinas apresentando especificidades por açúcar distintas, isoladas de sementes de fruta pão (*Artocarpus incisa* L.)**. Fortaleza, Universidade Federal do Ceará, Tese de Doutorado, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 113 pp., 2002.

MORAIS, S. M.; DANTAS, J. D. P.; SILVA, A. R. A.; MAGALHÃES, E. F. Plantas medicinais usadas pelos índios Tapebas do Ceará. **Rev. Brás. Farmacogn.** 15: 169-177, 2005.

MOREIRA, R. A. **Lectinas vegetais: uma abordagem química e físico-química**. Tese de Titular. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 600 pp., 1998.

MOREIRA, R. A.; AINOZ, I. L. Lectins from seeds of jack fruit (*Artocarpus integrifolia* L.): Isolation and purification of two isolectins from the albumin fraction. **Biologia Platarum**. v. 23 n. 3, p. 186-192, 1981.

MOREIRA, R. A.; CASTELO-BRANCO, C. C.; MONTEIRO, A. C. O.; TAVARES, R. O.; BELTRAMINI, L. M. Isolation and partial characterization of a lectin from *Artocarpus incisa* L. seeds. **Phytochemistry**. v. 47, n. 7, p. 1183-1188, 1998.

MOREIRA, R. A.; CAVADA, B. S.; OLIVEIRA, J. T. A.; AINOZ, I. L. **Plant Lectins**. In: Oliveira, B., Sgarbieri, V. (eds.). Proceedings of the first Brazilian congress on proteins, p. 71-96, São Paulo, 1991.

MOREIRA, R. A.; PERRONE, J. C. Purification and partial characterization of a lectin from the seeds of *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiology**. v. 59, p.783-787, 1977.

MOREIRA, R. A.; OLIVEIRA, J. T. A. Lectins from the genus *Artocarpus*. **Biologia Platarum**. v. 25, n. 5, 343-348, 1993.

MULIMANI, V. H.; PRASHANTH, S. J. Investigating plant galactomannans. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, 30(2):101-103, 2002.

MUSILEK, M.; TICHA, M.; VOLC, I.; KOCOUREK, J. Lectins in mycelial cultures of *kuehneromices mutabilis*, *Philiota squarrosa* and *Flammulina velutipes*. In: BOGHANSEN, T.C.; VAN-DRIESSCHE, E. eds. **Lectins – Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry**. v. 7.1990.

NANGIA-MAKKER, P.; CONKLIN, J.; HOGAN, V.; RAZ, A. Carbohydrate-binding proteins in cancer, and their ligands as therapeutic agents. **TRENDS in Molecular Medicine**, 8: 187-192, 2002.

NISHITANI, K.; NEVINS, D. J. Glucuronoxylan xylanohydrolase - a unique xylanase with the requirement for appendant glucuronosyl units. **Journal of Biological Chemistry**. v. 266 n. 10, p. 6539-6543, 1991

NOWELL, P. Phytohemagglutinin: an iniciator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. **Cancer Research**. v. 20, p. 462-466, 1960.

OLIVEIRA, J. T. A.; MORAES, S. D. M.; CAVADA, B. S.; MOREIRA, R. A.; VASCONCELOS, I. M. Protein and lectin immobilization during *erythrina velutina* forma *aurantiaca* seed germination and seedling growth in the dark. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, 10:25-30, 1998.

OLIVEIRA, C. Z.; MAIORANO, V. A.; MARCUSSI, S.; SANT'ANA, C. D.; JANUARIO, A. H.; LOURENÇOM, V.; SAMPAIO, S. V.; FRANÇA, S. C.; PEREIRA, P. S.; SOARES, A. M. Anticoagulant and antifibrinolytic properties of the aqueous extract from *Bauhinia forficata* against snake venoms. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 98, p. 213-216, 2005.

OLSEN, O. A. Endosperm Developments. **Plant Cell**. v. 10, p. 485-88, 1998.

PAULA, R. C. M. **Characterisation of Brazilian Tree Exsudate Gums from *Anacardium occidentale* L. and *Anadenanthera macrocarpa* B.** Tese de Doutorado apresentada ao Depto. de Química da Universidade de Manchester, 169 pp., Oxford Road, 1995.

PANDA, S.; KAR, S. *Withania somnifera* and *Bauhinia purpurea* in the Regulation of Circulation Thyroid Hormone Concentrations in Female Mice. **Journal of Ethnopharmacology** v. 67, p. 223-239, 1999.

PANEGASSI, V. R.; SERRA, G. E.; BUCKERIDG, M. S. Potencial tecnológico do galactomanano de semente de faveiro (*Dimorphandra mollis*) para uso na indústria de alimentos. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 20, n. 3, 2000.

PEACOCK, J. S.; COLSKY, A. S.; PINTO, V. B. Lectins and antibodies as tools for studying cellular interactions. **Journal of Immunology**, v 126, p.147-157, 1990.

PEÑA, M. J.; RYDEN, P.; MADSON, M.; SMITHM, A. C.; CARPITA, N. C. The galactose residues of xyloglucan are essential maintain mechanical strength of the primary cell walls in arabidopsis during. **Plant Physiology**. v. 134, p. 443–451, 2004.

PEPATO, M. T. et al. Anti-diabetic activity of *Bauhinia forficata* decoction in streptozotocin-diabetic rats. **J. Ethnopharmacol.** v. 81, n. 2, p. 191-197, 2002.

PEREIRA, R. C.; OLIVEIRA, M. T. R.; LEMOS, G. C. S. Plantas utilizadas como medicinais no município de Campos de Goytacazes - RJ. **Rev. Bras. Farmacogn.** 14 (Supl. 1) p. 37-40, 2004.

PERRIM, R. M.; DEROCHER, A. E.; BAR-PELED, M.; ZENG, W.; NORAMBUENA, L.; ORELLANA, A.; RAIKHEL, N.; KEEGSTRA, K. Xyloglucan fucosyltransferase, an enzyme involved in plant cell wall biosynthesis. **Science**. v. 284, 1999.

PETKOWICZ, C. L. O.; REICHER, F.; CHANZY, H.; TARAVEL, F. R.; VUONG, R. Linear mannan in the endosperm of *Schizolobium amazonicum*. **Carbohydrate Polymers**, v. 44, p.107-112, 2001.

PETKOWICZ, C. L. O.; SCHAEFER, S.; REICHER, F. The mannan from *Schizolobium parahybae* endosperm is not a reserve polysaccharide. **Carbohydrate Polymers**. v. 69, n. 4 p. 659-664, 2007.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M., Plant lectins: specific tools for the identification, isolation, and characterization of o-linked glycans. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**. v. 33, p. 209-258, 1998.

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

PEUMANS, J. W.; KUMAR, A. M. Characterization of the lectins from bulbs of *Erythrina hyemalis* (winter aconite) as an inhibitor of protein synthesis. **Journal of Biological Chemistry**. v.268, p. 25176-25183, 1993.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME E. J. M. The role of lectins in the defense of plants. **Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry**. v. 8, p. 82-91, 1993.

PEUMANS, J. W.; VAN DAMME, E. J. M. The role lectin in the palnt defense against insects. **Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry**. v. 10, p. 128-141 1994.

PEUMANS, W. J.; KELLENS, J. T. C.; ALLEN, A. K.; VAN DAMME, E, J. M. isolation and characterization of a seed lectin from elderberry (*sambucus nigra l.*) and its relationship to the bark lectins. **Carbohydrate Research**, 213, p. 7-17, 1991.

PHARMACIA BIOTHEC. **Gel filtration, theory and practic pharmacia - LKB biotechnology, uppsala, sweden**, 1993.

PILLING, E.; HOFTE, H. Feedback from the wall. **Current Opinion in Plant Biology**. v. 6, p. 611–616, 2003.

PLÁ, A.; ALONSO, E.; BATISTA-VIEIRA, F.; FRAGUAS, L. Screening for carbohydrate-binding proteins in extracts of Uruguayan plants. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 36, p. 851-860, 2003.

PRAKASH, D.; NIRANJAN A.; TEWARI S. K.; PUSHPANGADAN P. Underutilised legumes: potential sources for low-cost protein. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**. v. 52, n. 4, p. 337-341, 2001.

POLHILL, R. M.; RAVEN, P. H. Advances in legumes systematic. **Richmond: Royal Botanic Gardens, Kew, 1**, 1981. Citado por ZAIA, 2004.

PUSZTAI, A. **Plant Lectins**. Chemistry and pharmacology of natural products series. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 263, 1991.

PUSZTAI, A.; BARDOCZ, S. **Lectins Biomedical perspective**. Taylor; Francis, Aberdeen, Scotland, p. 331, 1995.

PUSZTAI, A. **Plant lectins**, Cambridge University Press, London, 1991.

RAE, A. L.; BONFANTE-FASOLO, P.; BREWIN, N. J. Structure and growth infection threads in the legume symbiosis with *Rhizobium leguminosarum*. **Plant J.** v. 2, p. 385-395, 1992.

REID, J. S. G.; EDWARDS M., Galactomannans and other cell wall storage polysaccharides in seeds, in: Stephen M.A. (Ed.), **Food Polysaccharides and their Applications**, 155–186, 1995.

REID, J. S. G.; BEWLEY, J. D. A dual role for the endosperm and its galactomannan reserves in the germinative physiology of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) an endospermic legume seed. **Planta.** v. 147, p.145-150, 1979.

REID, J. S. G. Cell-wall storage carbohydrates in seeds - biochemistry of the seed gums and hemicelluloses. **Advances in Botanical Research.** v. 11, p. 125-155, 1985.

REISS, R. **Über die Natur der Reservecellulose und über ihre Auflösungsweise bei der Keimung der Samen**, Landwirtsch Jahrb. 18 (1889) 711–765 citado por BUCKERIDGE, 2000.

REITER, W. Biosynthesis and properties of the plant cell wall. **Current Opinion in Plant Biology.** v. 5, p. 536–542, 2002.

ROSE, J. K. C.; BRAAM, J.; FRY, S. C.; NISHITANI, K. The XTH family of enzymes involved in xyloglucan endotransglucosylation and endohydrolysis: current perspectives and a new unifying nomenclature. **Plant Cell Physiology.** v. 43, p. 1421-1435, 2002.

RUDIGER, H.; SCHERCHER The protein body membrane of soybean seeds as a possible lectin-binding component. In: Van Driessche, E.; Franz, H.; Beeckmans, S.; Pfüller, U.; Kallikorm, A.; Bog-Hansen, T. C. (eds) *Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry* v. 8, pp.101-104. Textop, Hellerup (Denmark), 1993, citado por Ramos, 1998.

SAGE, H. J.; GREEN, R.W. Common lentil (*Lens culinaris*) phytohemagglutinin. **Meth. Enzimol.** v. 28, p. 332-339; 1972.

SCHULZE, E.; STEIGER, E. Zur Kenntnis des Paragalaktans, landwirtsch. **Vers. Stn.** 41:220-223, 1892. Citado por Buckeridge *et al.*, 2000.

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

SHARON, N.; LIS, H. **Lectins**, Chapman and Hall, London, 1989.

SHARON, N.; LIS, H. Lectins as cell recognition molecules. **Science**. v. 246, p. 227-234, 1989. Citado por RAVAL et al, 2004.

SHARON, N. Lectin-carbohydrate complexes of plants and animals: an atomic view. **Trends in Biochemistry Science**. v. 18, p.221–226, 1993.

Sharon, N. Lectin-carbohydrate complexes of plants and animals: an atomic view. **Trends Biochem. Sci**. v. 18, p. 221–226, 1993.

SHARON, N.; LIS, H. Lectins, **Encyclopedia of Life Sciences**, Nature Publishing Group, 2001.

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

SHOWALTER, A. M. Structure and function of plant cell wall proteins. **The Plant Cell**. v. 5, p. 9-23, 1993.

SIDDIQUI, S., HASAN, S.; SALAHUDIN, A. Isolation and characterization of *Cajanus cajan* lectin. **Arch.Biochem.Biophys**. v.319, p. 426-431, 1995.

SILVA, M. I. G.; GONDIM, A. P. S.; NUNES, I. F. S.; SOUSA, F. C. F. Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). **Rev. Bras. Farmacogn**. v. 16, p. 455-462, 2006.

SILVA, K. L.; CECHINEL-FILHO, V. Plantas do gênero *Bauhinia*: Composição química e potencial farmacológico. **Quim. Nova** . v. 25, p. 121-125, 2002.

SILVA, A. L. C., HORTA, A. C. G.; MOREIRA, R. A. Isolation and partial characterization of a lectin from *Bauhinia pentandra* (Bong) Vog. Ex. Steua. **R. Bras. Fisiol. Veg**. v.13, n. 3, p. 262-269, 2001.

SILVA-LUCCA, R. Q.; TABAK, M.; NASCIMENTO, O. R.; ROQUE BARREIRA, M.

C.; BELTRAMINI, L. M. Structural and thermodynamic studies of KM⁺, A D-mannose binding lectin from *Artocarpus integrifolia* seeds. **Biophysical Chemistry**. v. 79, p. 81-93, 1999.

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

SINGH, R. S.; TINARY, A. K.; KENNEDY, J. F. Lectins: Source, Activities and a Applications. **Critical Reviews in Biotechnology**. v. 19, n. 2, p. 145-178, 1999.

SMART, J. D. Lectin-mediated drug delivery in the oral cavity, **Advanced Drug Delivery**. v. 56, p. 481-489, 2004.

SMIRNOVA, N. I.; MESTECHKINA, N. M.; SHERBUKHIN, V. D. Fractional isolation and study of the structure of galactomannan from Sophora (*Styphnolobium japonicum*) seeds. **Applied Biochemistry and Microbiology**. v. 40, n. 5, p. 517-521, 2003.

SOUZA, M. A.; AMANCIO-PEREIRA, F.; CARDOSO, C. R. B.; SILVA, A. G.; SILVA, E. G.; ANDRADE, L. R.; PENA, J. D. O.; LANZA, H.; AFONSO-CARDOSO, S. R. Isolation and partial characterization of a D-galactose-binding lectin from the latex of *Synadenium carinatum*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 49, n. 5, p. 705-716, 2005.

SOUZA, F. H. D.; MARCOS-FILHO, J. The seed coat as a modulator of seed-environment relationships in Fabaceae. **Revista Brasileira de Botânica**. v. 4, p.365-375, 2001.

SRIVASTAVA, M.; KAPOOR, V. P. Seed galactomannans: an overview. **Chemistry & Biodiversity**, v. 2, p. 295-317, 2005.

SUMI, S.; ARAI, K.; YOSHIDA, K. Separation methods applicale to prostate cancer diagnosis and monitoring therapy, **Journal of Chromatography B**. v. 764, p. 445-455, 2001.

SUZUKI, I.; SAITO, H.; INOUE, S.; MIGITA, S.; TAKAHASHI, T. Purification and characterization of two lectins from *Aloe arborescens* mill. **J. Biochem**. v. 85, p.163-171, 1979.

TAVARES, R. (1998) **Galactomanana de *Adenantha pavonina* L. Aplicação para o isolamento de lectinas galactose-específica**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE

TEIXEIRA, D. M. A. **Aplicação de gomas esxudadas de *Spondias purpurea* no isolamento de lectinas galactose-ligantes**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, 2001.

TEIXEIRA, D. M. A. **Isolamento e caracterização de um par Lectina-Receptor Endógeno de semente de *Mucuna sloanei* (Fawcett & Rendle)**. Fortaleza, Universidade Federal do Ceará, Tese de Doutorado, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 118pp, 2005.

TIMOSHENKO, A. V.; KAYSER, K.; KALTNER, H.; ANDRÉ, S.; GABIUS, H. J. Binding capacities of two immunomodulatory lectins, carrier-immobilized glycoligands and steroid hormones in lung cancer and the concentration of nitrite/nitrate in pleural effusions. **Lung Cancer**. v. 14, p. 75-84, 1996.

TOOKEY, H. L.; LOHMAR, L. R.; WOLF, I. A.; JONES, Q. J. **Agric. Food Chem.** v. 10, p. 131.

TUCKER, S. C. Floral development in legumes. **Plant Physiology**. n. 131, p. 911-926, 2003.

TURNER, R.H.; LIENER, I. E. The use of glutaraldehyde-treated erythrocytes for assaying the agglutinating activity of lectins. **Anal Biochem**. n. 68, p. 651-3, 1975.

VAN DAMME, E. J. M.; ALLEN, A. K.; PEUMANS, W. J. Developmental changes and tissue distribution of lectin in *Galanthus nivalis* L. and *Narcissus* sv. Carlton. **Planta**. v. 182, p. 605-609, 1990.

VASCONCELOS, F.; SAMPAIO, S. V.; GARÓFALO, M. A. R.; GUIMARÃES, L. F. L.; GÍGLIO, J. R.; ARANTES, E. C. Insulin-like effects of *Bauhinia forficata* aqueous upon *Tityus serrulatus* scorpion envenoming. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 95, p. 385-392, 2004.

VAZ, A. M. S. F. da.; TOZZI, A. M. G. de A. Sinopse de *Bauhinia sect. Pauletia* (Cav.) DC. (Leguminosae: Caesalpinioideae: Cercideae) no Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 28, n. 3, p. 477-491, 2005.

VIANA, E. P.; SANTA-ROSA, R. S.; ALMEIDA, S. S. M. S.; SANTOS, L.S. Constituents of the stem bark of *Bauhinia guianensi*. **Fitoterapia**. v. 70, p.111-211, 1999.

VIEIRA, I. G. P.; MENDES, F. N. P.; GALLÃO, M. I.; BRITO, E. S. NMR Study of galactomannans from the seeds of mesquite tree (*Prosopis juliflora* (Sw) DC). **Food Chemistry**. v. 101, p. 70-73, 2005.

VORWERK, S.; SOMERVILLE, S.; SOMERVILLE, C. The role plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. **Trends in Plant Science**. v. 9, n. 4, p. 203-209, 2004.

WANG, H.; NG, T.; OOI, V. E. C.; LIU, W.K. Effects of lectins with different carbohydrate-binding specificities on hepatoma, choriocarcinoma, melanoma and osteosarcoma cell lines, **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v. 32, p. 365-372, 2000.

WANG, H.; KONG, J.; LI, W.; MOLCHANOVA, V.; CHIKALOVETS, N. B.; LUK'YANOV, P.; ZHENG, Y. A β -galactose-specific lectin isolated from the marine worm *Chaetopterus Variopedatus* possesses Anti-HIV-1 activity. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**. v.142, p.111-117, 2005.

WHISTLER, R. L **Industrial Gums**, New York: Academic Press, p.306, 1973.

WHISTLER, R. L.; MILLER, J. N. Polysaccharides and their derivatives. in: **Industrial Gums**, New York: Academic press, 3^a Ed., p. 619, 1993.

WOLF, F. A.; BRETT, G. M. Ligand-binding proteins: their potential for application in systems for controlled delivery and uptake of ligands. **Pharmacological Reviews**, v. 52, n. 2, p. 207-236, 2000.

WOLFRON, M. L.; LAVER, M. L.; PATIN, D. L. Carbohydrates of the coffee bean. ii isolation and characterization of mannan. **Journal of Organic Chemistry**, v.26, p.4533-4531, 1961.

WU, A.M.; WUB, J. H.; LIUA, JIA-HUA, SINGHA, T. Recognition profile of *Bauhinia purpurea* agglutinin (BPA). **Life Sciences** v.74, p. 1763–1779, 2004.

YAMASHITA, K.; OHKURA, T.; UMETSU, K.; SUZUKI, T. Purification and characterization of a fuc α 1 \rightarrow 2gal β 1 \rightarrow and galnac β 1 \rightarrow specific lectin in root tubers of *Trichosantes japonica*. **J.Biol.Chem.** v. 267, p. 414-422, 1992.

YOKOYAMA, R.; NISHITANI, K. Genomic basis for cell-wall diversity in plants. a comparative approach to gene families in rice and *Arabidopsis*. **Plant and Cell Physiology.** v. 45 n. 9, p. 1111-1121, 2004.