

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ — UFC
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

Galactomananas de *Parkinsonia aculeata* L.:
Caracterização estrutural e aplicação no isolamento
de lectinas ligantes de galactose

IVONE GARROS ROSA

N.Cham. T 574.192 R694g

Autor: Rosa, Ivone Garros

Título: Galactomananas de *Parkinsonia* a



1233807

Ac. 43541

BCT CAT

1233807

Ac. 43541

FORTALEZA - CEARÁ

2000

Galactomananas de *Parkinsonia aculeata* L.:
Caracterização estrutural e aplicação no isolamento
de lectinas ligantes de galactose

CATIVO

UAZ

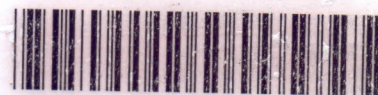
IVONE GARROS ROSA

BCT/ UFC CATIVO

FORTALEZA-CEARÁ

2000

UFC/BU/BCT 02/03/2000



R1233807 Galactomananas de *Parkinsonia*
C609250 aculeata L.
T574.192 G226g

C

574.192

G226g

C609250

R1233807



G226g

Garros Rosa, Ivone

Galactomananas de *Parkinsonia aculeata* L.:
Caracterização estrutural e aplicação no isolamento de
lectinas ligantes de galactose/Ivone Garros Rosa.
Fortaleza: UFC, 2000.

114p.:il.

1. Lectinas - Isolamento. 2. Galactomananas de
sementes vegetais. 3. Cromatografia de afinidade. I.

Título

CDD: 574.192

Galactomananas de *Parkinsonia aculeata* L.:
Caracterização estrutural e aplicação no isolamento
de lectinas ligantes de galactose

IVONE GARROS ROSA

Tese submetida à coordenação do
curso de Pós-graduação em
Bioquímica, como requisito parcial
para a obtenção do grau de Doutor
em Ciências

FORTALEZA-CEARÁ

2000

Galactomananas de *Parkinsonia aculeata* L.:
Caracterização estrutural e aplicação no isolamento
de lectinas ligantes de galactose

IVONE GARROS ROSA

ORIENTADOR: Prof. Dr. Renato de Azevedo Moreira

CO-ORIENTADOR: Profa. Dra. Fany Reicher

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FORTALEZA

FEVEREIRO - 2000

Esta Tese foi apresentada como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências, outorgado pela Universidade Federal do Ceará e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Central da referida Universidade.

A transcrição de qualquer trecho desta Tese é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas da ética científica

Ivone Garros Rosa

Tese aprovada em 24/ fevereiro /2000

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

Profa. Dra. Fany Reicher
Depto de Bioquímica
Universidade Federal do Paraná
Co-orientadora

Profa. Dra. Maria Rita Sierakowski
Depto. De Química
Universidade Federal do Paraná

Profa. Dra. Ana Cecília Goes Horta
Depto de Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Judith P. de Andrade
Feitosa
Depto. Química Orgânica e Inorgânica
Universidade Federal do Ceará

De tudo ficaram três coisas: a certeza de estar sempre começando, a certeza que é preciso continuar e a certeza de nunca desistir antes de tentar. Fazer da queda um passo de dança, do sonho uma ponte, da procura um encontro.

Fernando Sabino

*Ao meu querido velho, Veríssimo de Sousa
Garros Filho "in memoriam", o alicerce de
minha vida, meu mais profundo e eterno
agradecimento.*

*A D. Francisca, minha mãe pelo seu exemplo
de paz e compreensão.*

*Aos meus irmãos:IVALDO,IVALDO,IONE,
RONALDO,URI com muito carinho.*

*Ao meus filhos: Gustavo e Eduardo o meu
mais grato amor.*

*Ao Ivan, pelo constante
aprimoramento espiritual*

Ao meu pai,

Ao meu irmão,

tradução de

meu mais velho

Ao meu filho,

pelo apoio recebido

após a publicação

Ao meu amigo,

Ao meu amigo,

Cristina, D. S.

Ricardo, F. S.

Ao meu amigo,

Joquim B. S.

Maria da S.

especialmente

Ao meu amigo,

Incentivo

Ao meu amigo,

Ao meu amigo,

semente

*Ao meu grande mestre, João Batista Chaves Correia
"in memoriam", um eterno amigo.*

AGRADECIMENTO

No primeiro momento de todos os meus atos... A DEUS.

Ao professor Renato de Azevedo Moreira pelo seu grande amor de mestre, traduzido na orientação, apoio, ensinamento e na tônica forte de um ser incomum, meu mais profundo agradecimento.

Às professoras Fany Reicher e Maria Rita Sierakowski, inestimáveis amigas pelo apoio e grande ajuda na co-orientação deste trabalho e também à Silvia pelo apoio experimental.

À professora Judith pelo auxílio na correção deste trabalho.

Aos companheiros de jornada: André, Alda, Kilvia, Carla, Carlos Couto, Cristina, Daniele, Eduardo, Fábria, Márcio, Marcos, Maria Helena, Raquel, Renata, Ricardo, Rogildo, Sônia, Vânia, Adeildo, Isabel, Kelvia, Roberto, Roberto Lobo.

À todos os professores da Bioquímica: Albenízio, Ana Lúcia, Benildo, Dirce, Joaquim Enéas, Enéas Gomes, Fernando, Francisco Campos, Tadeu, Maria Baccache, Maria da Guia, Norma, Denize, e os demais funcionários deste Departamento especialmente os da Pós-Graduação.

À minha grande amiga Ana Cecília Goes Horta, pelo apoio e constante incentivo nas horas mais difíceis dessa jornada.

Ao professor Edilberto Rocha Silveira, pela colaboração científica.

Ao professor Afrânio Gomes Fernandes pela identificação botânica da semente em estudo.

Aos professores e funcionários do Núcleo de Imunologia Aplicada, Maria Desterro, Walbert, Jussara e Eliane, especialmente ao professor Raimundo Carlos Lemos Neto, grande amigo, pelo estímulo e apoio, minha gratidão.

A todos aqueles que participaram na minha oportunidade de crescimento, nesta tarefa, meu muito obrigado.

Este trabalho foi realizado graças às seguintes instituições:

Fundação - CAPES, pela bolsa de Doutorado concedida à autora e convênios firmados com o curso de Pós Graduação em Bioquímica do departamento de bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará e auxílio individuais aos pesquisadores..

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por auxílios de pesquisa e auxílios individuais aos pesquisadores concedidos ao de Curso de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará

À Fundação Cearense de Amparo à Pesquisa (FUNCAP), através de convênios firmados com o grupo de Lectinas e Glicoconjugados do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará e auxílios individuais concedidos aos pesquisadores.

À Universidade Federal do Ceará, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular em cujos laboratórios foi executado este trabalho.

À Universidade Federal do Paraná, Departamento de Bioquímica e Química, onde parte deste trabalho foi desenvolvido.

À Universidade Federal do Maranhão pela oportunidade.

SUMÁRIO

<u>LISTA DE FIGURAS</u>	xv
<u>LISTA DE TABELAS</u>	xviii
<u>ABREVIATURAS</u>	xix
<u>RESUMO</u>	xxi
<u>ABSTRACT</u>	xxii
I. INTRODUÇÃO	1
I.1. <u>Considerações gerais</u>	1
I.2. <u>Sementes</u>	6
I.3. <u>Gomas</u>	7
I.3.1. Gomas de algas	9
I.3.2. Gomas microbiológicas	10
I.3.3. Gomas exsudadas	10
I.3.4. Gomas endospérmicas	12
I.3.4.1. Galactomananas	12
I.3.4.2. Galactomananas modificadas	19
I.4. <u>Lectinas</u>	22
I.4.1. Generalidades	22
I.4.2. Ocorrência e localização	25
I.4.3. Especificidade das lectinas	26
I.4.4. Isolamento de lectinas	28
I.4.5. Utilização das lectinas	31
II. HIPÓTESE DE TRABALHO	35
III. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL	37
IV. MATERIAL	39
IV.1. <u>Sementes vegetais</u>	39

IV.1.1 Sementes de <i>Parkinsonia aculeata</i>	39
IV.1.2 Outras sementes	39
IV.2. <u>Outros materiais</u>	39
IV.2.1. Hemácias	39
IV.2.2. Gomas endospérmicas	39
IV.2.3. Reagentes	39
V. MÉTODOS	41
V.1. <u>Caracterização das sementes de <i>Parkinsonia aculeata</i> L.</u>	41
V.2. <u>Isolamento do endosperma bruto</u>	41
V.3. <u>Isolamento de polissacarídeos do endosperma bruto</u>	41
V.4. <u>Determinação dos teores dos constituintes químicos do endosperma</u>	43
V.4.1. Carboidratos totais	43
V.4.2. Nitrogênio total	43
V.4.3. Proteínas solúveis totais	43
V.4.4. Umidade	44
V.4.5. Cinzas	44
V.5. <u>Análise estrutural dos polissacarídeos de endosperma de sementes</u> <u>de <i>Parkinsonia aculeata</i></u>	44
V.5.1. Hidrólises ácidas	44
V.5.2. Análise dos hidrolisados	45
V.5.2.1. Cromatografia em papel	45
V.5.2.2. Tratamento dos polissacarídeos hidrolisados (acetilação e redução)	45
V.5.2.3. Cromatografia líquido-gasosa (CG)	46
V.5.3 Análise da fração 1	46
V.5.3.1. Ressonância magnética nuclear de carbono treze (RMN ¹³ C)	46
V.5.3.2. Oxidação com periodato	46
V.5.3.3 Metilação	47
V.6. <u>Análise viscosimétrica</u>	48
V.7. <u>Determinação da massa molecular</u>	49

V.8. <u>Obtenção das lectinas brutas de sementes de <i>Artocarpus incisa</i>, <i>Artocarpus integrifolia</i> e <i>Abrus precatorius</i></u>	50
V.8.1. Preparação das farinhas de sementes	50
V.8.2. Obtenção de extratos brutos	51
V.8.3. Obtenção das frações ricas em lectinas	51
V.8.4. Determinação das proteínas solúveis	51
V.8.5. Determinação da atividade hemaglutinante	52
V.9. <u>Tratamento dos polissacarídeos endospérmicos de <i>Parkinsonia aculeata</i> com epiclóridrina</u>	52
V.10. <u>Cromatografia de bioafinidade</u>	52
V.10.1. Preparação das colunas de afinidade	52
V.10.2. Cromatografia de afinidade de lectinas em colunas de <i>Parkinsonia aculeata</i>	53
V.11. <u>Eletroforese em gel de poliacrilamida</u>	53
VI. RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
VI.1. <u>Características da planta</u>	56
VI.2. <u>Características da semente</u>	56
VI.2.1. Morfologia	56
VI.2.2. Análise elementar da semente de <i>Parkinsonia aculeata</i>	60
VI.2.3. Nitrogênio total e teor de cinzas	63
VI.3. <u>Isolamento das galactomananas de endosperma de sementes de <i>Parkinsonia aculeata</i></u>	61
VI.4. <u>Determinação da estrutura das frações polissacarídicas de <i>Parkinsonia aculeata</i></u>	62
VI.4.1. Cromatografia em papel	62
VI.4.2. Cromatografia líquido-gasosa dos polissacarídeos hidrolisados	62
VI.4.3. Metilação da fração 1 de <i>Parkinsonia aculeata</i>	67
VI.4.4. Oxidação da fração 1 com metaperiodato de sódio	71
VI.4.5. Análise da fração 1 por ressonância magnética nuclear de carbono treze (RMN ¹³ C)	75

VI.5. <u>Determinação da viscosidade intrínseca das amostras de galactomananas</u>	77
VI.6. <u>Determinação da massa molar das galactomananas</u>	80
VI.7. <u>Tratamento dos polissacarídeos endospermicos de <i>Parkinsonia aculeata</i> com epicloridrina</u>	83
VI.8. <u>Cromatografia de afinidade de lectinas em colunas preparadas com matrizes de galactomananas de <i>Adenantha pavonina</i>, <i>Cyamopsis tetragonolobus</i> e <i>Parkinsonia aculeata</i>.</u>	87
VI.9. <u>Cromatografia de afinidade de lectinas em colunas preparadas com frações polissacarídicas do endosperma de <i>Parkinsonia aculeata</i></u>	89
VI.10. <u>Eletroforese em gel de poliacrilamida</u>	91
VII. RESUMO DOS RESULTADOS	93
VIII. CONCLUSÕES	94
IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
01 Aspectos de galactomananas com diferentes distribuições de galactose na cadeia principal da manana	16
02 Reação de dextrana com epicloridrina na formação do gel Sephadex	21
03 Fluxograma de fracionamento das galactomananas endospérmicas de <i>Parkinsonia aculeata</i>	42
04 Determinação gráfica da viscosidade intrínseca	48
05 Árvore de <i>Parkinsonia aculeata</i> , em seu habitat natural	57
06 Folhas, flores e vagens de <i>Parkinsonia aculeata</i> L.	58
07 Vagens, sementes e endosperma de <i>Parkinsonia aculeata</i> L.	59
08 Cromatografia líquido-gasosa (CG) dos padrões (A) e da fração 1 de semente de <i>Parkinsonia aculeata</i> (B)	63
09 Cromatografia líquido-gasosa (CG) dos padrões para manose e galactose (A) e da fração 2 de semente de <i>Parkinsonia acauleata</i> (B)	62
10 Cromatografia líquido-gasosa (CG) da fração 3 (A) e da fração 4 (B) tendo como padrão o mesmo da fração 1.	65
11 Cromatografia líquido-gasosa do resíduo de extração (R ₁).	66
12 Perfil cromatográfico por CG-EM da fração 1 metilado de semente <i>P. aculeata</i> .	69
13 Espectro de massa correspondente ao derivado do pico 585 presente na fração 1 de semente <i>P. aculeata</i>	69
14 Espectro de massa correspondente ao derivado do pico 608 presente na fração 1 de semente <i>P. aculeata</i>	69
15 Espectro de massa correspondente ao derivado do pico 716 presente na fração 1 de semente <i>P. aculeata</i>	70
16 Espectro de massa correspondente ao derivado do pico 747 presente na fração 2 de semente <i>P. aculeata</i> .	70
17 Espectro de massa correspondente ao derivado do pico 925 presente	70

	na fração 2 de semente <i>P. aculeata</i> ..	
18	Tempo de retenção de padrões alditois acetato utilizados na figura 19 e 20	73
19	Análise por CG da fração 1 de semente de <i>Parkinsonia aculeata</i> por oxidação com metaperiodato de sódio – (1 ^o ciclo), após derivatizações para alditóis acetato.	74
20	Análise por CG da fração 1 de semente de <i>Parkinsonia aculeata</i> por oxidação com metaperiodato de sódio – (2 ^o ciclo), após derivatizações para alditóis acetato.	74
21	Espectro de ¹³ C-RMN da fração 1 da semente de <i>Parkinsonia aculeata</i>	76
22	Espectro de ¹³ C-RMN da fração 1 da semente de <i>Parkinsonia aculeata</i> (região de ampliação 112-92 ppm.	76
23	Representação gráfica da viscosidade intrínseca das galactomananas de <i>P. aculeata</i> . Fração P1, em viscosímetro capilar , solvente água, (A) e solvente cloreto de sódio 0,1M (B), em reômetro Brookfield (C). Todas as leituras foram efetuadas a 20°C.	78
24	Viscosidade intrínseca da galactomanana (fraçã 2) de <i>P. aculeata</i> em água (viscosímetro capilar, leituras efetuadas a 20°C).	80
25	Perfis de eluição por GPC, empregando os detetores de difusão de luz e Índice de refração, para fração 1.	82
26	Perfis de eluição por GPC, empregando os detetores de difusão de luz e Índice de refração, para a fração 2.	82
27	Cromatografia de afinidade em coluna de goma endospermica de <i>Parkinsonia aculeata</i> L. reticulada com diferentes concentrações de epicloridrina (A), volumes de NaOH 3mol/L (B) e concentração de NaOH (C). Amostra: fração rica de <i>Artocarpus integrifolia</i> (30mg/2mL). Eluição NaCl 0,15M seguido de tampão glicina HCl 0,1M pH 2,6 contendo NaCl 0,15M.	86
28	Cromatografia de afinidade em coluna de gomas endospermica de <i>Cianopus tetragonolobus</i> (guar), <i>Adenanthera pavonina</i> (carol),	87

- Parkinsonia aculeata* (turco) no tratamento A₂. Amostra: frações rica de lectina de *Abrus precatorius* (A); *Artocarpus integrifolia* (B); e *Artocarpus incisa* (C) (30 mg/2mL). Eluição: solução de NaCl 0,15 mol/L seguido de solução de galactose 0,2 mol/L contendo NaCl 0,15 mol/L.
- 29 Cromatografia de afinidade em coluna de gomas endospermica de frações: 1, 2, 3 e 4 *Parkinsonia aculeata* (turco) no tratamento A₂. Amostra: frações rica de lectina de *Abrus precatorius* (A); *Artocarpus integrifolia* (B); e *Artocarpus incisa* (C) (30 mg/2mL). Eluição: solução de NaCl 0,15 mol/L seguido de solução de galactose 0,2 mol/L contendo NaCl 0,15 mol/L. 90
- 30 Eletroforese em gel de poliacrilamida das frações obtidas por cromatografia de afinidade em coluna de *Parkinsonia aculeata* L. Amostras: (A) 1: Fração rica de lectina de *artocarpus integrifolia*, 2: Pico 1 de *artocarps integrifolia*, 3: Pico 2 de *artocarps integrifolia*. (B) 4: Fração rica de lectinas de *Artocarpus incisa*, 5: Pico 2 de *Artocarpus incisa*, 6: Pico 2 de *Artocarpus integrifolia* 91
- 31 Eletroforese em gel de poliacrilamida das frações obtidas por cromatografia de afinidade em coluna de *Parkinsonia aculeata* L. Amostras: 1: Fração rica de lectina de *abrus precatorius*, 2: Pico 1 de *abrus precatorius*, 3: Pico 2 de *Abrus precatorius*. 92

LISTA DE TABELAS

TABELA	Página
I Métodos cromatográficos para purificação de proteínas	2
II Classificação das gomas naturais, quanto à sua origem	9
III Medidas morfológicas de sementes de <i>Parkinsonia aculeata</i> L.	60
IV Teor de umidade de componentes da sementes de <i>Parkinsonia aculeata</i> L.	60
V Rendimento das frações polissacarídicas de goma bruta de <i>Parkinsonia aculeata</i>	61
VI Teores percentuais de monossacarídeos e relação molar (Man:Gal) nas diversas frações polissacarídicas de sementes de <i>Parkinsonia aculeata</i>	62
VII Análise de metilação da fração 1 de <i>Parkinsonia aculeata</i> por CG	68
VIII Análise por CG dos dois ciclos de oxidação da fração 1 com metaperiodato de sódio	72
IX Análise da fração 1 por ressonância magnética nuclear de carbono treze, deslocamento químico (δ) em ppm	75
X Tratamento dos polissacarídeos totais (goma endospermica bruta) de <i>Parkinsonia aculeata</i> com diferentes concentrações de NaOH, goma e epicloridrina	84
XI Teor de proteína (em DO) dos picos obtidos por cromatografia de afinidade das frações ricas em lectinas em colunas de goma de <i>Parkinsonia aculeata</i> , retida em diferentes condições	85
XII Comparação de volumes ocupado pelas frações polissacarídicas de <i>Parkinsonia aculeata</i> , tratadas com epicloridrina e suspensa em NaCl 0,15 mol/L	87
XIII Teor de proteína (em DO) dos picos obtidos por cromatografia de afinidade de frações ricas em lectinas de <i>Artocarpus incisa</i> , <i>Artocarpus integrifolia</i> e <i>Abrus precatorius</i>	89

ABREVIATURAS

CDR	Domínio particular de uma lectina que reconhece carboidrato
GlcNAc	N-acetil-glicosamina
SBA	Lectina de soja
Man	Manose
Gal	Galactose
Manana	Uma cadeia linear polissacarídica constituída de unidades de manose
RIP	Proteína inativadora de ribossomo
F(50-70)	Fração proteica precipitada com sulfato de amônio entre 50% e 70% de saturação
HIC	Cromatografia de interação hidrofóbica
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de dodecil sulfato de sódio
Com A	Lectina de semente de <i>Canavalia ensiformis</i>
BSA	Albumina sérica bovina
TFA	Ácido trifluoroacético
DMS	Dimetil sulfóxido
Fração 1	Polissacarídeos de endosperma de semente de <i>P. aculeata</i> extraídos com água destilada a 4°C
Fração 2	Polissacarídeos de endosperma de semente de <i>P. aculeata</i> extraídos com água destilada a 20°C
Fração 3	Polissacarídeos de endosperma de semente de <i>P. aculeata</i> extraídos com água destilada a 80°C
Fração 4	Polissacarídeos de endosperma de semente de <i>P. aculeata</i> extraídos com solução de NaOH 2mol/L a 100°C

PI	Àrea correspondente ao pico um do dado cromatograma do isolamento de lectina
PII	Àrea correspondente ao pico dois do dado cromatograma para isolamento de lectina
GLC-MS	Cromatografia Líquido-gasosa acoplada a espectrômetro de massa
GLC	Cromatografia Líquido-gasosa
UV-VIS	Ultra violeta-visível
Tris-HCl	Hidroximetil aminometano – ácido clorídico
A ₂₈₀	Absorbância medida a 280nm
DO	Densidade ótica
TCA	Ácido tricloroacético
OCH ₃	O-metil
¹³ C	Carbono 13
Rg	Raio de giração
CGP	Colunas de ultrahidrogel
MN	Massa molar numérica média
MW	Massa molar ponderal média
Kda	Kilo Dalton
$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}-\text{Cl} \\ \quad \quad \quad \diagdown \\ \quad \quad \quad \quad \text{O} \end{array}$	Epicloridrina
Å	Angston

RESUMO

A cromatografia de afinidade leva em conta a capacidade de interação da proteína, com a matriz. Assim, visando desenvolver novas matrizes para cromatografia de afinidade de lectinas, polissacarídeos naturais ou sintéticos têm sido muito utilizados.

Nesta Tese, as gomas endospérmicas de *Parkinsonia aculeata* foram isoladas e fracionadas e foi identificada uma família de galactomananas solúveis que tiveram sua estrutura parcialmente determinada, mostrando ser composta por quatro grupos principais de galactomananas, formadas por uma cadeia linear de manose unidas por ligações $\beta(1-4)$ com substituições de galactose em ligação $\alpha(1-6)$, apresentando relações Man:Gal de 3,1:1, 3,7:1, 5,0:1 e 6,1:1 correspondendo, respectivamente, a 26,2%, 8,0%, 18,0% e 2,9% e deixando um resíduo de 44,9%.

A Mw da Fração 1 é de 775700 g/mol, determinada por GPC. A sua viscosidade intrínseca em água é de 428,8 mL/g e de 532,9 em uma solução de NaCl 0,1 mol/L. Com estes dados evidenciou-se a a polidispersão do polissacarídeo.

O endosperma total e as diversas frações obtidas de *P. aculeata* foram avaliadas quanto à capacidade de interagir com lectinas ligantes de galactose. Os polissacarídeos foram tratados com epiclorigidrina e o material reticulado obtido foi utilizado para a montagem de colunas cromatográficas às quais foram aplicadas frações ricas em lectinas de sementes de *Artocarpus incisa*, *Artocarpus integrifolia* e *Abrus precatorius*.

As diversas matrizes obtidas apresentaram diferenças na capacidade de interagir com as lectinas. Assim, todas as frações polissacarídicas prenderam mais eficientemente as lectinas de *Artocarpus incisa* e *Artocarpus integrifolia* do que a lectina de *Abrus precatorius*. Além disso, a galactomanana obtida por extração com água fria, que apresentou uma relação man:gal de 3,1:1 foi mais eficiente para o isolamento das lectinas, mostrando um relação entre o número de substituições de galactose e a capacidade de reter lectinas, nas condições utilizadas para a estabilização do suporte.

ABSTRACT

The affinity chromatography of proteins is based in the specific interaction of these and the matrix. Thus, in order to develop new matrices for the isolation of lectins by affinity chromatography, natural and artificial polysaccharides have been utilized.

In this work, the endospermic gums from *Parkinsonia aculeata* seeds were isolated and fractionated. A family of galactomannans was identified, had their structure partially characterized and was shown to be composed by four groups of galactomannans. The galactomannans was made by $\beta(1-4)$ linked linear chain of D-mannose units with D-galactose substitutions in $\alpha(1-6)$, showing relations mannose: galactose of 3.1:1, 3.7:1, 5.0:1 and 6.1:1, corresponding, respectively, to 26.5%, 8.0%, 18.0% and 2.9%, with an insoluble residue of 44.9%.

The crude endosperm and the several fractions obtained from *P. aculeata* seeds were investigated with respect to their capacity of binding galactose specific lectins. Thus, the polysaccharides were treated with epichlorohydrin and the cross-linked material used as matrices for affinity chromatographic columns, to which lectin rich fractions of *Artocarpus incisa*, *Artocarpus integrifolia* and *Abrus precatorius* seeds were applied.

The several matrices obtained, showed differences in the capacity to interact with the lectins. Thus, all polysaccharide fractions bound more efficiently the to *Artocarpus* (*A. incisa* and *A. integrifolia*) than to the *Abrus precatorius* lectins. Moreover, the galactomannan soluble in cold water, which shows a man:gal relation of 3.1:1, was the most efficient for the isolation of the lectins, probably due to the higher number of galactose substitution.

I. INTRODUÇÃO

I. INTRODUÇÃO

I.1. Considerações gerais

Um dos problemas cruciais de quem estuda proteínas é a sua extração e purificação, a partir do organismo onde a mesma é encontrada. Dependendo de sua função na planta, as proteínas vegetais podem ser intra ou extra celulares, e da sua localização depende o método escolhido para a sua extração e separação dos principais contaminantes.

Para se estudar uma proteína é fundamental separá-la, não só dos componentes celulares não protéicos (como polissacarídeos, lipídeos, ácidos nucléicos, e outros) como das demais proteínas contaminantes. Através de métodos que utilizam algumas das propriedades inerentes à molécula, como solubilidade (dependente do pH e da concentração iônica do meio) e tamanho, pode-se obter um extrato que contenha apenas uma coleção de moléculas com propriedades de tal maneira próximas que só poderão ser separadas por métodos mais refinados, como os métodos cromatográficos.

Segundo HARRIS & ANGAL, 1995, muitos métodos de separação cromatográfica foram desenvolvidos ao longo do tempo, representação na Tabela I.

Destacam-se, entre os clássicos, aqueles métodos que levam em conta principalmente a carga e o tamanho da molécula através de cromatografias de troca iônica e de filtração em gel. Esses métodos, no entanto, além de apresentarem um baixo rendimento, apresentam uma resolução pequena. Mais recentemente, foram desenvolvidos métodos de cromatografia de afinidade, envolvendo diretamente a atividade intrínseca da proteína que se deseja isolar.

A cromatografia de afinidade se baseia na interação da proteína com um ligante específico, presente na matriz cromatográfica. Quando a proteína, presente na fase móvel, entra em contato com a matriz (fase fixa), pode interagir com o ligante e então ser separada das demais proteínas. Um aspecto importante desta interação é que a mesma é reversível e a proteína pode ser eluída, após a retirada das proteínas não retidas, com o auxílio de um outro ligante, solúvel, que por competição desloca o equilíbrio do sistema, liberando a molécula protéica.

Tabela I. Métodos cromatográficos para purificação de proteínas

Propriedades	Tipo	Características	Uso
Físico-químicas			
Forças de van der Waals, Ponte de hidrogênio, Polaridade, Momento dipolar	Adsorção	Alta capacidade Alta resolução Alta velocidade	Fracionamento a partir de extratos brutos
Carga	Troca iônica	Alta resolução Alta velocidade Alta capacidade	Adsorção inicial Fracionamento
Hidrofobicidade de Superfície	Interação hidrofóbica	Boa resolução Alta capacidade Alta velocidade	Fracionamento Parcial
Afinidade biológica	Afinidade	Excelente resolução Alta velocidade Alta capacidade	Fracionamento Adsorção a partir de extratos brutos
Ponto isoelétrico	Cromatofocalização	Altíssima resolução Alta velocidade Altíssima capacidade	Fracionamento
Tamanho molecular	Filtração molecular	Resolução moderada Baixa capacidade Dessalinização	Remoção de solvente Remoção de sal Purificação final
Interações hidrofóbicas e hidrofílicas	Fase reversa	Excelente resolução Capacidade moderada	Fracionamento

Fonte: HARRIS & ANGAL, 1995

A cromatografia de afinidade pode ser aplicada a uma variedade de macromoléculas biológicas, dependendo apenas da existência de um ligante imobilizado em uma matriz insolúvel. Estas matrizes de afinidade, às quais os ligantes estão ligados devem ser química e mecanicamente estáveis, nas condições de acoplamento, tais como: pH, força iônica, temperatura e à presença de agentes desnaturantes (uréia, cloreto de guanidina, detergentes e outros). Elas devem ser uniformes, esféricas, rígidas e porosas, e possuir grupos químicos que possam ser ativados e ou modificados de modo a permitir a ligação química com diferentes ligantes.

A aplicabilidade da cromatografia de afinidade abrange a purificação de várias biomoléculas como:

- a) Enzimas, purificadas em colunas contendo inibidores ou substratos imobilizados;
- b) Anticorpos, purificados em colunas contendo antígenos imobilizados;
- c) antígenos, purificados em colunas contendo anticorpos imobilizados;
- d) glicoconjugados de membranas, ou solúveis, purificados em colunas contendo lectinas imobilizadas.

Na década de 50, foi feito o primeiro relato do uso da cromatografia de afinidade. Entretanto, foi no início da década de 1960 que esse tipo de cromatografia teve um grande avanço através dos trabalhos de CUATRECASAS *et al.*, (1968), passando a ser amplamente empregada como método de purificação de macromoléculas, com evidente sucesso. Para se ter uma idéia, entre 1980-1982, foram catalogadas 1800 publicações que empregavam a cromatografia por bioafinidade como uma etapa de purificação de moléculas biologicamente ativas (SPADARO & FONSECA, 1993).

O uso da cromatografia de afinidade para isolamento de lectinas surgiu com o trabalho de AGRAWAL & GOLDSTEIN (1965), que isolaram a lectina de sementes de *Canavalia ensiformis* (Con A), em coluna de Sephadex G-50. Hoje, praticamente todo processo de isolamento de lectinas depende deste tipo de cromatografia.

O tipo de matriz empregada na cromatografia de afinidade de lectinas está diretamente ligado à especificidade das mesmas. Muitas matrizes, criadas para filtração em gel, disponíveis comercialmente, têm mostrado bom desempenhos como matrizes para cromatografia de afinidade. Este é o caso da Sephadex, que é uma

dextrana (MOREIRA *et al.*, 1983). Algumas matrizes, mais eficientes, foram desenvolvidas ao longo da última década, contendo ligantes de lectina covalentemente ligados à matrizes estáveis. Entre estes, são utilizados principalmente mono ou dissacarídeos e glicopeptídeos ligados principalmente à Sepharose. Mais recentemente, tem se desenvolvido bastante o uso de glicoconjugados naturais como quitinas e gomas vegetais reticuladas (MOREIRA, 1998).

Muitos glicoconjugados naturais, insolúveis, são adsorventes sensíveis para o isolamento de lectinas. Eles são geralmente baratos e nem sequer precisam ser quimicamente homogêneos, embora precisem estar completamente livres de substâncias que possam ser liberadas por lixiviação, durante a cromatografia.

A cromatografia de afinidade separa moléculas protéicas, de acordo com a estrutura de suas cadeias polipeptídicas e sua refinada modificação pós tradução. A base consiste na interação entre dois componentes (uma proteína que liga carboidrato e um glicoligante). Isto porque existe em cada lectina um domínio particular que reconhece carboidrato (CDR) e este se liga especificamente a certa seqüência de açúcar nos oligossacarídeos e glicoconjugados (CARON *et al.*, 1997).

Dentre as matrizes atualmente mais utilizadas no isolamento de lectinas vegetais podemos citar:

- a) Dextrana. É essencialmente um polissacarídeo extra-celular produzido pela bactéria *Leuconostoc mesenteroides*, que consiste de unidades de glucose e contém mais de 90% de ligações glicosídicas $\alpha(1\rightarrow6)$. A dextrana contém 3 grupos hidroxilas livres, por unidade de glucose, localizados nos carbonos C2, C3 e C4 e, conseqüentemente, é passível de interagir com lectinas glucose/manose específicas (que exigem estas hidroxilas livres). Hoje, existe no comércio uma matriz, a Sephadex, que consiste de moléculas de dextrana reticuladas por tratamento com epicloridrina (FLODIN, 1962).
- b) Agarose. Este é um polissacarídeo, constituinte do ágar, extraído de algas vermelhas. O ágar consiste de dois componentes: a agarose (um polímero linear de galactose e 3,6-anidro-L-galactose, que não contém grupos ionizáveis, ligadas alternadamente, por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$) e a agarpectina, que parece conter também grupos carboxilas e sulfatos. Comercialmente estão disponíveis

- diversas matrizes de agarose, preparadas, inicialmente para cromatografias de filtração em gel, mas que hoje são bastante usadas para cromatografia de afinidade, no isolamento de lectinas galactose-específicas;
- c) Quitina, um polímero de N-acetil-D-galactosamina, é o principal componente do exoesqueleto dos artrópodes. Ela consiste de cadeias lineares de resíduos de GlcNAc, ligados por ligações β -(1-4)-glicosídicas. A sua obtenção, relativamente simples, se dá pela maceração de carapaças de moluscos, e uma lavagem exaustiva com HCl concentrado para retirar todos os componentes solúveis (WHITMORE, 1992);
 - d) Estroma de células vegetais. Os estromas desproteinizados de células vegetais, exaustivamente lavados, foram utilizados para o isolamento de lectinas galactose específicas (LUCK *et al.*, 1992);
 - e) Estroma de hemácia animal. Muitas lectinas, apesar de aglutinar hemácias tanto humanas como de animais, não apresentam especificidade por qualquer dos monossacarídeos dos grupos de MAKELA (1957), e só interagem com oligossacarídeos de estrutura complexa. Assim, não são capazes de interagir com as matrizes convencionais. Essas lectinas podem, no entanto, ser isoladas por colunas montadas com estromas de hemácias, imobilizadas por tratamento com glutaraldeído (MOREIRA & OLIVEIRA, 1983 a, b);
 - f) Gomas vegetais exsudadas. Certas plantas exsudam gomas do caule, como defesa contra predadores ou como conseqüência de ferimentos. Estas gomas exsudadas são polímeros complexos contendo, usualmente, galactose, ramnose, arabinose e ácido glicurônico. Usando a goma arábica (extraída de *Acacia senegal*), como matriz, FUGITA *et al.* (1975), desenvolveram uma coluna para cromatografia de afinidade. A coluna foi capaz de isolar a lectina galactose-específica, presente no filtrado de cultura de *Streptomyces sp*;
 - g) Gomas vegetais endospérmicas. Parte das sementes de leguminosas é constituída galactomananas que são polissacarídeos formados de uma cadeia principal de unidades de D-manopiranosil, contendo multiramificações de unidades de D-galactopiranosil, que varia em proporção molar, diferentes arranjos moleculares e distribuição na cadeia principal. Estes polissacarídeos, podem ser transforma-

dos em matrizes cromatográficas de afinidade, com a capacidade de isolar lectinas galactose específicas, e cuja resolução pode variar de acordo com a interação (especificidade) e os diferentes arranjos estéreo espaciais das moléculas reagentes, ilustrativamente representados pelas gomas endospermicas de *Cyamopsis tetragonolobus* (APPUKUTTAN *et al.*, 1977) e *Adenantha pavonina* (TAVARES, 1998).

I.2 Sementes

Sob o ponto de vista botânico, as plantas superiores podem ser divididas em duas grandes classes: das gimnospermas e das angiospermas. Esta última se caracteriza pela presença de sementes que, por sua vez, são encerradas em corpos denominados de frutos (estrutura que representa o último estágio do desenvolvimento do gineceu fecundado ou partenoscárpico). Após a fecundação, os tegumentos do óvulo se transformam em coberturas das sementes. Em geral, o tegumento externo, ou primina, dá origem à testa e o interno, ou secundina, forma o tegma da semente. Em muitos casos, porém, o tegumento interno é absorvido e somente a primina se diferencia em testa e tegma (BARROSO *et al.*, 1999).

As sementes, quanto à forma, podem ser globosas, elipsóides, ovóides, reniformes, cilíndricas, hipocrepiformes, lenticulares, angulosas, comprimidas etc. Externamente, a semente apresenta o hilo (cicatriz deixada pela separação do funículo) que em *Dioclea* e *Mucuna* é tão longo que circunda a semente, a micrópila (pequeno orifício, às vezes imperceptível, às vezes manifesto); rafe (mantém a comunicação entre o hilo e a calaza), calaza (ponto de união da micela com os integumentos), contorno da radícula (saliência do tegumento), pleurogramas (marca lateral na superfície de certas sementes), projeções carnosas (em forma de cobertura da testa), (BARROSO *et al.*, 1999).

O interesse do homem pelas sementes se iniciou ainda nos primórdios da civilização, quando ele percebeu o seu papel peculiar na disseminação da espécie e ainda a sua importância como fonte energética e de alimentos, suprimindo-lhe incontáveis necessidades. Segundo BEWLEY (1986), 70 % de todos os alimentos referentes

ao consumo humano, provem das sementes, principalmente de cereais e leguminosas. Além de fonte de alimentos, as sementes constituem também fontes de matéria prima para outros fins como indústria química e farmacêutica, cosméticos e lubrificantes, entre outros.

O conhecimento da composição química está mais direcionado às espécies cultivadas. Na maioria das espécies utilizadas na alimentação predominam os carboidratos e proteínas.

Os carboidratos estão presentes em vegetais freqüentemente como polissacarídeos, que são produtos da policondensação de monossacarídeos ou seus derivados (ácidos urônicos, açúcares aminados, etc.), ligados glicosidicamente através da eliminação de água entre duas moléculas adjacentes. A denominação polissacarídeos é limitada aos polímeros de dez ou mais unidades monossacarídicas. Os polímeros contendo de 2 a 9 unidades monossacarídicas, são denominadas de oligossacarídeos. Geralmente os polissacarídeos possuem elevada massa molar, contendo em alguns casos, milhares de unidades monossacarídicas (CORREA, 1971). Os polissacarídeos podem assumir as mais diversas formas e desempenhar diferentes funções. Entre estas podemos citar a de reserva, desempenhada principalmente pelo amido encontrado nas sementes e tubérculos; a de componente estrutural, desempenhada pela celulose nas paredes celulares e os glicoconjugados (glicopeptídeos, glicoproteínas e glicolipídeos) nas membranas celulares e a função de defesa, contra predadores e/ou contra o estresse hídrico, desempenhada pelas gomas exsudadas e endospérmicas, respectivamente.

1.3. Gomas

As gomas são moléculas de elevada massa molar, hidrofóbicas ou hidrofílicas, usualmente apresentando propriedades coloidais. Quando dissolvidas, em solventes apropriados, produzem um gel ou suspensão altamente viscosa. Na indústria o termo goma é empregado principalmente para definir polissacarídeos de origem vegetal ou microbiana e seus derivados, que são solubilizados em água fria ou quente, resultando em uma mistura viscosa (WHISTLER & BeMILLER, 1993).

O termo goma foi inicialmente atribuído a um grande número de compostos, incluindo polissacarídeos, terpenos, proteínas e polímeros sintéticos. Hoje é mais utilizado para polissacarídeos e seus derivados, que 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 possui ponto de fusão característico (MANTELL, 1947). Possuem, em geral, a propriedade de geleificar e são muito utilizadas como espessantes e estabilizantes nas indústrias alimentícia e farmacêutica; são compostas principalmente por heteropolissacarídeos complexos contendo, às vezes, compostos protéicos em baixa proporção (CHURMS *et al.*, 1986). Incluem-se nesta categoria, os exsudados de plantas, as gomas de algas e de sementes. Para alguns autores, os amidos e derivados de celulose também podem ser considerados gomas.

Entre as gomas de origem vegetal, as mais utilizadas industrialmente são as gomas endospermicas. São inúmeras as sementes que fornecem gomas, algumas de alto valor comercial e bastante empregadas nas indústrias de cosmético, farmacêuticas e alimentícias.

As gomas são utilizadas nas tecelagens, na fabricação de papéis, de tintas de pastas de polimentos, de fósforo, na litografia etc. Algumas, são utilizadas na alimentação, na fabricação de alimentos, na confeitaria, em geleias, xarope, saladas, maioneses, etc. A cosmética as utiliza nos fixadores de cabelos, pós compactos, cremes e outros produtos de beleza. Na farmácia são usadas na preparação de emulsão, mucilagens, pastilhas etc. Na medicina, têm um emprego limitado: externamente em aplicações locais como agente anti-ressecamento; e internamente, nas inflamações, pela sua ação protetora das mucosas (MANTELL, 1947).

Do ponto de vista estrutural, as gomas apresentam cadeias lineares ou ramificadas compostas de unidade glicosídicas, podendo apresentar de cem a mil unidades. Ao contrário do amido e da celulose, que são homoglicanas, compostos por apenas um tipo de unidade de açúcar, a glucose, as gomas são heteroglicanas, constituídas por mais de um tipo açúcar.

Com características semelhantes às gomas vegetais podem ser incluídas entre elas, aquelas obtidas por fermentação microbiológicas (Tabela II).

TABELA II. Classificação das gomas naturais, quanto à sua origem

Exsudados de plantas	Goma Arábica
	Goma Caraia
	Goma Tragacante
	Goma Gatti
	Goma de Cajueiro
	Goma de Angico
Extraídas de algas	Ágar
	Carragenana
	Alginato
Extraídas de sementes	Goma Guar
	Goma Carob
	Goma Carol
	Goma Fenugreek
	Goma Tara
Fermentação Microbiológica	Dextrana
	Xantana

I.3.1 Gomas de algas

Os polissacarídeos extraídos de algas se constituem, principalmente, em componentes estruturais das paredes celulares. A presença de determinados polissacarídeos em algas é sazonal variando de acordo com a temperatura da água, o acesso aos nutrientes e com a luz do sol (KENNEDY & WHITE, 1988).

A maioria das gomas de algas, como é o caso do ágar, alginatos e carragenana pode ser extraída dos tecidos com água quente, ácido diluído ou álcalis. O ágar é um polissacarídeo extraído de algas marinhas da classe *Rodophyceae*, é insolúvel em água fria e bastante solúvel em água quente. O ágar é um dos agentes capazes de formar gel mais usado. A baixas concentrações, apresenta alta resistência e reversibilidade. Na indústria alimentícia o ágar é usado como estabilizante e em laboratório é corriqueiramente usado como suporte em técnicas de eletroforese, imunoeletroforese, imunodifusão e filtração em gel.

I.3.2 Gomas microbiológicas

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 exemplo deste grupo. A primeira, é sintetizada pela bactéria *Leuconostoc mesenteroides* por fermentação da sacarose, ou por bactérias pertencentes à família dos *Lactobacillaceae*.

Quimicamente, as dextranas são neutras, constituídas de cadeias de α -D - glucopirranose, geralmente através de ligações α -(1 \rightarrow 6), tendo algumas ramificações que formam ligações β -(1 \rightarrow 3) e β -(1 \rightarrow 4) (KENNEDY & WHITE, 1988).

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).

I.3.3 Gomas exsudadas

Certas plantas exsudam, do caule, substâncias (gomas) que parecem agir contra predadores ou contra agressores físicos e biológicos. Estas gomas exsudadas

são polímeros complexos contendo, usualmente, galactose, ramnose, arabinose e ácido glucurônico.

As *Leguminosae*, as *Combretaceae*, as *Cactaceae* e as *Anacardiaceae* são famílias, com espécies que produzem gomas na forma de exsudadas. Estas gomas são exsudadas principalmente de caules e galhos de plantas, como defesa contra predadores e como consequência de traumatismo ocasionalmente acontecido na superfície do vegetal. Sabe-se ainda, que condições climáticas desfavoráveis e solos pobres estimulam a produção de gomas (ROSENTHAL, 1955, ANDERSON & McDOUGALL, 1987).

A produção de exsudados de algumas plantas pode ser induzida também por agressão por agentes químicos, como óxido de etileno e derivados de ácido benzóico. Entre os exemplos desse tipo de polissacarídeos estão as gomas arábica, caraia, tragacante, gatti (WHISTLER & BeMILLER, 1993) e as do cajueiros e angico (PAULA, 1995).

A goma arábica extraída da espécie *Acacia senegal* é também conhecida como Acácia, goma da Turquia ou goma do Senegal. Ela é exsudada como resposta a agressão física, ataque de predadores (insetos e microorganismos) e condições climáticas adversas. Alguns autores sugerem que bactérias presentes nas superfícies traumatizadas do vegetal podem, também estimular a produção deste tipo de goma (SMITH, 1904, BLUNT, 1926, ANDERSON & McDOUGALL, 1987).

A goma arábica é um polissacarídeo ácido ramificado contendo galactose, ramnose, arabinose e ácido glucurônico (REES & WELSH, 1977). Na indústria de alimentos, é utilizada como estabilizante e na farmacêutica, como estabilizante de emulsões e como adesivo na produção de comprimidos.

FUGITA *et al.* (1975) trataram a goma arábica com epicloridrina e produziu uma matriz cromatográfica de afinidade com reconhecida eficiência para isolar lectinas galactose específica, a partir de um filtrado de *Streptomyces sp.*

Esta propriedade tem sido usada para purificar lectinas que se ligam em uma matriz da goma de guar (APPUKUTTAN *et al.*, 1977, PUSZTAI, A. *et al.*, 1991).

I.3.4 Gomas endospérmicas

Algumas sementes, principalmente de leguminosas, contém um endosperma gomoso, cuja principal função seria de absorver água, em quantidade de até 10 vezes superior ao seu peso, aparentemente destinado à defesa das plantas jovens contra o estresse hídrico. Esta, é uma das prováveis funções atribuídas às gomas presentes nas sementes (gomas endospérmicas), tão importante, que asseguram o estabelecimento da plântula vegetal (ASPINALL, 1982).

A leguminosa *Ceratonia siliqua* apresenta um teor de 38% de galactomanana na semente. Sabe-se que algumas apresentam quantidades de endosperma superiores a 50%. Este é um dado que varia de acordo com a espécie (DEA & MORRISON, 1975).

As gomas endospérmicas mais comercializadas, atualmente, são as de *Cyamopsis tetragonolobus* (goma de guar) *Ceratonia siliqua* (goma de Carob ou alfarroba) e *Caesalpinia spinosae* (goma tara), todas estruturalmente representadas por galactomananas. Desde 1953 a galactomanana de guar (goma de guar), predomina no mercado destes polissacarídeos.

Diversas sementes tiveram suas gomas endospérmicas investigadas estruturalmente e todas mostraram ser basicamente constituídas de galactose e manose em diferentes proporções, tais como: *Mimosa scabrella* (GANTER *et al.*, 1992), *Schizolobium parahybum* (ZAWADZKI-BAGGIO *et al.*, 1992) *Schizolobium amazonicum* (GANTER *et al.*, 1995) *Stryphnodendron barbatiman* (REICHER *et al.*, 1991, REICHER *et al.*, 1992)

I.3.4.1. Galactomananas

As gomas endospérmicas apresentam como principais constituintes, as galactomananas. Elas são carboidratos constituídos por uma cadeia principal de unidades de D-manopirranose interligadas por ligação β (1→4), com alguns pontos da cadeia principal conectados a moléculas de D-galactopirranose ligadas em α (1→6), sugerindo vários arranjos conformacionais.

Embora as galactomananas clássicas obedeam a estrutura descrita, existem algumas delas, com menor frequência, que são diferenciadas como o polissacarídeo de sementes de *Parkinsonia aculeata*. Este de acordo com GUHRA & SINGH (1988), apresenta um polissacarídeo de estrutura multiramificada, com a presença de ligações (1→3), (1→4), e (1→6), distribuídos ao longo da cadeia principal.

Estudos em galactomananas de *Caesalpinia pulcherima* (URAU *et al.*, 1970) e de *Parkinsonia aculeata* demonstraram significativos desvios na estrutura clássica das mesmas (GURHA, & SINGH, 1988). Estes desvios são bastantes perceptíveis em outras galactomananas e sementes, como as de *Gleditsia ferox*, *Gleditsia amorphoides* e *Trifolium repens*. Elas apresentam estruturas de cadeias curtas de D-galactose com ligações glicosídicas do tipo α (1→6), ligadas à cadeia principal de manose (DEA & MORRISON, 1975).

Segundo RECHIA *et al.*, (1995) foi isolada uma galactomanana da semente de *Senna multijuga* que apresentou uma proporção de Man:Gal de 2,3:1, e que consiste de uma cadeia formada de unidades β -D-manopiranosil substituído na posição O-6 por unidades simples de D-galactopiranosil. Curiosamente, das mesmas sementes, estes autores isolaram uma arabinoxilana ácida. Estes resultados contradizem aqueles de DUBEY e GUPTA (1979), que relatam a presença de um polissacarídeo ramificado, constituído de D-galactose, D-manose e D-xilose com uma relação molar de (5:1:2), sendo a cadeia principal constituída de unidades de galactopiranosose, manopiranosose e xilopiranosose ligadas por β (1→4) e cadeias laterais de D-galactopiranosose e D-xilopiranosose, resultando em um polímero altamente ramificado (RECHIA, 1992).

As sementes das família das *Leguminosae* são as maiores fontes de galactomananas vegetais. Entretanto podemos obter galactomananas microbianas e de líquens. Se examinarmos esses polissacarídeos, à luz da sua estrutura, verifica-se que estas últimas, apresentam unidades de açúcar na forma furanosídica, enquanto, que nos vegetais, ocorrem na forma piranosídica. Este tipo de mudança química configuracional evidentemente lhes confere propriedades e funções diferentes.

Com relação às propriedades das galactomananas sabe-se que elas formam soluções altamente viscosa em contato com a água. Neste aspecto, é importante

considerar sua massa molar, sua relação proporcional (Man:Gal) e distribuição de galactose na cadeia polissacarídica (como revisão ver PETKOWICZ, 1993).

As galactomananas, como outros hidrocolóides, são altamente hidrofílicas, sendo capazes de absorver água, excedendo muitas vezes sua própria massa, formando pseudo-géis homogêneos (DEA & MORRISON, 1975).

Propriedades adicionais das galactomananas podem ser obtidas através de modificações químicas (LAPASIN *et al.*, 1995, AHUJA & RAI, 1997). A incorporação de grupos acil aumenta a sua compatibilidade com lipídeos desenvolvendo propriedades emulsificantes (MATHUR & MATHUR, 1992).

Foi mostrado que o grau de substituição das galactomananas está diretamente relacionado com a sua solubilidade em água. Sabe-se que quanto maior o número de unidades de D-galactose distribuídos na cadeia principal do polissacarídeo maior a sua solubilidade (como revisão ver PETKOWICZ, 1993).

A proporção de unidades manose:galactose também interfere nas propriedades desses polissacarídeos, contribuindo para a interação entre suas moléculas e para degradação enzimáticas (DEA & MORRISON, 1975, DEA *et al.*, 1972, DEA *et al.*, 1986).

Ao examinar-se a estrutura das galactomananas é evidente que a relação manose:galactose e seu grau de substituição variam entre gêneros e sub-famílias dos vegetais. De forma que, alguns autores sugerem a utilização desses dados como possíveis guias na taxonomia das leguminosas (DEA & MORRISON, 1975, DEY, 1978).

REICHER *et al.*, (1991), isolaram uma galactomanana de sementes de *Stryphnodendron barbatiman* (barbatimão), que apresentou uma proporção molar de unidades de manose: galactose na proporção de 1,5:1. Exemplos típicos de variação na proporção molar de resíduos manose:galactose podem ser observadas nas galactomananas de *Mimosa scabrella*, e *Schizolobium parahybae* obedecendo à respectiva distribuição: 1,1:1; e 3,0:1 (GANTER *et al.*, 1993).

A estrutura dessas galactomananas consiste de uma cadeia principal polimérica constituída de unidades de β (1 \rightarrow 4)-D-manopirranose, substituídos em O-6 por uni-

dades simples de cadeia lateral, constituídas de unidade de D-galactopiranosose (GAN-TER *et al.*, 1994).

O estudo da estrutura fina das galactomananas, principalmente com relação à distribuição das unidades de D-manose e D-galactose na cadeia, tem sido realizado através da caracterização da estrutura de oligossacarídeos, obtidos por hidrólises parcial enzimática e ácidas do polímero (GAN-TER *et al.*, 1994).

A relação D-manose:D-galactose, obtida a partir de 70 espécies varia de 1:1 para *Mendicago sativa* até 5,3:1 para *Sophora japonica* (DEA & MORRISON, 1975). Essa grande variação no grau de substituição por galactose, como também a quantidade de galactomananas presente no endosperma de leguminosas, pode ter importância taxonômica (BUCKERIDGE *et al.*, 1995). Deve-se levar em conta porém, que o rendimento desses polissacarídeos pode variar com o método e o tempo de extração.

A relação manose:galactose varia dentro das sub-famílias e mesmo entre os gêneros (DEA & MORRISON, 1975, DEY, 1978). Tem sido ainda relatada a ocorrência de galactomananas com diferentes relações manose:galactose em sementes da mesma espécie como as de *Gleditsia triacanthos* (MANZI, 1984) e *Schizolobium amazonicum* (PETKOWICZ, 1993).

Segundo DEA e MORRISON, (1975), WHISTLER & BeMILLER, (1993), três possíveis estruturas podem ocorrer na distribuição das unidades de D-galactose (G) ao longo da cadeia principal de D-manose (M), numa galactomanana, conforme mostrado na Figura 1.

Algumas dessas gomas, tiveram as suas estruturas investigadas em detalhes. Entre elas:

- a) *Cyamopsis tetragonolobus* (guar). A goma de guar é constituída, principalmente, por uma galactomanana, com massa molar da ordem de 200 a 300 kDa, possuindo uma cadeia formada por unidades β -(1 \rightarrow 4)-D-manose, apresentando ramificações de α -(1 \rightarrow 6)-D-galactopiranosose. A proporção de unidades de manose/galactose, varia conforme os autores. GYN- THER & HUHTIKANGAS, 1984 encontraram uma relação de 2:1 enquanto DEA & MORRISON, 1975 encontraram

relação de 1,4:1. Possivelmente esta discrepância se deve a diferentes metodologias empregadas.

- b) *Adenanthera pavonina* (carolina) apresenta uma estrutura de galactomanana típica, com uma cadeia linear constituída por unidades monossacarídicas de manose com ligações glicosídicas do tipo β -(1 \rightarrow 4) e ramificações com resíduos de D-galactose ligadas à cadeia principal de manose por ligações glicosídicas do tipo α -(1 \rightarrow 6), distribuídos na cadeia principal de manose na proporção molar de manose:galactose de 1,8:1 (TAVARES, 1998).
- c) *Mimosa scabrella* (bracaatinga), (GANTER *et al.*, 1992), *Stryphnodendron barbatiman* (barbatimão), (REICHER *et al.*, 1991), *Schizolobium parahybae* (guapuruvu), (ZAWADZKI-BAGGIO *et al.*, 1992), e *Schizolobium amazonicum* (pinho cuibano) (GANTER *et al.*, 1995). Todas elas apresentam uma goma endospermica com a mesma estrutura convencional de galactomananas de leguminosa, com unidades de manose ligadas por ligações glicosídicas do tipo β -(1 \rightarrow 4) e ramificações laterais constituídas com unidades de galactose dispostas em ligações glicosídicas α -(1 \rightarrow 6), embora demonstrando proporções manose/galactose diferente.

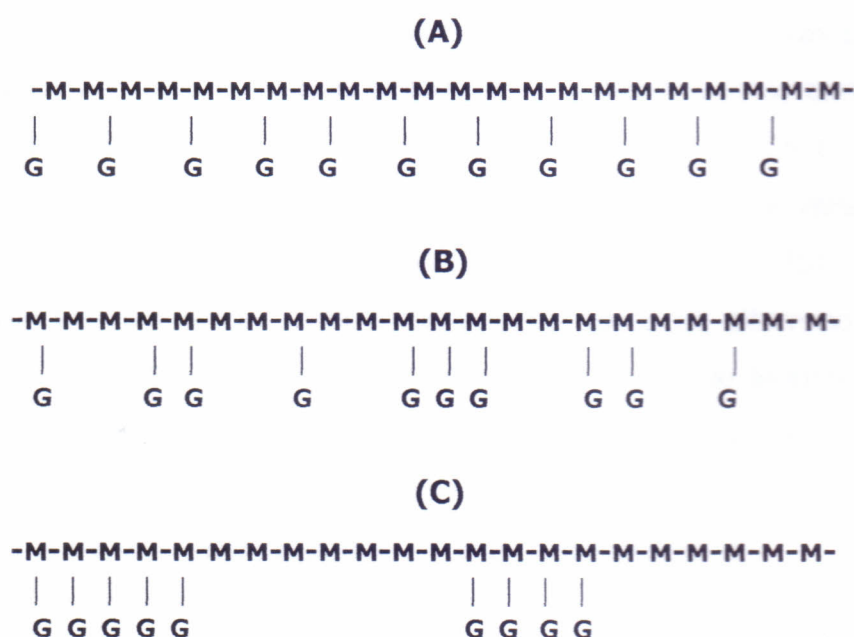


Figura 1. Aspectos de galactomananas com diferentes distribuições de galactose (G) na cadeia principal da manana (DEA & MORRISON, 1975 & WHISTLER & BeMILLER, 1993).

As massas molares das galactomananas estão situadas na faixa de 6000 a 2000 kDa. Por causa de sua polidispersão, muitas delas podem apresentar uma massa molar numérico médio e uma massa molar ponderal média com significativa diferença. Um exemplo é o da goma de guar (como revisão ver PETKOWICZ, 1993).

Muitas galactomananas de sementes de muitas espécies de leguminosas tem sido estudadas. É indiscutível a importância comercial e industrial obtida pelos polissacarídeos das sementes do guar, *Cyamopsis tetragonolobus*, e de carob, *Ceratonia siliqua*, (DEA & MORRISON, 1975).

A maioria dos estudos sobre galactomananas visa principalmente o interesse comercial que envolve estes polissacarídeos, nas diferentes áreas da indústria. Estas aplicações são decorrentes das propriedades reológicas das soluções aquosas, formando soluções de alta viscosidade a baixas concentrações, levemente afetadas por variações de pH e ciclos de aquecimento e resfriamento (DEA & MORRISON, 1975, WHISTLER & BeMILLER, 1993).

A galactomanana da leguminosa *Ceratonia siliqua* (alfarrobo) é muito conhecida e uma das mais antigas gomas extraídas de sementes. A espécie é nativa da região do Mediterrâneo, e hoje está sendo cultivada em muitas outras partes do mundo, incluindo a Austrália e Estados Unidos. Esta galactomanana, também chamada de carob, apresenta uma proporção de manose galactose de 3,6:1, e é solúvel em água quente. É comercializada em quatro principais classes, que variam no grau de pureza, e na malha utilizada na produção (DEA & MORRISON, 1975).

A goma de guar surgiu como substituto da goma de alfarrobo apresentando uma série de vantagens. O guar é também uma espécie de leguminosa nativa da Índia e Paquistão, cultivada na Austrália, África do Sul e nos Estados Unidos. É uma planta que cresce até 1,2 metros, se assemelha à soja e é de fácil plantação e colheita. A goma de guar está disponível comercialmente em diferentes graus de pureza. A relação manose:galactose de 1,4:1 permite que este polissacarídeo seja completamente solúvel em água fria (WHISTLER & BeMILLER, 1993, DEA & MORRISON, 1975).

A extração de galactomananas em escala comercial começa pela eliminação do tegumento. A semente livre então é moída em finas partículas e em seguida se procede a extração da galactomananas com água fria ou quente, com soluções de hidróxido de sódio, ou ácido acético diluído. A porção solúvel da goma é separada por centrifugação ou filtração e o polissacarídeo precipitado com etanol ou complexação com cobre ou bário (DEA & MORRISON, 1975, GUPTA *et al.*, 1987).

As galactomananas podem ser usadas nas indústrias: de alimentos (estabilizantes, espessantes, e dietéticos), farmacêuticas (como material condutor e retardatório do efeito de alguma droga), de cosméticos, químicas (como flocculantes e auxiliares de filtração), na mineração (como material separador) e outras (PE-TKOWICZ, 1993).

Na indústria de papel, substituem as hemiceluloses naturais da madeira, que se dissolvem no licor da polpa e são removidos no processo. As galactomananas são rapidamente absorvidas pelas fibras de celulose, através das pontes de hidrogênio, aumentando a resistência do produto. São também utilizadas na tecnologia de confecção de explosivos, no beneficiamento de minérios, na exploração do petróleo, na indústria têxtil e de tintas. As galactomananas são usadas ainda como aditivos, na alimentação, cosméticos e explosivos (REICHER *et al.*, 1998).

As galactomananas que compõem a goma de guar são amplamente utilizadas na indústria alimentícia, como estabilizante e espessante, assim como em processos de separação molecular (cromatografias), do tipo de afinidade, para isolamento de lectinas (SALES *et al.*, 1989, MORAES, 1992).

Outras características, e conseqüentes aplicações, advém da sinergia das galactomananas de guar e alfarrobo com outros polissacarídeos. Desta forma, pode-se obter um gel resistente de agarose, xantana ou de carragenana, misturando-os com galactomanana (REICHER, 1998).

O sistema galactomanana-xantana é o mais interessante, uma vez que nenhum dos componentes isolados é capaz de formar gel. A formação dos géis de galactomananas com polissacarídeos de algas ou de origem microbiana é atribuída ao resultado das ligações inter-moleculares, não covalentes, entre as regiões não substituídas da galactomanana em sua conformação ordenada e a hélice do outro polis-

sacarídeo, embora não exista prova direta que confirme tal ligação. As galactomananas com menor grau de substituição interagem com outros polissacarídeos, produzindo géis, em muito maior extensão do que aquelas mais substituídas, sugerindo que associações envolvem as regiões sem ramificação da cadeia de manana (CUI *et al.*, 1995, LUNDIN & HERMANSSON, 1995 a,b, SUDHAKAR *et al.*, 1996, VIEBKE & PICULELL, 1996, GONÇALVES, 1997).

Com relação à presença quantitativa de galactose, ligada à cadeia principal de manose, considera-se que galactomananas possuem mais de 5% deste monossacarídeo (ASPINAL, 1982), entretanto, sabe-se que algumas sementes vegetais (espécie pertencente à família das *Palmae*) apresentam teores mais baixos de D-galactose, constituindo mananas verdadeiras (DEA & MORRISON, 1975, DEY, 1978).

A conformação de uma cadeia molecular de uma galactomanana, depende de vários fatores, mas é principalmente definida pelo tipo de ligação glicosídica entre as unidade monossacarídicas, os substituintes e as moléculas vizinhas (PRESTON, 1979).

I.3.4.2 Galactomananas modificadas

As galactomananas podem ser modificadas, quimicamente, para melhorar suas propriedades físico-químicas. Algumas vezes, a modificação pode ser feita em etapas, dando origem a um novo produto com propriedades diferentes do primeiro.

Os polissacarídeos, que ocorrem na natureza, são altamente hidroxilados, e normalmente contém três grupos com hidroxilas para cada unidade de açúcar na cadeia. Estes grupos, em conexão com o anel e átomos de oxigênio glicosídicos, produzem 5 "loc" para ligações de hidrogênio na cadeia polissacarídica.

Em conseqüência disto, a celulose e o amido foram bastante usados para produzir polissacarídeos derivatizados. As modificações químicas são feitas empregando-se éteres. Alguns exemplos destas foram introduzidas com fins comerciais, como as metil-hidroxipropilceluloses e os diéster fosfatos de amido.

Modificações químicas nos polissacarídeos neutros resultam em uma molécula com alterações nas suas propriedades químicas e físicas (WHISTLER & BeMILLER,

1993). No que diz respeito à modificação de um polissacarídeo para transformá-lo em uma matriz para ser usada em cromatografia é necessário preparar-se uma *matriz*, tipo gel com propriedades especiais para o seu emprego específico. Desta forma, na sua preparação é necessário utilizar um agente formador de ligações cruzadas (epicloridrina) que estabilizará a molécula. Um exemplo ilustrativo desse efeito é o do gel Sephadex (nome comercial de uma dextrana reticulada por reação com epicloridrina) um excelente gel com propriedades de resistência, estabilidade e insolubilidade (FLODIN, 1962).

A reticulação da dextrana ocorre pela interação com a epicloridrina, através de uma reação endotérmica onde a epicloridrina reage com dois grupos hidroxilas de duas cadeias diferentes, originando cadeias polissacarídicas ligadas por pontes glicerol 1-3 éter. Desta reação (40 °C por 24 horas e em seguida a 70 °C por mais 12 horas) resulta um gel alcalino que, após neutralização com HCl, eliminação das partículas finas e remoção de resíduos solúveis com água destilada, pode ser utilizado como matriz. O gel pode ainda ser desidratado com etanol e seco em estufa à vácuo a 70 °C.

Na reação, a epicloridrina pode ser hidrolisada em solução aquosa, o cloro removido e o epóxi monofuncional esterificar apenas um grupo hidroxila. A hidrólise também pode ocorrer após reação deste com a epicloridrina. Neste caso, verifica-se apenas uma substituição pelo glicerol e a ligação cruzada não é formada. A propriedade de intumescimento do gel formado é influenciada pela concentração da dextrana, sua massa molar e a relação massa dextrana-epicloridrina (DETERMANN, 1969).

A epicloridrina também é empregada para modificar amidos e, produzir um gel altamente granulado, resistente à desestruturação sob condições de autoclavagem.

O guar, quando reticulado pela epicloridrina, torna-se um material insolúvel a um baixo nível de reticulação (WHISTLER & BeMILLER, 1993). Isto é importante porque podemos utilizar este parâmetro para modificar a natureza química de algumas galactomananas, transformando-as em um material insolúvel constantemente empregado em técnicas de separação (cromatografia). APPUKUTTAN *et al.*, (1977), usando goma de guar tratada com epicloridrina, desenvolveram uma coluna de afi-

nidade cromatográfica, que isolou lectinas galactose específicas de uma fração proteica de *Ricinus communis*. A fração dissolvida em PBS foi aplicada na coluna de guar, equilibrada com a mesma solução. A seguir, a coluna foi lavada com PBS, para retirar as proteínas não retidas. As lectina retidas foram então eluídas com uma solução 0,1M de lactose.

As dextranas, antes da reação com a epícloridrina, são moléculas solúveis em água. Entretanto, a epícloridrina forma ligações cruzadas nas cadeias dos polissacarídeos, resultando em um material que, em contato com a água, intumescer e produz um gel com estrutura tridimensional, conforme Figura 2. O grau de intumescimento é decorrente do índice de ligações cruzadas (SPADARO & FONSECA, 1993).

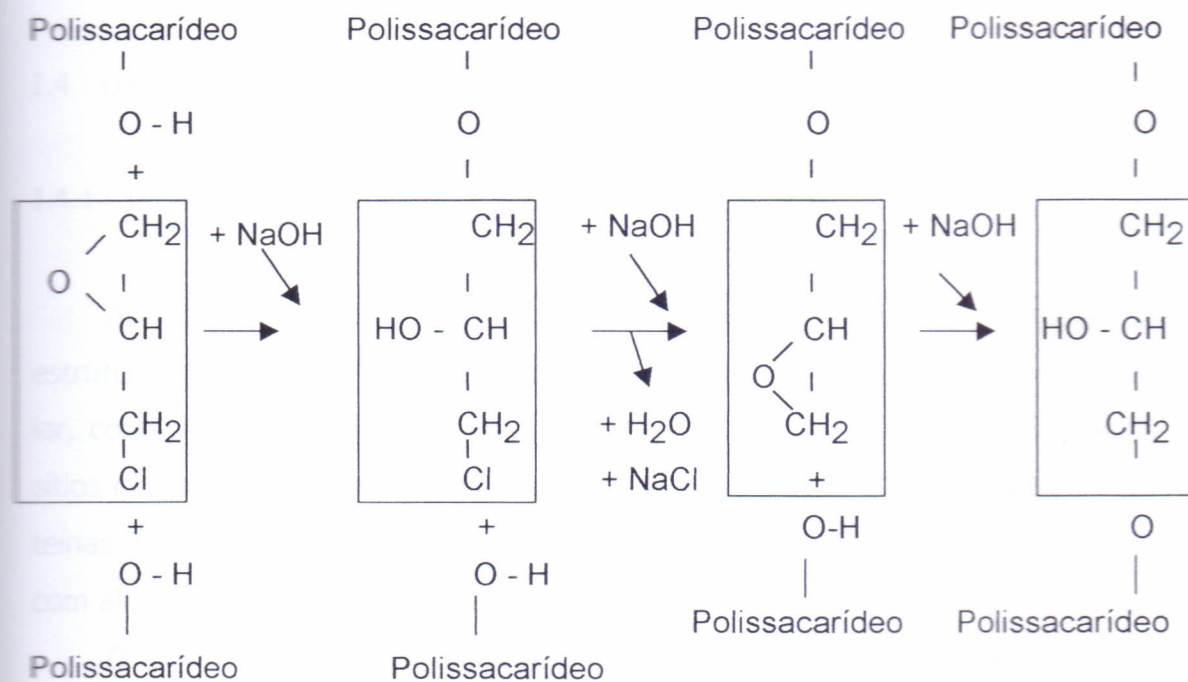


Figura 2. Reação de dextrana com epícloridrina na formação do gel Sephadex (SPADARO & FONSECA, 1993)

FUGITA *et al.*, 1975, foram os primeiros a usar um polissacarídeo natural, a goma arábica (*Acacia sp*), modificada e transformada em gel, como suporte de alta especificidade, na cromatografia de afinidade para isolar uma lectina galactose específica oriunda de uma cultura de *Streptomyces sp*. Em seguida, APPUKUTTAN *et*

al., 1977, usaram a goma de guar reticulada com epícloridrina para isolar uma lectina de *Ricinus communis*, com grande sucesso.

Observou-se também, que a capacidade de ligação é inversamente proporcional à quantidade das ligações cruzadas na malha do gel obtido.

Recentemente, a goma endospermica de *Adenantha pavonina* L. (carolina) reticulada pela epícloridrina foi empregada como suporte na cromatografia de afinidade, para isolar as lectinas ligantes de galactose de sementes de *Artocarpus incisa*, *Artocarpus integrifolia*, *Vaitarea macrocarpa*, *Abrus precatorius* e *Abrus pulchellus*. Esta matriz apresentou um grau significativo de resolução, na separação das moléculas (TAVARES, 1998).

I.4 Lectinas

I.4.1 Generalidades

As lectinas formam um grupo de proteínas heterogêneas, do ponto de vista estrutural, pois variam muito quanto ao tamanho, estrutura e organização molecular, contudo, apresentam em comum a capacidade de reconhecer e interagir com sítios contendo glicoconjugados. Assim a característica mais importante dessas proteínas é que elas se ligam a mono e oligossacarídeos de uma maneira reversível e com alta especificidade (LIS & SHARON, 1998).

O estudo das lectinas foi iniciado por STILLMARK (1888), quando verificou que extratos de sementes de algumas plantas aglutinavam hemácias e eram tóxicas para animais. Além disso, ele mostrou que a ricina aglutinava células epiteliais, hepáticas e leucocitárias. Na mesma ocasião, o autor encontrou propriedades semelhantes em extrato de outra semente, *Croton tiglium*, que apresentava, no entanto, especificidade diferente da ricina. Logo depois HELLIN (1891) relatou a presença de uma outra lectina tóxica em sementes de *Abrus precatorius*, que foi denominada de abrina.

O nome fitohemaglutininas foi criado por ELFSTRAND, (1897), para realçar a capacidade destas proteínas de aglutinar hemácias, e para diferenciá-las das aglutininas animais.

Nos anos seguintes várias outras lectinas foram isoladas, destacando-se a lectina tóxica de *Robinia pseudoacacia* (POWER & CAMBIER, 1889) que eles denominaram robina. Somente em 1907 é que foram descobertas as primeiras lectinas não tóxicas em sementes de *Phaseolus vulgaris*, *Vicia sativa*, *Lens culinares* e *Pisum sativum*, com atividade hemaglutinante (LANDSTEINER & RAUBITSCHKEK, 1907).

As investigações com as lectinas trouxeram diversos avanços para a imunologia, desde que PAUL EHRLICH (1891) reconhecido como o pai da imunologia moderna, descobriu o uso da ricina e abrina como modelos de imunógenos potentes para indução de anticorpos específicos, significativamente melhor que os das bactérias. Posteriormente, NOWEL (1960) demonstrou as propriedades mitogênicas das lectinas ao observar que a lectina de *Phaseolus vulgaris* era capaz de induzir a proliferação "In viro" de linfáticos.

GOLDSTEIN *et al.* (1980) definiram as lectinas como "proteínas (ou glicoproteínas) de origem não imune, ligantes a carboidratos, que aglutinam células e/ou precipitam glicoconjugados". Posteriormente, KOCOUREK & HOREJSI (1981), as definiram como "proteínas ou glicoproteínas" de origem não imune, ligantes de açúcar, que são desprovidas de atividade enzimática contra os açúcares aos quais se ligam e não requerem grupos hidroxilas glicosídicos livres nestes açúcares, para a sua ligação.

A mais recente e apropriada definição para as lectinas foi dada por PEUMANS & VAN DAMME em 1994, como "proteínas de origem não imune que possuem um ou mais sítios ligantes de carboidratos os quais, no caso de enzimas, não são requeridos para a atividade catalítica".

A especificidade por açúcar é, portanto, a principal característica das lectinas. A interação das lectinas com células é, assim, dependente da presença dos carboidratos apropriados na sua superfície. Assim, as lectinas ao interagirem com os carboidratos da superfície dos eritrócitos induzem ligações cruzadas entre as células, que

resultam na aglutinação, denominada tecnicamente de aglutinação celular ou hemaglutinação (LIS & SHARON, 1998).

Uma outra característica relevante, é o número de sítios ligantes a carboidratos. Desta forma as lectinas podem ser divididas em:

1. **Merolectinas:** lectinas que apresentam apenas um sítio ligante;
2. **Hololectinas:** lectinas com pelo menos dois sítios ligantes e, portanto, capazes de provocar aglutinação e
3. **Quimerolectinas:** lectinas que possuem um domínio ligante a carboidratos e outro domínio com atividade biológica, catalítica ou não, independente do primeiro.

Entre as merolectinas podemos destacar as lectinas de monocotiledôneas; entre as hololectinas podemos destacar as lectinas tradicionais; e entre as quimerolectinas estão as RIP_s tipo 2 e as quitinases classe I (PEUMANS & VAN DAMME, 1995).

As lectinas apresentam uma série de propriedades biológicas peculiares que as destacam das outras proteínas vegetais. Credita-se às lectinas um papel de reconhecimento em uma variedade de sistemas biológicos quer sejam microorganismos, plantas ou animais. Assim é que as lectinas, além de serem capazes de precipitar células e glicoconjugados, através de interação com a superfície da membrana, induzem uma série de modificações nas mesmas. Entre as principais propriedades apresentadas pelas lectinas podemos destacar sua capacidade de estimular a proliferação de linfócitos (LIS & SHARON, 1998).

Como muitas lectinas estão presentes em plantas utilizadas na alimentação tanto humana como animal, é necessário relevar os efeitos exercidos por estas quando presentes em alimentos da dieta. É importante notar, que as lectinas em geral apresentam resistência à degradação proteolítica no trato intestinal, e devido a esta propriedade, algumas, podem manifestar efeitos tóxicos, quando ingeridas cruas, ao interagir com células intestinais através de glicanos existentes na membrana do lúmen intestinal. Foi observado, que as lectinas de soja (SBA) e as lectinas de *Canavalia ensiformis* (Con A) interagem com intestino de ratos tratados com dieta rica em ferro, interferindo negativamente. Conseqüentemente, obtém-se um

balanço de significativa redução de absorção total deste íon pelo animal (TORRES-PINEDO, 1983, LIENER, 1986, PUSZTAI, 1986).

As lectinas ao reagirem com as células epiteliais podem interferir no processo de absorção intestinal, na proteção ou função secretora dessas células e ainda ocasionar respostas imunológicas sistêmicas (humoral e celular), influenciando na resolução do desempenho vital do organismo (BANWELL *et al.*, 1985, KILPATRICK *et al.*, 1985, HATA *et al.*, 1984, GRANT *et al.*, 1987 in PUSZTAI, 1986).

As lectinas ainda podem ocasionar efeitos biológicos alterados na balança hormonal. A maioria dos efeitos no metabolismo sistêmico, pode ser evidenciado através da mudança do nível de insulina circulante. Esta foi a experiência que BARDOEZ *et al.*, (1993), presenciou quando, alimentou ratos normais com PHA e detectou uma redução no nível de insulina, mudança simultânea na concentração do glucagon e no nível de glucocorticóide. Observou também que outros órgãos (músculo esquelético, coração, fígado, timo e baço) podem ser afetados pelos efeitos biológicos controversos dessas moléculas.

A presença generalizada de lectinas nas plantas e sua capacidade de distinguir diferentes tipos de células, poderia indicar um papel de defesa contra organismos patogênicos.

I.4.2. Ocorrência e localização

As lectinas são encontradas na maioria dos organismos (vírus, bactérias, plantas e animais). A maioria das lectinas estudadas, no entanto, foi isolada de plantas. Lectinas já foram detectadas em mais de 1000 espécies de plantas superiores, tendo sido estudadas principalmente, nas *Angiospermae* (*Monocotyledoneae* e *Dicotyledoneae*) dentre as quais se destacam as gramíneas e as leguminosas. As lectinas estão distribuídas em muitos tecidos vegetais (raízes, cascas, folhas, frutos, sementes, bulbos e rizomas), dependendo de cada vegetal. As sementes, no entanto, apresentam geralmente o maior teor destas proteínas, chegando em alguns casos a 10% das proteínas totais (WHITTAKER, 1969, BROEKAERT *et al.*, 1984, ETZLER, 1985,

VAN DAMME *et al.*, 1987a,b, DIAZ *et al.*, 1989, SHARON & LIS, 1989, KOSHTÉ *et al.*, 1990, LIS & SHARON, 1998).

As lectinas de leguminosas, as mais estudadas, embora demonstrem diferenças na especificidade por carboidratos, apresentam uma grande similaridade no que diz respeito às suas propriedades físico-químicas e isto é explicado pela considerável homologia na seqüência de suas cadeias polipeptídicas (MOREIRA, 1998).

Lectinas foram também encontradas em algas, principalmente as algas verdes, tais como *Codium tomentosum* (FABREGAS *et al.*, 1988), as vermelhas, de *Plumaria elegans* e *Ptilota serrata*, (ROGERS *et al.*, 1990), e as pardas, de *Fucus vesiculosus* (FERREIROS & CRIADO, 1983).

BENEVIDES *et al.*, (1996) verificaram a ocorrência de lectinas em algas brasileiras (*Solieria filiformis*), oriunda da praia de Pacheco (Caucáia) no Ceará, cuja massa molar é de 21,9 kDa, rica em aminoácidos ácidos e hidroxilados e pobre em aminoácidos básicos. Verificaram também que se tratava de uma glicoproteína, pois apresentava 1,5% de carboidrato, na sua estrutura.

Recentemente, foram encontradas também lectinas em algas marinhas vermelhas e brasileiras, (*Gracilaria domingensis* e *Gelidium pusillum*) oriundas da praia do Pacheco no Ceará, que apresentavam variações sazonais de sua atividade hemaglutinante e composição química (BENEVIDES *et al.*, 1999).

I.4.3. Especificidade das lectinas

A característica principal das lectinas é sua capacidade de interagir com carboidratos, de uma maneira reversível e específica. Esta especificidade foi inicialmente estudada por MAKELA (1957), que dividiu os monossacarídeos inibidores em quatro grupos conforme a configuração em C3 e C4 da cadeia piranosídica. Assim lectinas que ligam L-fucose (*Lotus tetragonolobus* e *Ulex europaeus*) pertenceriam ao grupo I, lectinas que ligam galactose e N-acetilgalactosamina (*Artocarpus incisa*, *Glycine max* e *Phaseolus lunatus*) pertenceriam ao grupo II e lectinas ligantes de manose e glucose (*Canavalia ensiformis*, *Cratylia floribunda*, *Dioclea grandiflora*, *Lens culinaris* e *Pisum sativum*) pertenceriam ao grupo III. Atualmente, as lectinas são classifica-

das em um número limitados de grupos, com uma divisão um pouco mais fina que os grupos de Makela. Assim, nós temos os grupos das lectinas específicas por glicose/manose, das lectinas específicas por galactose/N-acetilgalactosamina, daquelas específicas por N-acetil-glucosamina, as específicas por L-fucose, as específicas por ácido siálico e as específicas por oligossacarídeos complexos (MOREIRA, 1998).

Segundo LIS e SHARON, 1998 com base na sua especificidade, as lectinas são classificadas em 5 grupos, de acordo como os monossacarídeos pelos quais elas exibem grande afinidade: manose, galactose/N-Acetilgalactosamina, N-Acetilglucosamina, fucose, e ácido N-acetilneuramínico (todos os açúcares de configuração D com exceção da L-fucose).

As lectinas podem ainda ser classificadas considerando os oligossacarídeos (neste caso freqüentemente se ligam a di, tri e tetrassacarídeo). Nestes grupos encontram-se lectinas que possuem a mesma especificidade, mas podem diferir em suas afinidades por diferentes oligossacarídeos (SHARON & LIS, 1998).

A afinidade das lectinas por oligossacarídeos, pode ser influenciada pela forma dos compostos, que possuem moléculas flexíveis com liberdade de rotação em torno de ligações glicosídicas, inerentes à molécula (SHARON & LIS, 1998).

Na determinação da especificidade por carboidratos, faz-se uso de um ensaio de inibição por haptenos. A especificidade da lectina é determinada através da reação de diferentes monossacarídeos, oligossacarídeos e/ou glicopeptídeos com esta proteína, inibindo a hemaglutinante ou a precipitação de polissacarídeos ou (glico-conjugados) pela lectina.

A interação específica das lectinas com monossacarídeos, explica a especificidade das mesmas por hemácias, quando sabemos que os determinantes de grupos sanguíneos são oligossacarídeos que apresentam terminais glicanos diferentes.

Segundo WU *et al.*, 1988, a associação que ocorre entre a lectina e seu açúcar específico, é o resultado de uma perfeita complementariedade configuracional e estrutural dessas moléculas.

Muitas lectinas são tolerantes à variações no carbono 2 do monossacarídeo ao qual se ligam. Por exemplo, lectinas manose específicas, usualmente reagem embora em menor proporção, com o N-Acetil-glucosamina, como ocorre com algumas

lectinas do grupo III (GOLDSTEIN & PORETZ, 1986, SHARON & LIS, 1989, SHARON & LIS, 1990). Contrariamente VAN DAMME *et al.*, 1991, observaram que as lectinas isoladas dos bulbos de *Amaryllidaceae* e *Alliaceae* possuem especificidade exclusiva por manose.

Algumas lectinas possuem variações a nível de carbono 3, umas toleram tal mudança outras não. Muitas lectinas tem afinidade por moléculas de N-Acetil-galactosamina, mas também reagem com galactose (HAMMARSTROM, *et. al.*, 1977). De outra forma existe um grupo de lectinas que reagem com galactose, mas reagem com grau variável com moléculas de N-Acetil-galactosamina, é o caso da lectina de *Ricinus communis* (NICHOLSON & EPSTEIN., 1991).

SHARON & LIS, (1990), reconheceram que modificações na configuração do carbono 4 são cruciais, já que lectinas específicas por glucose/manose não regem com galactose e vice-versa.

Algumas lectinas são específicas para uma determinada configuração enquanto que outras interagem igualmente com ambas as configurações anoméricas. Exemplo respectivos: lectina de *Lotus tetragonolobus* possui especificidade para anômeros α de manose e glucose, galactose e L-fucose enquanto que a lectina de *Ricinus communis* é quase desprovida de especificidade anomérica (PEREIRA & KABAT, 1974).

A variedade de utilidade e o valor indiscutível da propriedade da especificidade dessas moléculas estimulam propostas científicas que delegam às mesmas a capacidade considerável de uma ferramenta de detecção e de identificação de grupos sanguíneos e isolamento de microorganismos por afinidade, além de estimulação mitogênica de células imunes, determinação de tipos de carboidratos em solução, purificação de glicoproteínas e fracionamento celular, bem como ainda uma ferramenta de identificação para os taxonomistas (FREITAS *et al.*, 1997).

I.4.4. Isolamento de lectinas

O isolamento de lectinas, envolve vários métodos de separação e obviamente o descarte de muitas substâncias consideradas contaminantes. Inicialmente o trabalho se inicia pela fragmentação física do material de modo a liberar as proteínas do interior das células. A seguir, dependendo do material de partida, diversos métodos

podem ser empregados de modo a eliminar moléculas não protéicas. Em seguida, o material é submetido a extração com uma solução tampão ou salina.

O sucesso do isolamento de lectinas depende da escolha do processo cromatográfico a ser utilizado. Até a década de 1970, o isolamento de lectinas seguia a metodologia padrão para o fracionamento convencional de proteínas, com cromatografia de troca iônica e filtração em gel.

Com a descoberta da cromatografia de afinidade por AGRAWAL & GOLDSTEIN (1965), quando isolaram a Con A em coluna de Sephadex, hoje praticamente todo o processo de isolamento de lectinas depende da cromatografia de afinidade e ocasionalmente de outro método convencional auxiliar. O esquema de fracionamento a ser seguido depende da especificidade da lectina por açúcares. Em muitos casos matrizes estão disponíveis comercialmente, como o Sephadex, que é uma dextrana (MOREIRA *et al.*, 1983 a e b) e a Sepharose que é uma agarose. Em outros casos são empregadas colunas de mono e oligossacarídeos e glicoproteínas ligados à matrizes estáveis, como fetuina-Sepharose (PINTO, 1987) e mais recentemente, tem se desenvolvido bastante o uso de gomas naturais, após tratamento de formação de ligações cruzadas com epicloridrina (MOREIRA *et al.*, 1997).

Muitos polissacarídeos glicoconjugados naturais, insolúveis, são adsorventes sensíveis e utilizados para o isolamento das lectinas. Eles são geralmente baratos e nem sequer precisam ser quimicamente homogêneos, embora precisem estar completamente livres de substâncias que possam ser liberadas por lixiviação, durante a cromatografia. Assim diversos glicoconjugados naturais têm sido usados, entre eles: estromas de células vegetais (LUCK *et al.*, 1992), estromas humanos glutarizados (MOREIRA & OLIVEIRA, 1983), quitina, (WHITMORE, 1992), oligossacarídeos solúveis, tratados com agentes formadores de ligação cruzadas, como a epicloridrina ou divinilsulfona (MOREIRA *et al.*, 1998), mono e oligossacarídeos imobilizados em matrizes gelatinosas hidrofílicas, glicoconjugados imobilizados em matrizes gelatinosas hidrofílicas.

Numa etapa de pré purificação é comum precipitar-se proteínas indesejáveis do extrato bruto por precipitação ácido ou salina (pelo uso do sulfato de amônio). Na etapa seguinte, já com o material pré-purificado pode-se utilizar processos de

isolamento mais refinados, especialmente os cromatográficos, como a cromatografia de afinidade, que isola as lectinas conforme a sua especificidade por carboidratos.

Diversas matrizes têm sido empregadas na cromatografia de afinidade para isolamento de lectinas. As matrizes mais empregadas têm sido Sephadex (MOREIRA *et al.*, 1993).

Um exemplo é ilustrado pelo isolamento da lectina de *Dioclea altíssima*, que envolveu duas etapas de purificação. Na primeira, o extrato bruto foi fracionado pela adição de diferentes quantidades de sulfato de amônio. Na Segunda etapa, a fração lectínica foi localizada no precipitado entre 50 a 70% de saturação com o sal e denominada F (50-70) . Esta foi solubilizada com solução salina contendo Ca^{2+} e Mn^{2+} , e então cromatografada em coluna de Sephadex G-50. A lectina, retida na matriz, foi eluída com solução de glucose 0,1 M, correspondendo 1,42% do peso seco da semente (MOREIRA *et al.*, 1997).

Apesar de estudos intensos terem sido desenvolvidos no isolamento de novas lectinas, é ainda muito importante procurar novas fontes, principalmente entre os vegetais usados como fontes alternativas de alimento. Recentemente dez espécies de algas pertencentes às famílias *Rhodomelaceae*, *Gelidiaceae*, *Hipneaceae*, *Solieriaceae* e *Gracilariaceae* foram estudadas do ponto de vista nutricional e toxicológico, tendo sido mostrado que todas apresentaram um alto teor de proteínas, mas também um considerável teor de toxicidade (BENEVIDES *et al.*, 1998).

Evidente contribuição também foi dada por BENEVIDES *et al.*, (1998), quando isolou uma lectina da alga vermelha marinha *Enantiocladia duperreyi* do litoral cearense usando uma combinação de técnicas (precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica em DEAE-celulose e cromatografia de afinidade α -lactose-agarose). Esta lectina apresenta uma massa molar aparente de 24.700 Da e aglutina preferencialmente hemácias do grupo O, é inibida por açúcares do tipo fucose, galactose e seus derivados e também pela mucina de estômago de porco. Fisicoquimicamente, apresenta-se estável com relação à variação de temperatura.

Recentemente, foi isolada uma lectina de alga vermelha do mar denominada *Amansia multifida*, (amansin) Lamoroux, cujo peso molecular foi de 26.900 Da. Esta lectina foi isolada por cromatografia de troca iônica em DEAE celulose, seguida de

cromatografia de interação hidrofóbica (HIC) em Sepharose-Phenyl ou Sepharose-avidina CL-4B e demonstrou ser uma proteína rica em unidades de aminoácido do tipo prolina, glicina e ácido aspártico, entretanto com baixo teor de resíduos de histidina e fenilalanina. Usando-se métodos de eletroforese (SDS-PAGE) detectou-se uma única banda protéica com Mr de 24.500 Da, indicando que a lectina é um monômero, mas através da focalização isoeletrica foi constatada a presença de 5 isolectinas (COSTA *et al.*, 1999).

Na atualidade, talvez por causa da infinidade de aplicações biotecnológicas que esta proteína potencializa, verificamos que existe um grande interesse do meio científico em estudá-las amplamente na natureza, abrangendo tanto o reino vegetal quanto o animal.

Além das matrizes encontradas comercialmente, tem sido muito utilizadas as preparadas a partir de polissacarídeos naturais, entre os quais se destacam as gomas de sementes de leguminosas (APPUKUTAN *et al.*, 1977, MOREIRA *et al.*, 1997, TAVARES, 1998).

1.4.5 Utilização das lectinas

Desde que as lectinas foram descobertas, um vasto espectro de possíveis aplicações vem sendo sugerido para essas moléculas, tanto na bioquímica como na imunologia e áreas afins. A abrangência aplicativa desta proteína, envolve investigação de estruturas de carboidratos complexos de superfície de células, bactérias e vírus; tipagem sanguínea; isolamento de sub populações de linfócitos, tipagem de parasitos e até mesmo tem sido utilizadas como defensivos agrícola.

Na agricultura, já foram utilizadas como nematicidas para combater ataque de parasitos. A Con A reage com os receptores celulares dos nematóides que infectam as raízes dos tomateiros, desta forma neutraliza a ação dos mesmos (MARBAN-MENDONZA *et al.*, 1987).

As lectinas de sub-tribo de *Diocleinae*, apesar de serem todas D-glucose/D-manose específicas, quando usadas como inseticidas, sugerem diferentes intensidades inseticida para ninfas *Nilaparvata lugens* (GRANGEIRO, 1996).

As lectinas podem ser utilizadas em métodos de separação, utilizando-se a propriedade da bioespecificidade na cromatografia de afinidade, para purificar e isolar moléculas biológicas como receptores hormonais, fatores de crescimento, neurotransmissores, imunoglobulinas e outros (HEDO *et al.*, 1981; HELM & FROESSE, 1981).

Na bioquímica clínica, as lectinas foram usadas para reconhecer por especificidade receptores de grupos sanguíneos, com grande sucesso. Desta forma, a lectina de *Phaseolus limensis* interage especificamente com receptores de hemácias consideradas do Grupo A, bem como *Lotus tetragonolobus* e *Anguilla anguilla* são capazes de reconhecer as do Grupo O (LIS & SHARON, 1986).

As lectinas, são glicoproteínas que podem reagir especificamente com receptores celulares de natureza polissacarídica, e isto é importante porque elas podem ser utilizadas como uma ferramenta de acompanhamento a nível molecular, de uma modificação celular quando esta sofre uma transformação e se torna maligna, fato importante na área da oncologia (FREEMAN, 1983, FISCHER *et al.*, 1994).

Na parasitologia, as lectinas podem ser empregadas para reconhecer por especificidade a nível molecular algumas estruturas de superfície de membrana do parasito e até mesmo o seu estágio de amadurecimento, visto que conforme o desenvolvimento do parasito, este apresenta estruturas glicídicas diferentes na superfície da membrana celular. A lectina de *Ricinus communis* e a de *Canavalia ensiformis* reagem especificamente com formas amastigotas e promastigotas de *Leishmania brasiliensis* (PARSONS & SUBJECK, 1972).

INBAR e CHET (1997) estudaram o emprego das lectinas como ferramentas biológicas moleculares, no que diz respeito a elucidar o mecanismo de interação entre agentes do biocontrole e seus hospedeiros abrangendo interação em sistemas: parasito-nematóides, micoparasitos vegetais necrotróficos e biotróficos, e fungos patogênicos.

Muitos esclarecimentos tem sido acrescentados, com relação a essa proposta de emprego das lectinas, em uma recente revisão que estuda o fenômeno da especificidade na interação biomolecular entre e fungos e seus hospedeiros (MANOCHA,

1990, MANOCHA & SAHAI, 1993, TUNLID *et al.*, 1992, GARETH JONES, 1994, MANOCHA & CHEN, 1990).

A lectina apresenta um importante papel no reconhecimento e na especificidade de interação entre agentes do biocontrole (micoparasitas) e seus hospedeiros (INBAR & CHET, 1997).

A lectina de *Helianthus tuberosos* é considerada manose específica da família de lectinas do tipo jacalina. Esta lectina é altamente específica por manose-manose com ligações α (1 \rightarrow 3) ou α (1 \rightarrow 2), carboidratos que são particularmente abundantes em glicoconjugados expostos na superfície de vírus, bactérias e fungos. Desta forma esta lectina apresenta função de defesa contra patógenos e predadores (BOURNE *et al.*, 1999).

O fenômeno da interação de lectinas com células sugere a possibilidade de isolar alguns microorganismos patogênicos, pois estes comumente apresentam receptores que interagem especificamente com algumas dessas glicoproteínas. A base desse reconhecimento é a participação de moléculas que parecem apresentar pares de estruturas complementares entre os dois reagentes (LIS & SHARON, 1998).

Recente desenvolvimento no campo da glicobiologia de vertebrados, enfatiza o papel das lectinas como reagentes histoquímicos acopladas à métodos sensíveis de detecção para detectar mudanças químicas de açúcares de gliconjugados em modelos experimentais, comumente empregados na histologia e patologia (DANGUY *et al.*, 1998).

YOSHIDA *et al.*, 1999, utilizaram a cromatografia de afinidade seqüencial com as lectinas de *Canavalia ensiformis* (glucose específica) e a lectina de germe de trigo WGA (N-acetil-glicosamina) para revelar a potencialidade oncogênica em tecido humano (do córtex renal) nos primórdios da diferenciação celular.

R1233807.

II. HIPÓTESE DE TRABALHO

II. HIPÓTESE DE TRABALHO

A goma endospermica de *Parkinsonia aculeata* é uma galactomanana formada por uma cadeia principal de manose substituída aleatoriamente por unidades de galactose. Assim sendo, pode ser utilizada como matriz de afinidade para o isolamento de lectinas ligantes de galactose.

III.1	III.1.1	III.1.1.1	III.1.1.2	III.1.1.3	III.1.1.4	III.1.1.5	III.1.1.6	III.1.1.7	III.1.1.8	III.1.1.9	III.1.1.10	III.1.1.11	III.1.1.12	III.1.1.13	III.1.1.14	III.1.1.15	III.1.1.16	III.1.1.17	III.1.1.18	III.1.1.19	III.1.1.20	III.1.1.21	III.1.1.22	III.1.1.23	III.1.1.24	III.1.1.25	III.1.1.26	III.1.1.27	III.1.1.28	III.1.1.29	III.1.1.30	III.1.1.31	III.1.1.32	III.1.1.33	III.1.1.34	III.1.1.35	III.1.1.36	III.1.1.37	III.1.1.38	III.1.1.39	III.1.1.40	III.1.1.41	III.1.1.42	III.1.1.43	III.1.1.44	III.1.1.45	III.1.1.46	III.1.1.47	III.1.1.48	III.1.1.49	III.1.1.50	III.1.1.51	III.1.1.52	III.1.1.53	III.1.1.54	III.1.1.55	III.1.1.56	III.1.1.57	III.1.1.58	III.1.1.59	III.1.1.60	III.1.1.61	III.1.1.62	III.1.1.63	III.1.1.64	III.1.1.65	III.1.1.66	III.1.1.67	III.1.1.68	III.1.1.69	III.1.1.70	III.1.1.71	III.1.1.72	III.1.1.73	III.1.1.74	III.1.1.75	III.1.1.76	III.1.1.77	III.1.1.78	III.1.1.79	III.1.1.80	III.1.1.81	III.1.1.82	III.1.1.83	III.1.1.84	III.1.1.85	III.1.1.86	III.1.1.87	III.1.1.88	III.1.1.89	III.1.1.90	III.1.1.91	III.1.1.92	III.1.1.93	III.1.1.94	III.1.1.95	III.1.1.96	III.1.1.97	III.1.1.98	III.1.1.99	III.1.1.100
-------	---------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	-------------

III. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

III. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

Para testar a hipótese de trabalho, foi empregada a seguinte estratégia experimental:

- III.1. Isolar o endosperma da semente da planta;
- III.2. Fracionar os polissacarídeos do endosperma;
- III.3. Estudar parcialmente a estrutura dos polissacarídeos;
- III.4. Determinar a viscosidade e a massa molecular dos polissacarídeos;
- III.5. Estudar a melhor condição de reticulação dos polissacarídeos com epícloridrina;
- III.6. Estudar a eficiência das matrizes obtidas para isolar lectinas galactose específicas, utilizando como modelo as lectinas de *Artocarpus incisa*, *Artocarpus integrifolia* e *Abrus precatorius*;
- III.7. Selecionar a matriz mais eficiente para isolar lectinas galactose específicas e compará-la com as galactomananas de *Cyamopsis tetragonolobus* (guar) e *Adenanthera pavonina* (carolina), reticuladas nas mesmas condições;

IV.

IV.1

IV.2

IV.3

IV.2

IV.2.1

IV.2.2

IV.2.3

IV. MATERIAL

IV. MATERIAL

IV.1. Sementes vegetais

IV.1.1. Sementes de *Parkinsonia aculeata*, foram coletadas no Município de Itapipoca no Estado do Ceará. O material botânico foi identificado por Afrânio Gomes Fernandes do Herbário Prisco Bezerra.

IV.1.2. Outras sementes: *Artocarpus integrifolia*, *Artocarpus incisa*, *Abrus precatorius*, coletadas em diversos municípios do Estado do Ceará, foram obtidas pelo grupo de pesquisadores do Laboratório de Lectinas e Glicoconjugados (LABLEC) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará.

IV.2. Outros materiais

IV.2.1. Hemácias. Hemácias de coelho foram obtidas de animais mantidos no biotério do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará.

IV.2.2. Gomas endospérmicas. Goma de *Cyamopsis tetragonolobus* (guar) foi obtida de Sigma Chemical Co. (St. Louis, EUA). Goma endospérmica de *Adenanthera pavonina* (carolina) foi gentilmente cedida pelo grupo de pesquisadores do Laboratório de Lectinas e Glicoconjugados (LABLEC) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará.

IV.2.3. Reagentes. Coomassie Brilliant Blue G-250, epicloridrina, TEMED, acrilamida, N,N' metilenobisacrilamida e albumina sérica bovina (BSA) foram obtidas de Sigma Chemical Co. (St. Louis, EUA), Dimetil sulfóxido (DMSO), ácido trifluoracético (TFA), Dodecil sulfato de sódio (SDS) e β -mercaptoetanol de E. Merck, (Dormstadt, Alemanha).

V. MÉTODOS

V. MÉTODOS

V.1. Caracterização morfológica das sementes de *Parkinsonia aculeata*

Uma amostra (50 sementes maduras) de *P. aculeata*, foi caracterizada avaliando-se comprimento e diâmetro, através da medida individual, com um paquímetro e massa por pesagem individual em balança analítica. A participação percentual dos seus constituintes (casca, endosperma e cotilédones + eixo) foi calculada a partir de 10 g de sementes, por separação mecânica, secagem, e pesagem em balança analítica.

V.2. Isolamento do endosperma bruto

Uma amostra (100 gramas) de sementes foi submetida à fervura (10 min) com água destilada e deixada em refrigerador a -7°C , durante uma noite. O endosperma foi, posteriormente, separado e seco em liofilizador. O material obtido foi, em seguida, reduzido a partículas finas e acondicionado em recipientes de vidro hermeticamente fechado, para uso posterior.

V.3. Isolamento de polissacarídeos do endosperma bruto

Os polissacarídeos de endosperma *P. aculeata* foram obtidos por extração sequencial, seguindo-se o esquema mostrado na Figura 3.

Inicialmente foi feita extração com água fria (10°C), seguida por extração a 25°C e a quente (80°C). A quarta extração foi feita com uma solução de NaOH 1 mol/L a 25°C . Após cada extração, o resíduo era re-extraído com a mesma solução, por mais duas vezes, para evitar contaminação das frações. Os sobrenadantes de cada extração, após serem reunidos eram precipitados com etanol 1:1 (v/v) e o precipitado obtido, desidratado com mais etanol absoluto e levado à secagem completa em estufa a vácuo (EDG modelo, COM 5P), com temperatura controlada a 25°C .

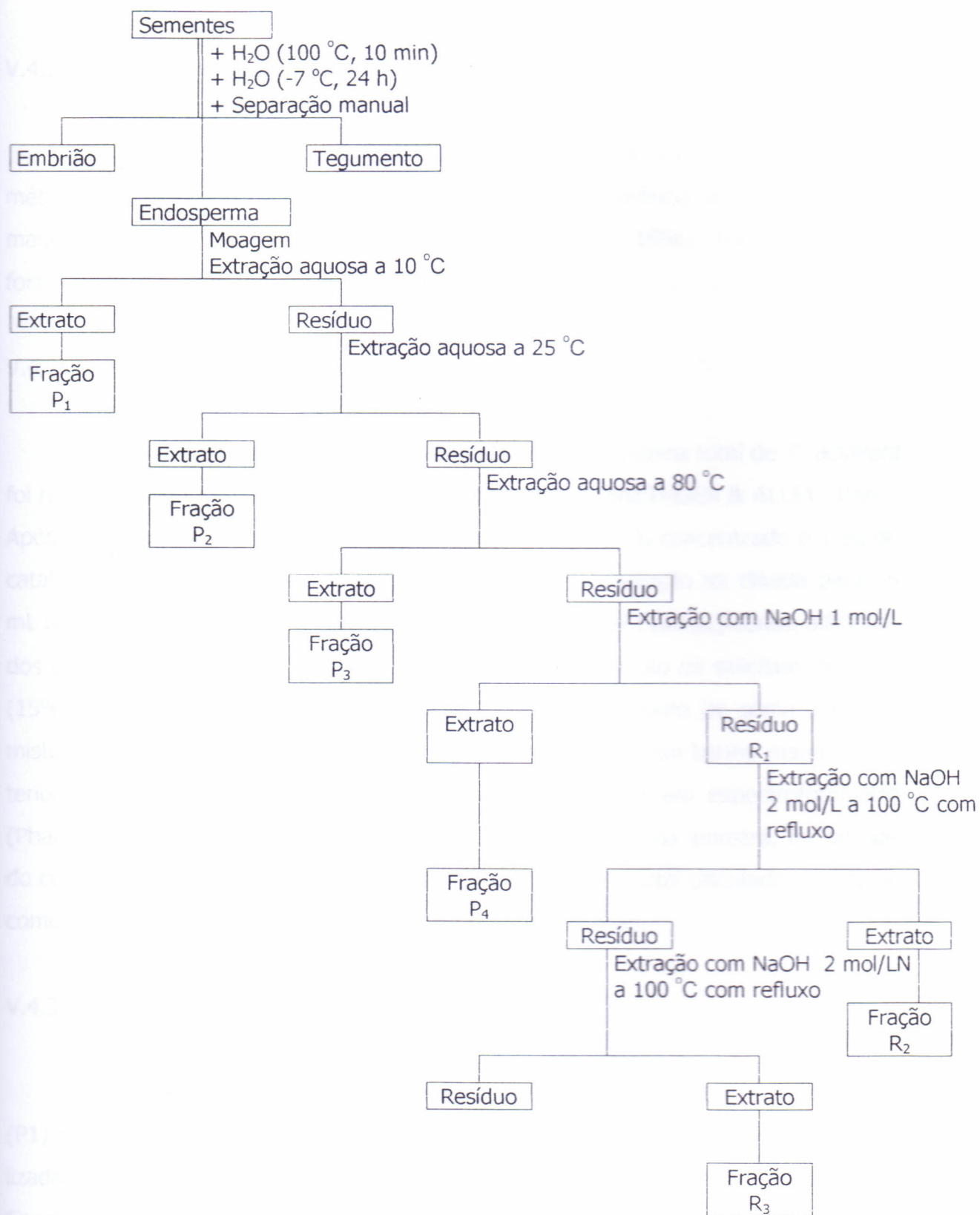


Figura 3. Fluxograma de fracionamento das galactomananas endospérmicas de *Parkinsonia aculeata*.

V.4. Determinação dos teores dos constituintes químicos dos endospermas

V.4.1. Carboidratos totais

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

V.4.2. Nitrogênio total

A dosagem de nitrogênio total na amostra de endosperma total de *P. aculeata* foi realizada segundo método de Kjeldahl adaptado por (BAETHGEN & ALLEY, 1989). Após digestão das amostras (100 mg) com 1,5 mL de H₂SO₄ concentrado e 1,1g do catalisador (K₂SO₄:CuSO₄.5H₂O:Se, 100:10:1 m:m:m), a solução foi diluída para 25 mL com água destilada. A uma alíquota desta solução final (100 µL) foram adicionados 0,9 mL de diluente, 5,5 mL de tampão e 4 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 min a 37 °C, em banho maria e posteriormente teve sua absorvância determinada a 650 nm em espectrofotômetro (Pharmacia, modelo LKB Ultrospec III). O teor de nitrogênio na amostra, foi calculado com o auxílio de uma curva padrão e o teor de proteína total calculado usando-se como fator protéico para vegetais o índice numérico de 6,25.

V.4.3. Proteínas solúveis totais

A presença e a dosagem quantitativa de proteína na fração polissacarídica (P1) foram feitas pelo método de HARTREE (1972). A curva padrão comparativa utilizada, foi de BSA 100 µg/mL e a leitura colorimétrica, foi feita em espectrofotômetro Spectrum 20, a 490 nm.

V.4.4. Umidade

Amostras de 1g de endosperma ou semente total foram pesadas em pesa filtro previamente limpos, tarados, secos e levados a estufa a 110°C por 24 horas ininterruptas. Após esse tempo, o material foi mantido em dessecador, até atingir a temperatura ambiente, e pesado em balança analítica. Esse processo foi repetido até completa estabilização do material (peso constante). O teor de umidade do material foi calculado pela diferença encontrada entre as massas inicial e final, e expresso em percentagem.

V.4.5. Cinzas

Amostras (1g de endosperma e semente total) de *P. aculeata* foram incineradas em cadinhos de porcelana, previamente tarados e colocadas em mufla a 600°C, após o que foram deixadas em dessecador até atingir a temperatura ambiente, quando foram pesadas. O teor de cinzas foi calculado pela diferença encontrada entre as massas inicial e final e expresso em percentagem.

V.5. Análise estrutural dos polissacarídeos de sementes de *Parkinsonia aculeata*

V.5.1. Hidrólises ácidas

Os polissacarídeos (10 mg) foram submetidos a hidrólise ácida total com ácido trifluoracético (TFA) e ácido sulfúrico (H₂SO₄), obedecendo às seguintes condições experimentais:

- a. Hidrólise com uma solução de ácido trifluoracético 1 mol/L durante 5hs, em banho de água fervente, e em ampolas de hidrólise hermeticamente fechadas (Kimax). No final do experimento, o excesso de ácido residual foi eliminado por evaporação.

- b. Hidrólise com uma solução de ácido sulfúrico a 72% (p/p), durante uma hora, em banho de gelo, (pré-hidrólise), seguido de diluição da mistura, para 8% com água destilada, deixada em banho de água fervente por mais 5 horas. O ácido residual, foi neutralizado com carbonato de bário, resultando em um sal insolúvel que posteriormente foi eliminado por filtração.

V.5.2. Análise dos hidrolisados

V.5.2.1. Cromatografia em papel

A cromatografia foi realizada pelo método de desenvolvimento ascendente, em papel Whatman n.1 no sistema de solvente: benzeno : n-butanol : piridina : água (1:5:3:3 v/v).

Os padrões de açúcares usados foram: Xilose, Arabinose, Ramnose, Galactose, Manose e Ácido galacturônico.

Usou-se como reagente revelador o nitrato de prata alcalino.

V.5.2.2. Tratamento dos polissacarídeos hidrolisados (Acetilação e redução)

Os produtos de hidrólises dos polissacarídeos foram reduzidos com 10 mg de boridreto de sódio a 25 °C, por 2 horas (SELVENDRAN *et al.*, 1979). Em seguida foi utilizado ácido acético para eliminação deste reagente catalisador, assim como a retirada dos íons sódio com a resina (DOWEX 50W-X 8-H⁺). As amostras foram filtradas, e evaporadas com o auxílio do evaporador rotatório e, em seguida lavadas com metanol (3 vezes) para uma completa eliminação do borato de metila produzido anteriormente.

Os produtos reduzidos foram então submetidos ao processo de acetilação com anidrido acético e piridina (1:1 v/v), à temperatura ambiente por 16 horas. A reação foi interrompida pela adição direta de gelo, em seguida, foram extraídos com clorofórmio e o excesso de piridina foi eliminado com uma solução de sulfato de cobre a 5%. Nesta etapa, o material foi lavado com água destilada, sendo evaporado,

e resultando assim, em alditóis acetilados, forma química que pode ser usados na cromatografia líquida gasosa (CG).

V.5.2.3. Cromatografia líquida gasosa (CG)

Este método foi empregado para determinar o conteúdo quantitativo e qualitativo de moléculas de monossacarídeos neutros na amostra (alditóis acetatos) assim como as suas ligações glicosídicas, após metilação, em cromatógrafo líquido gasoso Modelo HP-5280 II, equipado com coluna capilar DB-225, e um detetor de ionização de chama, usando-se o nitrogênio como gás de arraste. A temperatura usada para a operação foi de 250 °C Com relação aos alditóis acetatos parcialmente metilados, foram analisados por gc-ms em cromatógrafo líquido gasoso da VARIAN, modelo 3300 acoplado a um espectrofotômetro de massa FINNIGAN TRAP, Modelo 410, com colunas capilares OV-225, a 50 °C programada a 1 °C por minuto até 220 °C, usando o hélio como gás de arraste.

V.5.3 Análise da fração 1

V.5.3.1. Ressonância magnética nuclear de carbono treze (RMN ¹³C)

A amostra (40 mg) da fração 1 foi solubilizada em água deuterada e solução de hidróxido de sódio. As análises foram feitas em espectrômetro Bruker AC-300 (100 MHz) a 80 °C.

V.5.3.2. Oxidação com periodato

Amostra (100 mg) da fra Twenty-two points, plus triple-word-score, plus fifty points for using all my letters. Game's over. I'm outta here.ção 1 foi solubilizada em 20 mL de água destilada e submetida à oxidação com m-periodato de sódio (20 mL) de uma solução 0,1 mol/L ficando com uma concentração final de 0,05mol/L em 40mL. Essa reação de oxidação foi programada para dois ciclos e obedeceu as se-

guintes condições: completa ausência de luz, temperatura ambiente e agitação constante com agitador magnético, durante, 120 horas.

Após uma semana foi adicionado 0, 5mL de etileno glicol para finalizar a reação e consumir o m-periodato de sódio excedente. O material foi então dialisado contra água corrente, reduzido com boroidreto de sódio, novamente dialisado, e só então foi concentrado em evaporador rotatório e foi retirada uma amostra correspondente a 1/4 do volume total para ser analisada em CG na forma de alditóis acetatos. Esta etapa foi considerada o 1^o ciclo (ASPINALL, 1982).

Com o restante da amostra foi repetido todo o processo anterior de oxidação, considerando-se assim o segundo ciclo e aí foi retirada uma segunda alíquota (1/3) do volume total, que também foi preparada para análise em CG, nas mesmas condições.

V.5.3.3 Metilação

Uma amostra correspondente a 30 mg da fração 1 da semente de *P. aculeata* foi submetida ao processo de metilação de acordo com o método definido por CIUCANU & KEREK (1984). A amostra foi primeiramente seca em ampola com pentóxido de fósforo a vácuo, depois solubilizada em 1 mL de dimetil sulfóxido (DMSO). Em seguida, foi adicionado 50 mg de NaOH pulverizado e agitou-se a mistura por 5 minutos em Vortex, só então adicionou-se 0,5 mL de iodeto de metila (CH_3I), homogeneizando-se em aparelho de Vortex por 10 minutos. Em seguida, adicionou-se ácido acético a frio (gelo) para neutralizar-se o sistema.

Os produtos metilados foram extraídos com clorofórmio, e lavados exaustivamente, com água destilada. O processo foi então novamente repetido, para garantir-se uma metilação satisfatória na amostra.

Após metilação o material foi monitorado por análise no infravermelho (IR). O material foi preparado, (hidrólise de SAEMAN, reduzido e acetilado) para ser posteriormente analisado por cromatografia líquida gasosa acoplada à espectroscopia de massa.

V. 6. Análise viscosimétrica

Para as análises viscosimétricas, as soluções de polissacarídeos (0,25-2,0g/L) foram preparadas em água destilada e/ou soluções NaCl 0,1 mol/L, a temperatura ambiente, sob agitação em agitador magnético por 16 horas.

As medidas de viscosidade para a amostra de galactomanana do endosperma de sementes de *P. aculeata* foram realizadas em reômetro BROOKFIELD, modelo LVDV-III, utilizando os cones SC4-18, CP40 e o adaptador ULA. Para medidas no sistema capilar foi utilizado o viscosímetro do tipo UBBELOHDE (capilar 0,5mm).

Os parâmetros viscosimétricos para os sistemas medidos através do reômetro foram calculados pelo programa Rheocalc v 1.0. O controle da temperatura foi realizado com um banho de água circulante termostatisado da marca BROOKFIELD, modelo TC-500.

Nas análises realizadas a 20 °C, foram obtidos os valores de viscosidade absoluta das soluções e dos solventes, a partir das quais pode se obter o valor de viscosidade reduzida (η_{sp}/c) e por determinação gráfica (Figura 4) obteve-se o valor de viscosidade intrínseca.

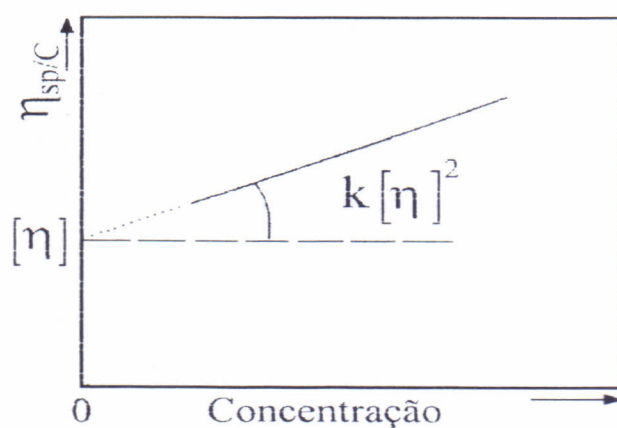


Figura 4: Determinação gráfica da viscosidade intrínseca

A constante de Huggins foi determinada aplicando-se a equação

$$\eta_{\text{red.}} = \{ [\eta] + k' \cdot (C \cdot [\eta])^2 \}$$

onde: **K'** = constante de Huggins

C = concentração

[η] = viscosidade intrínseca (HUGGINS, 1942).

V.7. Determinação da massa molecular

As medidas de M_w foram efetuadas através de um aparelho de difusão de luz, com um detetor a laser multiângulos, modelo DAWN DSP, Wyatt Technology, acoplado a um refratômetro diferencial (RI) modelo Waters 2410, ambos acoplados a saídas do CGP (colunas de ultrahidrogel 2000/500/250/120).

As colunas foram alimentadas por uma bomba Waters 515, onde o eluente foi o NaNO_2 contendo NaN_3 , e as soluções dos polissacarídeos (P1 5 mg/mL e P2 0,5 mg/mL) foram filtradas em membrana da millipore (0,22 μm). A fonte laser, que emitiu um raio luminoso de comprimento de $\gamma = 633 \text{ nm}$, permitiu medir a massa molecular. Os detetores de índice de refração e espalhamento de luz permitiram a extrapolação gráfica da concentração e da massa molar, respectivamente. A determinação exata dos valores foi realizada através de análise informatizada eletrônica ("software" Astra 4.70.07).

Para cada amostra pode efetuar-se uma medida de espalhamento do feixe luminoso em função da concentração em polímero e função do ângulo dos feixes espalhados.

Os dados fornecidos pelo aparelho permitem obter diretamente a massa molecular a partir do fator de RAYLEIGH (R_θ) dado pela equação:

$$R_\theta = \frac{G_\theta \cdot D}{G_0 \cdot \sigma' \cdot l'}$$

Onde:

G_θ = intensidade relativa correspondente ao feixe espalhado

G_0 = intensidade relativa correspondente ao feixe incidente

D' , σ' e l' = são as constantes do aparelho.

A relação entre o fator de RAYLEIGH e a massa molecular é dada pelas equações:

$$K c / \Delta R_{\theta} = 1/M_w$$

$$K = 4\pi.n. (dn/dc)^2 / \lambda^2 N$$

Onde:

C = concentração da solução (g/cm³)

ΔR_{θ} = a diferença entre o R_{θ} da solução e o R_{θ} do solvente (cm⁻¹)

n = índice de refração do solvente a 633 nm

dn/dc = taxa de variação do índice de refração com a concentração (cm³/g)

N = número de Avogadro

λ = comprimento de onda do feixe incidente

Para determinar a M_w para uma amostra, R_{θ} é medido em várias concentrações e o valor de Kc/R_{θ} é calculado para cada concentração. A extrapolação de um gráfico de Kc/R_{θ} (y) contra concentração (x) irá fornecer o valor de M_w , onde a curva intercepta o eixo y (TAGER, 1978).

O valor de dn/dc utilizado foi de 0,135 mL/g, conforme já calculado para outras galactomananas da literatura (BRESOLIN, 1998).

V.8. Obtenção de lectinas brutas de sementes de *Artocarpus integrifolia*, *Artocarpus incisa* e extrato de *Abrus precatorius*

V.8.1. Preparação das farinhas de sementes:

As farinhas de sementes de *Artocarpus integrifolia* e *Artocarpus incisa* foram obtidas por trituração das sementes em moinho de lâminas, após a eliminação do tegumento e secagem com acetona. As sementes de *Abrus precatorius* foram submetidas a um processo de destegumentação e depois trituração em moinho de lâminas. As farinhas finas resultantes foram acondicionadas em frascos herméticos e guardados à temperatura ambiente.

IV.8.2. Obtenção de extratos brutos

Os extratos brutos de sementes de *Abrus precatorius*, *Artocarpus integrifolia* e *Artocarpus incisa* foram obtidos a partir de extração salina (NaCl 0,15M) na proporção de 1:20 m/v em agitação contínua, durante 2 horas à temperatura ambiente. Em seguida, a suspensão resultante foi centrifugada a 9000 x g por 20 min, em centrífuga refrigerada SORVALL RC-5B a 4 °C. O sobrenadante, após filtração com papel de filtro, foi guardado em congelador, até posterior análise.

V.8.3. Obtenção das frações ricas de lectinas

Com a finalidade de se obter uma fração mais concentrada e livre de impurezas de baixa massa molecular, os extratos totais foram precipitados por adição de sulfato de amônio até 80% de saturação. Após 4 horas de repouso, o material foi centrifugado a 9.000 x g por 30 minutos em centrífuga refrigerada SORVALL RC-5B e o precipitado resultante dissolvido em salina, dialisado exaustivamente contra água deionizada, e liofilizado. As frações obtidas foram acondicionadas em frascos herméticos guardados em congelador até uso posterior.

V.8.4. Determinação de proteínas solúveis

A determinação da concentração das proteínas nas frações ricas de lectinas foi realizada pelo método de BRADFORD, (1976), utilizando-se como padrão de referência a albumina sérica bovina (BSA). As demais concentrações de proteínas obtidas após a cromatografia de afinidade foram determinadas pela leitura a 280 nm em espectrofotômetro UV-VIS (INCIBRÁS).

V.8.5. Determinação de atividade hemaglutinante

A atividade hemaglutinante das frações protéicas foi determinada segundo MOREIRA & PERRONE (1977). A 50 μ L da solução de proteínas, em NaCl 0,15 mol/L, foi adicionado igual volume de uma suspensão de hemácias de coelho a 2% em NaCl 0,15 mol/L. A mistura foi incubada em estufa bacteriológica a 37°C por 30 minutos, após o que foi deixada em repouso à temperatura ambiente por mais 30 minutos. A aglutinação foi determinada visualmente. Uma unidade de hemaglutinação (UH) é definida como a maior diluição a que pode ser submetida uma amostra de proteína, ainda capaz de aglutinar uma suspensão de hemácias a 2%.

V.9. Tratamento dos polissacarídeos de *Parkinsonia aculeata* com epicloridrina

A goma de *Parkinsonia aculeata* foi tratada com diferentes concentrações de epicloridrina e solução de hidróxido de sódio tabela X, pg85. No ensaio A, as quantidades de goma e NaOH são mantidas constantes, sendo variado a quantidade de epicloridrina. No ensaio C as quantidades de goma e epicloridrina foram constantes, variando-se o volume de NaOH empregado para a dispersão da goma. No ensaio B tanto a quantidade de goma e epicloridrina como o volume de NaOH foram mantidos constantes variando-se apenas a concentração de NaOH.

As amostra foram colocadas em estufa a 40°C por 24 horas e em seguida, elevou-se a temperatura a 70°C por mais 12 horas.

O material resultante e modificado foi lavado exaustivamente e dele retiradas as partículas finas homogeneizando-se com isso o tamanho das esferas da matriz.

V.10. Cromatografia de bioafinidade

V.10.1. Preparação das colunas de afinidade

As colunas foram montadas, utilizando-se tubo de vidro cilíndrico de dimensões equivalentes a 10 cm de altura por 2,8 cm de diâmetro, e com gel inchado com

água e equilibrado com uma solução de NaOH 0,15M. O gel permeado foi deixado sedimentar por gravidade, condição essencial para se obter um leito cromatográfico homogêneo e adequado ao processo.

V.10.2. Cromatografia de afinidade de lectinas em colunas de *Parkinsonia aculeata*

Frações ricas de lectinas mantidas na solução de equilíbrio foram percoladas no suporte de afinidade, após terem sido equilibradas com uma solução de NaCl 0,15mol/L e deixadas em contato por mais ou menos 1 hora em refluxo contínuo como suporte cromatográfico, utilizando-se o sistema de coletores de frações Gradi-Frac System, acoplado a uma bomba peristáltica.

Após este tempo, o material foi eluído com uma solução salina (NaCl 0,15mol/L) à temperatura ambiente e lida espectrofotometricamente a 280 nm em espectrofotômetro UV-VIS (ENCIBRÁS) até zerar (linha de base) a leitura. Em seguida, eluiu-se a coluna com uma solução de galactose 0,02mol/L e novas leituras foram feitas no material eluído, nas mesmas condições que a primeira.

As condições obedecidas foram: fluxo constante de 30 mL/h e coletados em tubos alíquotados em 1,5 mL/tubo.

V.11. Eletroforese em gel de poliacrilamida

A eletroforese foi feita em gel de poliacrilamida na presença de SDS e β -mercaptoetanol (agentes desnaturantes) segundo a técnica de LAEMMLI (1970).

No ensaio experimental foi utilizado um gel de aplicação contendo 3,5% de acrilamida em tampão Tris-HCl 0,5M pH 6,8 e um gel de separação contendo 12,5% de acrilamida em tampão Tris-HCl 3M, pH 8,8, contendo SDS a 1%. A corrida foi desenvolvida em placas com dimensões de (14 x 12 cm) e uma corrente elétrica regulada para 25 mA no início do experimento, com aceitável variação até 70 Volts no final. A corrida completa foi efetuada aproximadamente em 4 horas.

As amostras foram preparadas utilizando-se tampão Tris-HCl 0,0625M pH 8,3 contendo SDS a 1%. Em cada amostra foi adicionada o agente redutor (β -

mercaptoetanol). Este material foi incubado a 100°C por 10 minutos e centrifugado por 5 minutos em centrífuga Eppendorf.

Como indicador de corrida foi usada uma solução de azul de bromofenol a 0,02%. Cristais de sacarose foram colocados nas amostras com a finalidade de torná-las mais densas.

Para a fixação do gel utilizou-se TCA a 12%, por 30 minutos e para a revelação foi uma solução de Coomassie Brilliant Blue R a 0,05% em uma mistura de água:ácido acético:metanol (60:10,5:79,5 v:v:v) por 12 horas . Só então o gel foi descorado com uma solução descorante, constituída de água:ácido acético:metanol conservando as seguintes proporções: (8:1:3,5 v:v:v).

VI. RESULTADOS E DISCUSSÃO

VI. RESULTADOS E DISCUSSÃO

VI.1. Características da Planta

Parkinsonia aculeata L. é uma angiosperma da família *Leguminosae*, sub-família *Caesalpinoideae*, denominada popularmente de Turco no Nordeste ou Chile na Amazônia. Recebe ainda a denominação de espinho de Jerusalém e Cina-cina no Rio Grande do Sul, e sensitivo e Rosa da Turquia no Ceará (BRAGA, 1976).

Esta árvore é comum no sertão Nordestino, principalmente nos campos e nas caatingas e no Rio Grande do Sul. É uma planta perenófila, heliófila, comum em locais alagadiços e quase nunca é encontrada em matas altas. Árvore de estilo ornamental, apresenta floração intensa, flores regulares e sementes viáveis, oriundas de frutos que amadurecem nos meses de outubro a janeiro. Normalmente, a obtenção das sementes é feita de frutos (vagens) que caem espontaneamente. A madeira do turco é bastante empregada em carpintaria, sendo ainda utilizada com lenha e carvão (Figura 5).

Em detalhes se apresenta como uma árvore espinhenta de 5 a 10 m de altura, com um tronco de 20 a 30 cm de diâmetro, possuindo folhas compostas de 1 a 2 pares de pinas, cada uma formada por uma raquis plana de 20 a 30cm de comprimento, com folíolos afastados entre si e de tamanho muito reduzido (Figura 6).

VI.2. Características da Semente

VI.2.1. Morfologia

As sementes de *Parkinsonia aculeata* L. se apresentam sob a forma elipsóide, freqüentemente de cor parda, cujas dimensões são demonstradas na Tabela III com largura e espessura próximas, e um hilo correspondendo a 89,8% do perímetro e massa de 94,9 mg. O endosperma (onde se localiza a goma), representa 33,8 % da semente e está fortemente aderido ao tegumento

que corresponde a 37,6 %. O embrião representa, ainda, 25,9 %, considerando-se uma perda de 2,7 % no processo de separação (Figura 7).



Figura 5: Árvore de *Parkinsonia aculeata* L., em seu habitat natural



Figura 6: Folhas, flores e vagens de *Parkinsonia aculeata* L.



Figura 7: Vagens, sementes e endosperma de *Parkinsonia aculeata* L.

TABELA III. Medidas morfológicas* de sementes de *Parkinsonia aculeata* L.

Comprimento (cm)	Largura (cm)	Espessura (cm)	Perímetro (cm)	Hilo (%)	Massa (mg)
0,92 ± 0,07	0,42 ± 0,02	0,34 ± 0,02	1,83 ± 0,14	89,8 ± 2,3	96,8±9,4

* média de 50 sementes

VI.2.2. Determinação de umidade da semente de *Parkinsonia aculeata* L.

Os teores de umidade das diversas partes da sementes de *Parkinsonia aculeata* são mostrados na Tabela IV. Pode-se verificar que o mesmo é em torno de 13 %. A goma bruta, depois de liofilizada, apresenta uma umidade de 13,5 %.

TABELA IV. Teor de umidade de componentes da semente de *Parkinsonia aculeata* L.

Amostras	Umidade (%)
Tegumento	10,0
Endosperma	13,4
Embrião	6,1
Semente íntegra	10,1

VI.2.3. Nitrogênio total e teor de cinzas

O teor de nitrogênio total do endosperma de *Parkinsonia aculeata* foi determinado como sendo 0,72 %, o que corresponde a 4,5 % de proteína bruta (%N x 6,25). Este valor é mais elevado que aquele encontrado para a goma endospermica de carolina, que apresenta 0,27 % de nitrogênio (TAVARES, 1998), embora inferior ao encontrado para a goma endospermica de guar, que chega a valores de 0,8 % (GYNTHER, 1984).

O teor de cinzas, obtido pela queima do endosperma bruto de *Parkinsonia aculeata* em mufla a 600 °C, foi de 2,63 %, um valor elevado, quando comparado com aquele obtido para a goma de *Adenanthera pavonina*, que foi de 0,41 % (TAVARES, 1998).

VI.3. Isolamento das galactomananas de endosperma de sementes de *Parkinsonia aculeata*

A goma endospermica bruta de *Parkinsonia aculeata*, representa 33,8 % do endosperma. Desta, foram extraídas 4 frações, consideradas e denominadas sequenciais, e um resíduo final, cujos teores são apresentados na Tabela V.

TABELA V. Rendimento das frações polissacarídicas da goma endospermica bruta de sementes destegumentadas de *Parkinsonia aculeata*

Fração**	Massa (g)	Rendimento (%)
		*
Fração 1	5,2	26,2
Fração 2	1,6	7,9
Fração 3	3,6	17,9
Fração 4	0,6	2,9
R ₁	8,9	44,9

*A partir de 20 gramas de goma

** Ver fluxograma página 42

VI.4. Determinação da estrutura das frações polissacarídicas de *Parkinsonia aculeata*

VI.4.1. Cromatografia em papel

Quando as várias frações da goma bruta endospermica de *Parkinsonia aculeata* foram hidrolisadas e analisadas por cromatografia em papel, verificou-se a presença predominante de manose e galactose, com um pequeno teor de ácido glucurônico, provavelmente por contaminação da amostra com o tegumento da semente.

VI.4.2. Cromatografia líquido-gasosa dos polissacarídeos hidrolisados

Quando as várias frações da goma endospermica bruta de *Parkinsonia aculeata* foram hidrolisadas e avaliadas por cromatografia líquido-gasosa (CG), foi confirmada a predominância de manose e galactose, com uma pequena participação de arabinose e xilose, na fração 1 e de arabinose na fração 4, conforme pode ser visto na Tabela VI, originada dos dados representados nas Figuras de 8 a 11.

TABELA VI. Teores percentuais de monossacarídeos e relação molar (Man:Gal) nas diversas frações polissacarídicas de sementes de *Parkinsonia aculeata*

Monossacarídeo	Porcentagem						
	Fração 1	Fração 2	Fração 3	Fração 4	R ₁	R ₂	R ₃
Ramnose	-	-	-	-	-	1,6	-
Fucose	-	-	-	-	-	-	1,9
Arabinose	1,4	-	-	10,9	20,6	-	-
Xilose	0,6	-	-	-	-	-	-
Manose	73,9	78,8	83,3	76,5	88,0	87,4	86,2
Galactose	24,1	21,2	16,7	12,6	11,9	6,9	6,6
Glucose	-	-	-	-	-	4,1	5,3
Relação Man:Gal	3,1:1	3,7:1	4,9:1	6,1:1	7,4:1	12,5:1	13,1:1

* CG, coluna OV 225, temperatura 50° C, na forma de alditóis acetato

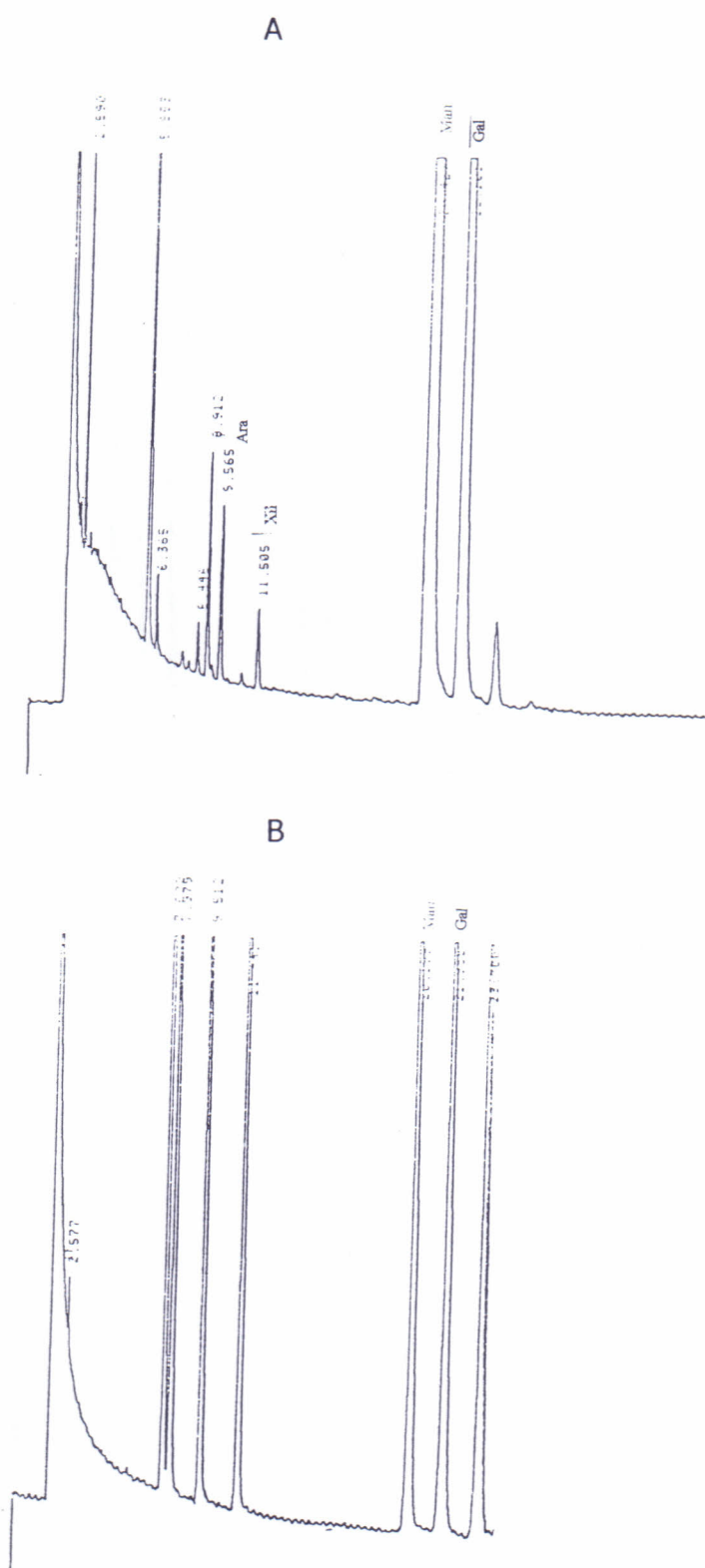


Figura 8: Cromatografia líquido-gasosa (CG) dos padrões (A) e da fração 1 de semente de *Parkinsonia aculeata* (B)

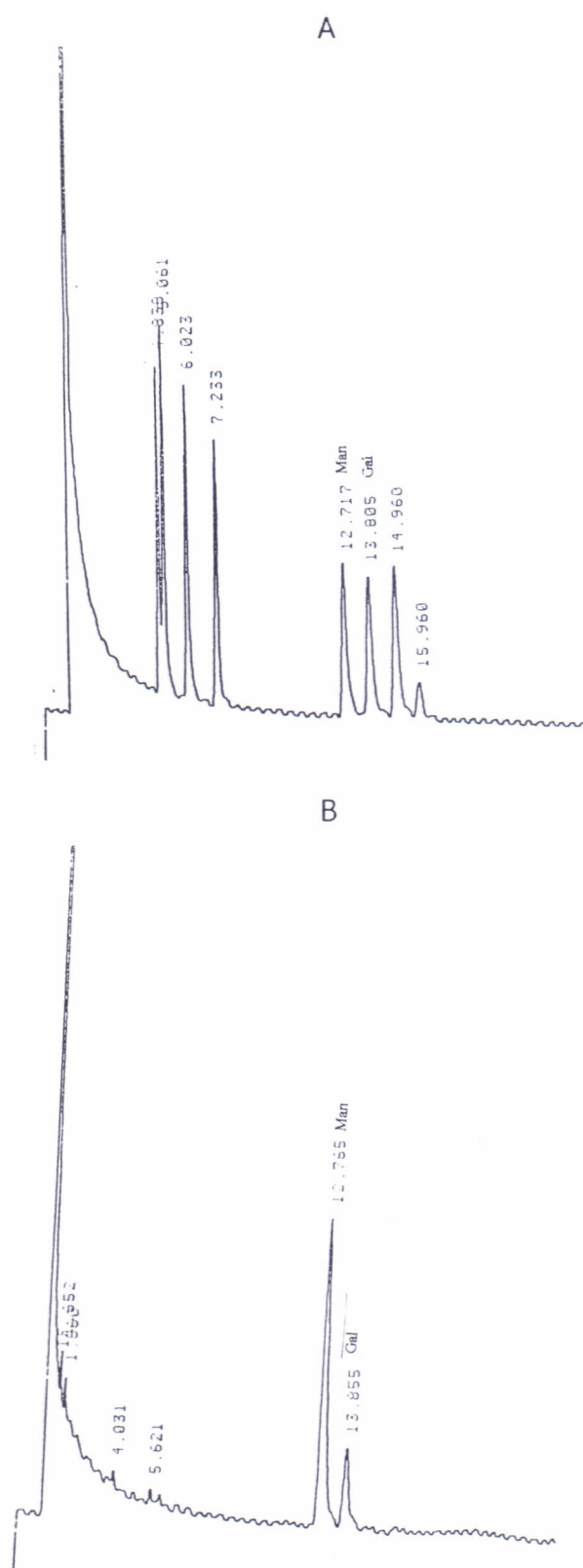
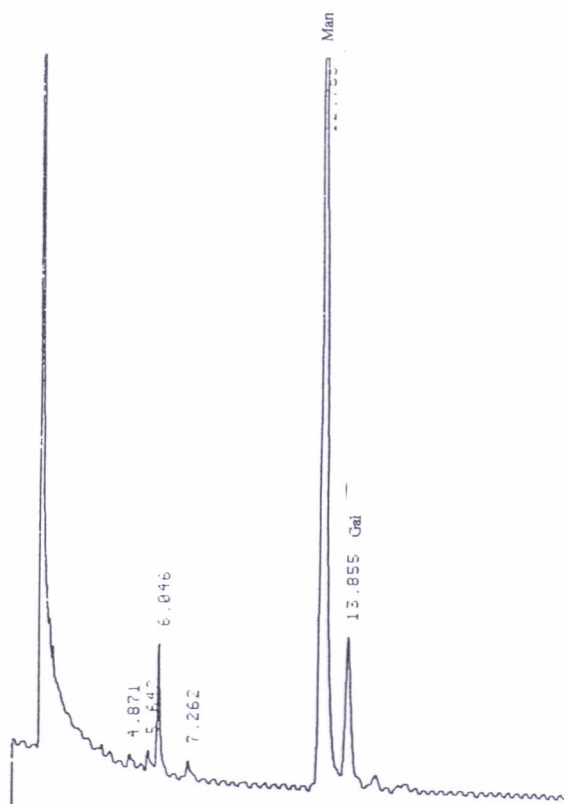


Figura 9: Cromatografia líquido-gasosa (CG) dos padrões para manose e galactose (A) e da fração 2 de semente de *Parkinsonia acauleata* (B)

A



B

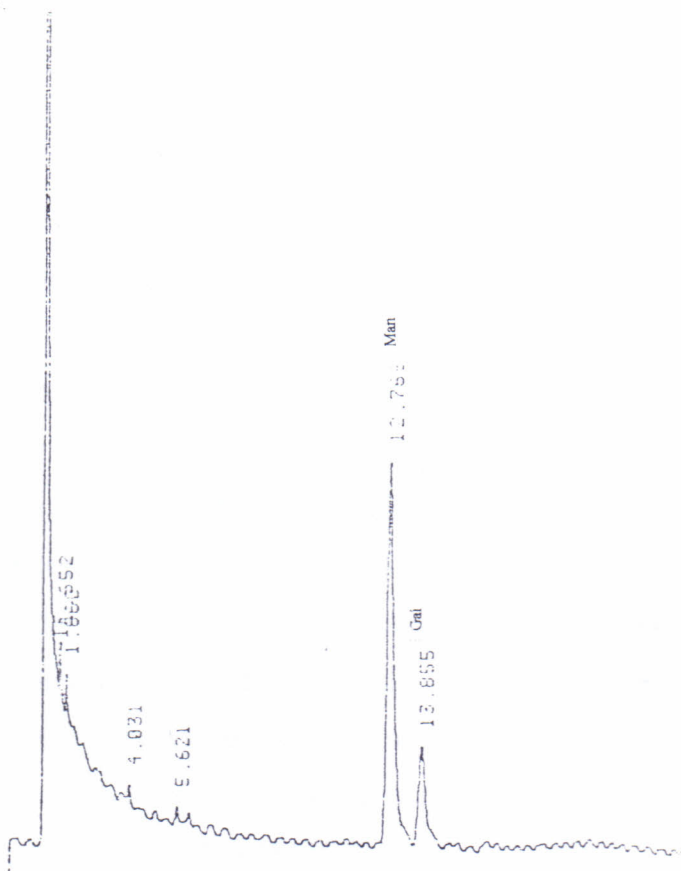


Figura 10: Cromatografia líquido-gasosa (CG) da fração 3 (A) e da fração 4 (B) tendo como padrão o mesmo da fração 1.

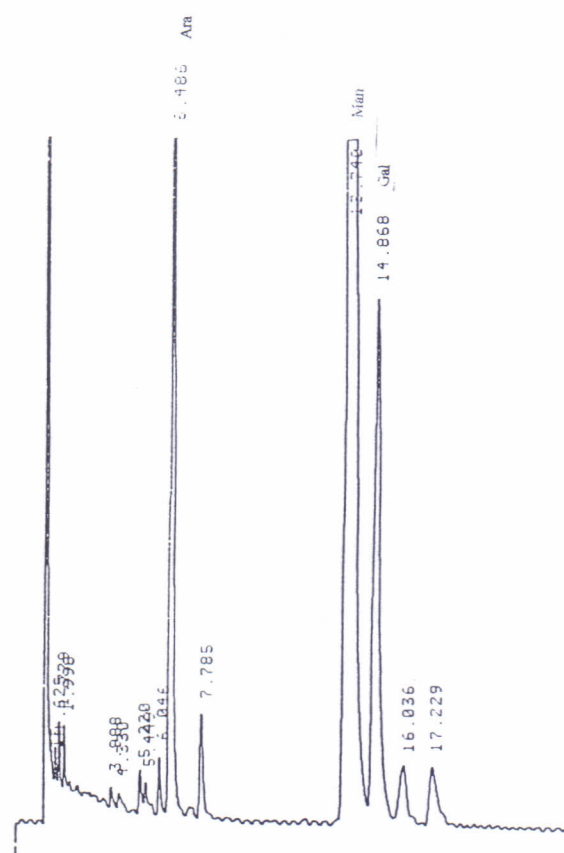


Figura 11: Cromatografia líquido-gasosa do resíduo de extração (R₁).

Estes resultados mostram a presença de uma família de galactomananas, já que a relação manose:galactose aumenta progressivamente nas frações obtidas pela extração seqüenciada. DEA & MORRISON (1975) estudando galactomananas de diversas sementes vegetais, relacionaram o aumento na relação manose:galactose com a menor solubilidade do polissacarídeo, mostrando que quanto menos ramificada, mais solúvel é a galactomanana. Outras sementes de leguminosas também apresentam famílias de galactomananas, como as sementes de *Schizolobium amazonicum*, que possui uma família composta por 5 galactomananas, com diferentes proporções manose:galactose (PETKOWICZ, 1993).

A semente de *Adenantha pavonina* (TAVARES, 1998), por outro lado, apresenta apenas um único tipo de galactomanana, com uma relação manose:galactose em torno de 2:1, com variações muito pequenas.

É importante notar que os valores encontrados nas sementes de *Parkinsonia aculeata* (várias galactomananas), neste trabalho, não correspondem àqueles encontrados por GURHA & SINGH (1988) onde foi detectado uma só galactomanana cuja relação manose:galactose é de 1,85:1.

Diante desses dados, o resíduo R₁ foi posteriormente fracionado de acordo com a Figura 3 (pg 40) e os resultados obtidos apresentados na Tabela VI, onde pode ser observado que, embora haja um aumento na relação manose:galactose em relação às frações analisadas anteriormente, não podemos dizer que estamos diante de uma manana verdadeira, de acordo com STEPHEN (1983). Nota-se ainda que o resíduo R₃ embora seja uma reextração mostra sutil diferença com respeito a R₂.

VI.4.3. Metilação da fração 1 de *Parkinsonia aculeata*

Este método, consiste na substituição de todas as hidroxilas livres da molécula por grupamentos OCH₃, dando indicação das substituições presentes nas moléculas de monossacarídeos. Após a hidrólise do material, onde são quebradas as ligações glicosídicas, entram no lugar destas ligações, hidroxilas. Que futuramente serão acetiladas

Foram realizadas duas metilações em seqüência, e posteriormente foi feita análise de infravermelho (IR), onde se detectou a ausência de banda correspondente ao grupamento OH, através da ausência do pico de absorção em 3.600 cm⁻¹, característico destes grupamentos.

Na fração 1, após metilação completa, hidrólise e redução (o que transforma os monossacarídeos em álcoois - alditóis) e acetilação (que transforma os alditóis em alditóis acetato) os produtos finais encontrados foram analisados por cromatografia líquido-gasosa, acoplada a espectroscopia de massa (GLC-MS) e os espectros obtidos comparados com espectros padrões.

Os resultados obtidos são mostrados na Tabela VII e nas Figuras de 12 a 17.

TABELA VII. Análise de metilação da fração 1 de *Parkinsonia aculeata*, por CG

Rt*	Derivado metilado	Mol %
585	1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-manose	5,9
716	1,4,5-tri-O-acetil-2,3,6-tri-O-metil-manose	58,0
925	1,4,5,6-tetra-O-acetil-2,3-di-O-metil-manose	13,2
608	1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-galactose	13,9
747	1,3,5-tri-O-acetil-2,4,6-tri-O-metil-galactose	8,7

* Rt – tempo de retenção

Na Tabela VII, devemos observar que:

1. O derivado 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-manose (5,9%) deve ser proveniente do terminal não redutor.
2. O derivado 1,4,5-tri-O-acetil-2,3,6-tri-O-metil-manose (58%) deve ser proveniente das unidades envolvidas em ligação (1→4) correspondendo provavelmente, à cadeia principal do polímero.
3. O derivado 1,4,5,6-tetra-O-acetil-2,3-di-O-metil-manose (13,2%) deve ser proveniente das unidades envolvidas em ligações (1→4) com substituições (1→6) por galactose.
4. O derivado 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-galactose (13,9%) deve ser proveniente das unidades de galactose envolvidas em ligações com o carbono 6 da cadeia principal.
5. O derivado 1,3,5-tri-O-acetil-2,4,6-tetra-O-metil-galactose (8,7%), poderia ser proveniente das unidades de galactose envolvidas em ligações (1→3) da cadeia lateral de galactose, ou ser resultado de metilação incompleta.

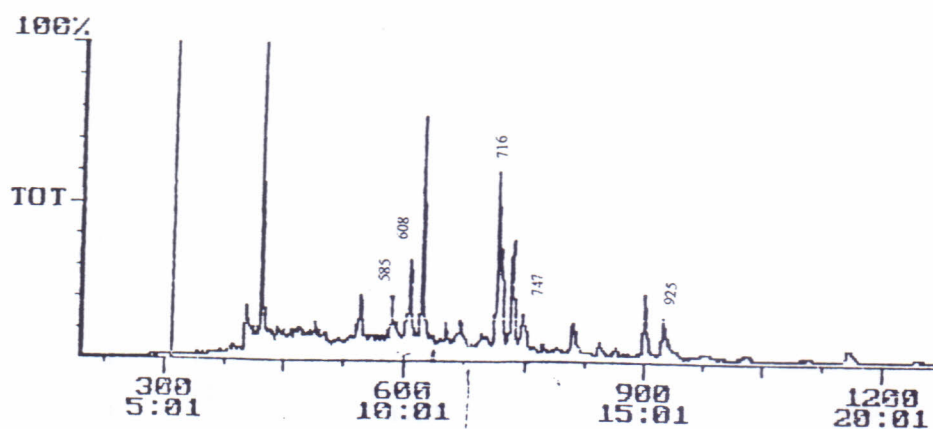


Figura 12: Perfil cromatográfico por CG-EM da fração 1 metilado de semente *P. aculeata*.

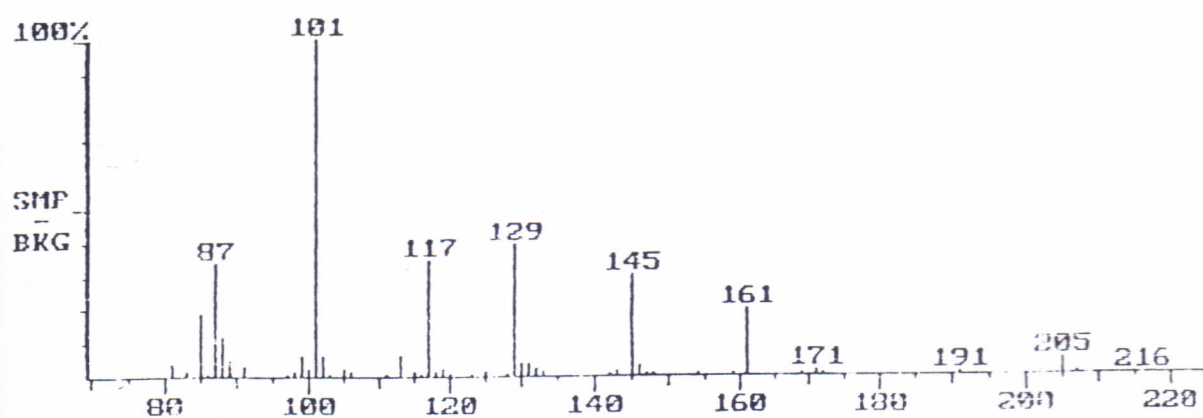


Figura 13: Espectro de massa correspondente ao derivado do pico 585 presente na fração 1 de semente *P. aculeata*.

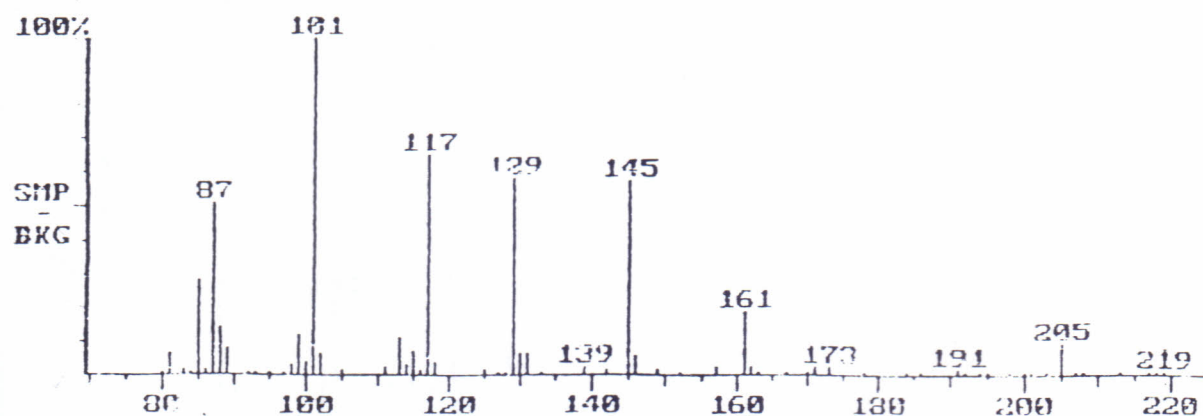


Figura 14: Espectro de massa correspondente ao derivado do pico 608 presente na fração 1 de semente *P. aculeata*.

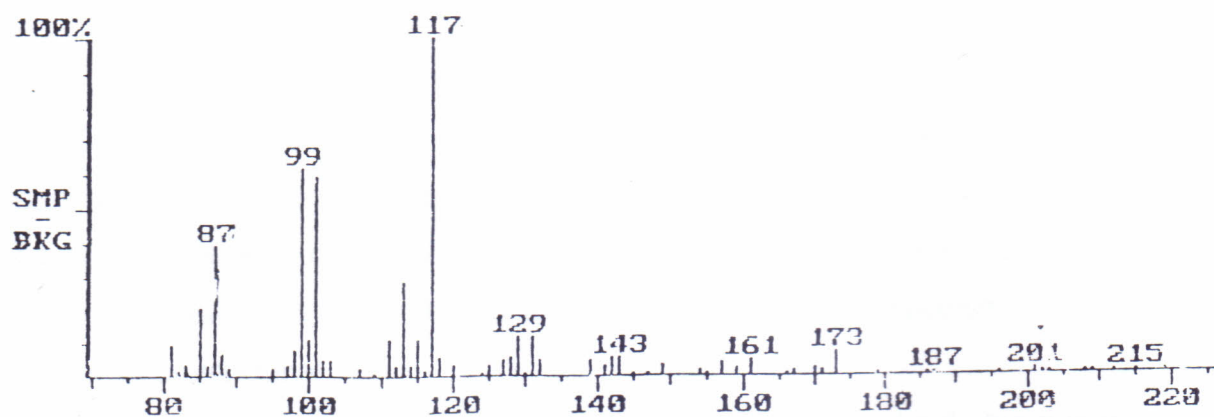


Figura 15: Espectro de massa correspondente ao derivado do pico 716 presente na fração 1 de semente *P. aculeata*.

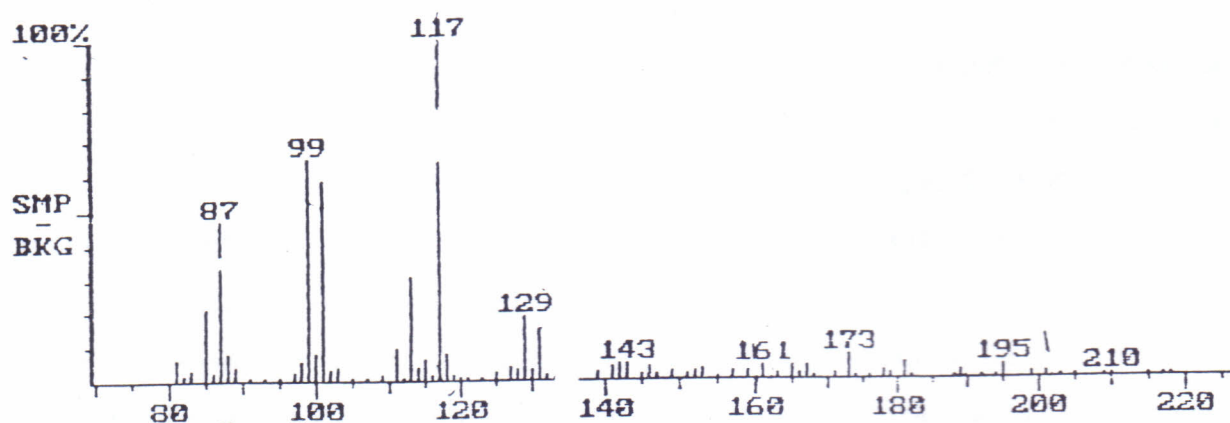


Figura 16: Espectro de massa correspondente ao derivado do pico 747 presente na fração 1 de semente *P. aculeata*.

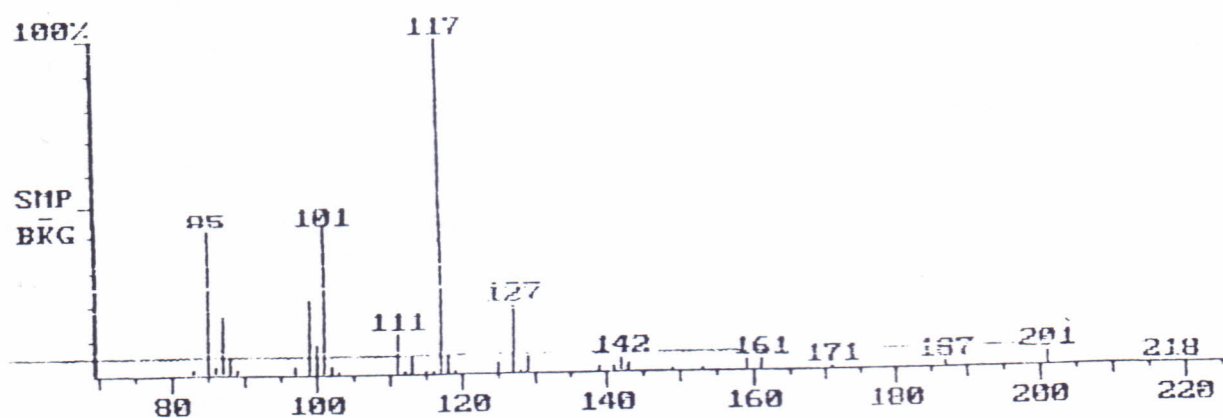


Figura 17: Espectro de massa correspondente ao derivado do pico 925 presente na fração 1 de semente *P. aculeata*.

VI.4.4. Oxidação da fração 1 com metaperiodato de sódio

Com a oxidação com metaperiodato do sódio pode se saber qual é o tipo de ligação que existe entre as unidades monossacarídicas de manose e manose na cadeia principal e as unidades de manose e galactose que formam as cadeias laterais. Estas ligações podem ser do tipo glicosídica (1→4) entre as manoses e podem ser do tipo glicosídica (1→6) entre as unidades de manose e galactose, numa galactomanana convencional.

O metaperiodato oxida apenas as ligações entre os carboidratos que possuem hidroxilas vicinais na unidade monossacarídica, ocorrendo a quebra da ligação carbono-carbono (C-C) e formação de seus produtos característicos após redução, hidrólise, redução e acetilação.

Foram realizados dois ciclos de oxidação com metaperiodato de sódio. Se existirem ligações (1→4) entre as manoses e ligações (1→6) entre manoses e galactoses, os produtos finais esperados após a oxidação, redução do polioliol, hidrólise, redução e acetilação, seriam uma molécula de eritritol e uma de etilenoglicol (sendo esta não detectada na análise), provenientes da ligação manose-manose (1→4) ligada na cadeia principal, com substituição (1→6) e uma molécula de ácido fórmico, uma de etilenoglicol e uma de glicerol, proveniente da galactose ligada (1→6) com a manose.

Porém, poderiam ainda aparecer manoses na análise final, o que indicaria que existem ligações (1→3) entre as manoses, pois o metaperiodato de sódio não oxida unidades substituídas em (1→3), pois não existem hidroxilas vicinais. Mas este resultado pode aparecer também por outro motivo: a oxidação pode ocorrer numa unidade de manose e não ocorrer na manose vizinha, com a mesma velocidade. Então o grupamento aldeído formado pela oxidação de uma manose impede que a ligação entre os carbonos que contêm OH vicinais seja quebrada na manose vizinha, pela formação de um hemiacetal. Neste caso, na análise final existirão manoses intactas, confundindo desta forma a interpretação dos resultados.

O aparecimento de galactose na análise final, isto indica ligação (1→3) entre as galactoses da cadeia lateral, conforme mostrado por GURHA & SINGH, 1988, em-

bora estes autores não tenham obtido o oligossacarídeo correspondente por hidrólise ácida parcial.

São necessários dois ciclos de oxidação para se ter certeza de que todas as manoses e galactoses foram oxidadas para formar seus produtos finais. Se ao final dos dois ciclos ainda estiverem presentes manoses intactas, fica confirmada a presença de ligações (1→3) na cadeia principal; da mesma forma, se estiverem presentes galactoses intactas, fica confirmada a presença de ligações (1→3) na cadeia lateral.

Os resultados obtidos após dois ciclos de oxidação com metaperiodato, demonstra que nenhuma manose intacta foi mais detectada, tendo a molécula sido totalmente oxidada em seus produtos finais. Comprova-se então, que realmente as ligações entre as unidades de manose da cadeia principal são (1→4). Entretanto, existia ainda uma pequena quantidade de galactose (1,3 %). Este resultado, aliado à presença do derivado metilado 1,3,5-tri-O-acetil-2,4,6-tri-O-metil-galactose, sugere que numa pequena proporção as cadeias laterais de galactose podem ocorrer na forma de um dissacarídeo (1→3), por sua vez ligado (1→6) à cadeia principal, conforme a Tabela VIII originada da análise dos dados representados nas Figuras 18 a 20.

TABELA VIII. Análise por CG dos dois ciclos de oxidação da fração 1 com metaperiodato de sódio

Derivado	Percentual	
	1º Ciclo	2º Ciclo
Glicerol	16,7	15,8
Eritritol	60,7	82,2
Manose	21,6	0,6
Galactose	0,9	1,4

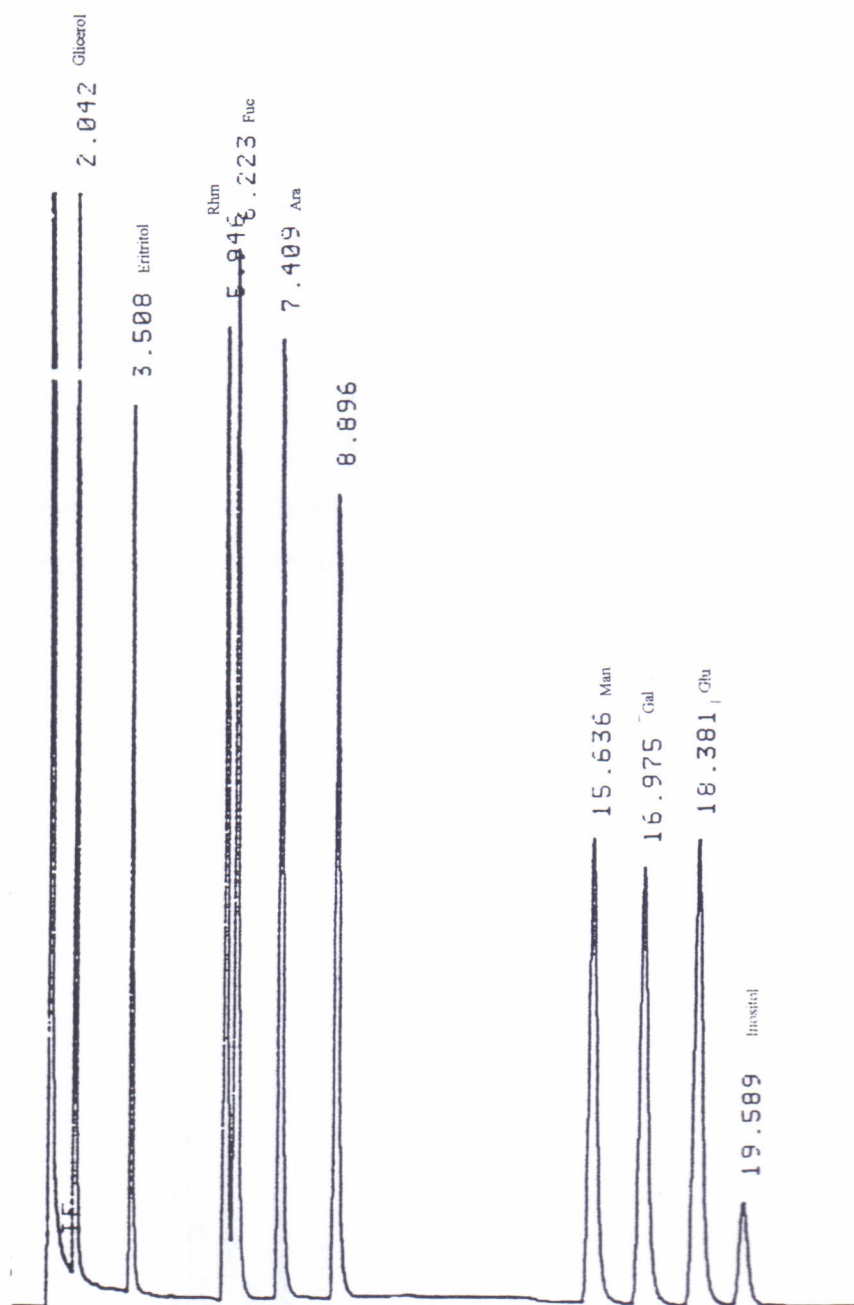


Figura 18: Tempo de retenção de padrões alditóis-acetato utilizados nas figuras 19 e 20.

Como pode ser observado, uma quantidade não significativa de manose foi observada ao final do segundo ciclo, indicando assim a ausência de ligações (1→3) na cadeia principal.

V.4.5. Análise da fração 1 por ressonância magnética nuclear de carbono treze (RMN-¹³C)

O espectro de ressonância magnética nuclear de carbono treze da fração 1 confirmou a presença de uma cadeia principal de manose unida por ligação (1→4) com ramificações de galactose através de ligações (1→6). Isto pode ser visualizado com análise do espectro (Figura 21), encontrando-se as regiões dos sinais de C₁, C₄ e C₆ de cada tipo de monossacarídeo presente na molécula (manose e galactose). O reconhecimento dos sinais característicos foi feito por comparação com padrões (GANTER *et al.*, 1993, GORIN & MAZUREK, 1975) e análise de outras soluções. O espectro não indicou ligação do tipo (1→3).

Na Tabela IX são mostrados os valores de ppm de C₁, C₄ e C₆ para a galactose, para a manose não ramificada e para a manose ramificada, dados obtidos a partir do espectro de RMN-¹³C representado nas Figura 21 e 22.

TABELA IX. Análise da fração 1 por ressonância magnética nuclear de carbono treze, deslocamento químico (δ) em ppm

Carbono	Galactose	Manose não ramificada	Manose ramificada
C ₁	98,8	100,0	100,0
C ₄	69,4	76,0 ^a	76,2 ^b
C ₆	61,1	60,5	66,3

^a resultado da M-M onde o sinal é proveniente da manose sublinhada

^b resultado da $\begin{array}{c} \text{G} \\ | \\ \text{M-M} \end{array}$ e $\begin{array}{c} \text{G} \\ | \\ \text{M-M} \end{array}$ onde o sinal é proveniente da manose sublinhada

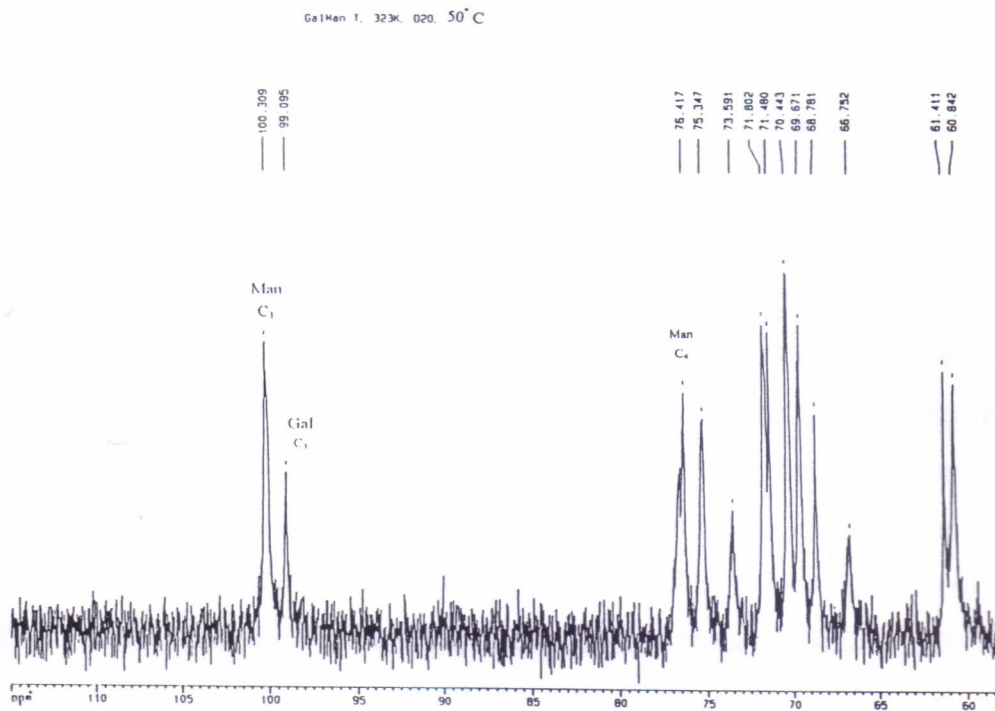


Figura 21: Espectro de ^{13}C da Fração 1 da semente de *P. aculeata*

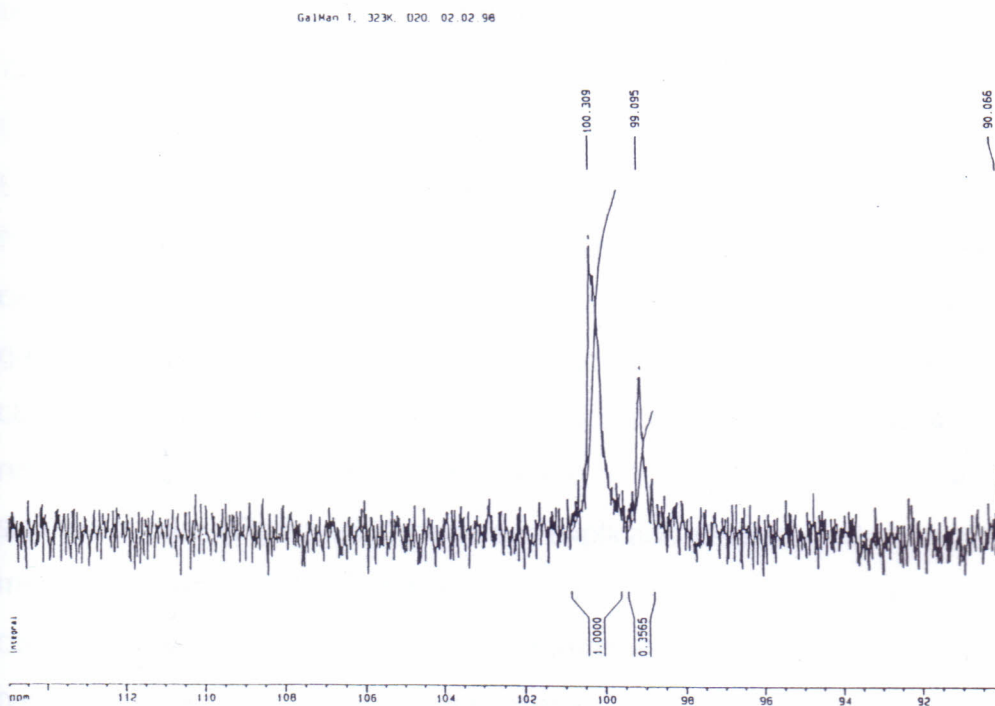


Figura 22: Espectro de ^{13}C da Fração 1 da semente de *P. aculeata* (região de ampliação 112-92 ppm).

VI.5. Determinação da viscosidade intrínseca das amostras de galactomananas:

As galactomananas de sementes são polissacarídeos hidrossolúveis, geralmente com alta massa molar e com propriedades específicas em solução, entre elas alta viscosidade. Isso faz com que a relação estrutura e propriedades seja possível de se estabelecer e, conseqüentemente, entender o mecanismo de seu comportamento em água. Assim, o primeiro passo 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.

Para o polissacarídeo de *P. aculeata* o valor da viscosidade intrínseca, obtido através de medidas efetuadas em sistema capilar, para a galactomanana da fração 1 no solvente água (Figura 23A) e em NaCl 0,1mol/L (Figura 23B), foi determinado como sendo de 428,8 e 532,9 mL/g, respectivamente.

Para a mesma amostra em reômetro Brookfield, tendo como solvente a água, foi de 558 mL/g (Figura 23C). Assim, os resultados obtidos são um pouco inferiores se comparados com os valores de algumas galactomananas de sementes de outras espécies descritas na literatura como *Cyamopsis tetragonolobus* (880 mL/g), *Ceratonia ciliqua* (990 mL/g) (CLARK *et al.*, 1986), *Mimosa scabrella* (900 mL/g) (GANTER *et al.*, 1992, GANTER *et al.*, 1993), e *Schizolobium parahybum* (850 mL/g) (GANTER *et al.*, 1993), *Cassia fastuosa* (926-1036 mL/g) (TAVARES, 1994, GERMANO, 1996, AMARAL *et al.*, 1998). As razões molares de manose: galactose das espécies citadas acima variam de 1,1 - 4,0: 1, indicando, portanto, que o conteúdo de galactose presente no polímero, por não estar relacionado com as dimensões da cadeia, não interfere nos valores de viscosidade intrínseca (DEA *et al.*, 1986;). O resultado obtido no reômetro Brookfield (Figura 23C) superior ao encontrado no sistema capilar (Figura 23A) pode ser explicado pela faixa de velocidade de cisalhamento mensurável no reômetro que é inferior à do sistema capilar e, para algumas concentrações, pode não estar no patamar verdadeiramente newtoniano necessário para os cálculos de viscosidade intrínseca.

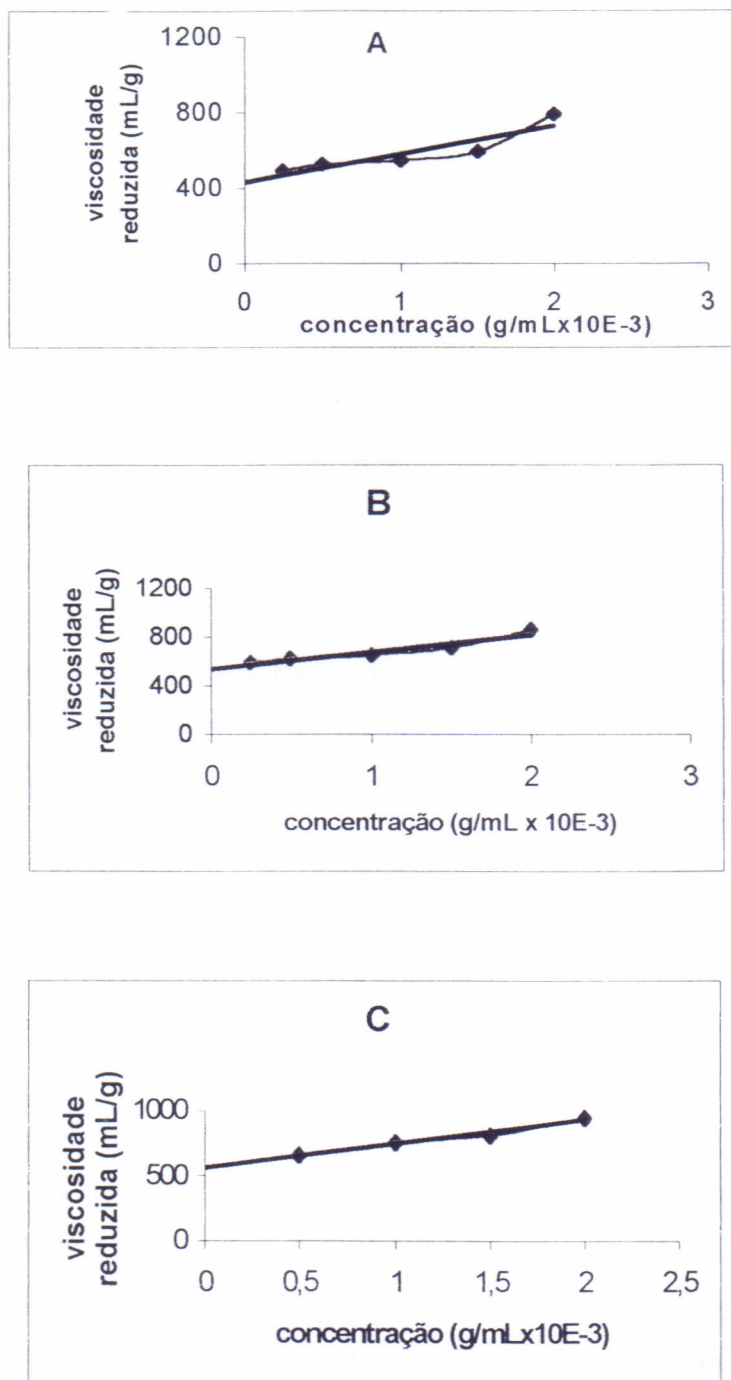


Figura 23: Representação gráfica da viscosidade intrínseca das galactomananas de *P. aculeata*. Fração 1, em viscosímetro capilar, solvente água, (A) e solvente cloreto de sódio 0,1 mol/L (B), em reômetro Brookfield - solvente água (C). Todas as leituras foram efetuadas a 20 °C.

A constante de Huggins (k'), que indica o grau de interação intermolecular foi determinada através da fórmula: $\eta_{red.} = \{ [\eta] + k' \cdot (C \cdot [\eta])^2 \}$. O valor desse parâmetro tem sido analisado teórica e experimentalmente e pode ser visto, como uma medida da interação polímero-polímero, polímero-solvente e como um indicativo da efetividade do solvente para uma determinada macromolécula (WANG *et al.*, 1994). Os valores determinados para as curvas da Figura 23A e 23B foram de 0,62 e 0,39, respectivamente, o que sugere a não formação de agregados moleculares em sistema diluído, sendo, portanto, a água e a solução de NaCl considerados bons solventes para o estudo das propriedades reológicas desse biopolímero, em baixas concentrações. Na análise comparativa entre os dois solventes, pode-se considerar a solução de NaCl melhor que a água, visto que o valor de k' foi inferior. Isso pode explicar porque os valores de viscosidade intrínseca foram diferenciados nos dois solventes. A análise de k' pelas medidas no reômetro (22C), cujo valor encontrado foi de 0,73, confirma a ausência de agregados em sistema diluído e que a água é um bom solvente. Todos os valores de k' determinados indicaram que nos sistemas utilizados o polímero está polidisperso.

Nos gráficos (Figura 23 A – C) pode-se observar uma mudança de inclinação para concentração de polissacarídeo a partir de 1,5g/L, especialmente em água, o que sugere mudança de regime ou seja passagem de sistema diluído para semi-diluído.

Na Figura 24 que corresponde a fração 2 a viscosidade intrínseca em água foi de 798,6 mL/g, sugerindo maior volume hidrodinâmico em comparação a fração 1, e o valor de k' de 1,54 mostra, também, maior polidispersão que talvez pudesse diminuir em presença de solução de NaCl. O resultado obtido para o volume hidrodinâmico para essa amostra pode ser relacionado ao de outras galactomananas, como já citado acima, e também ao das extraídas de sementes de *Schizolobium amazonicum* (PETKOWICZ *et al.*, 1998) e *Leucaena leucocephala* (SIERAKOWSKI *et al.*, 1999).

Discute-se que os diferentes valores de viscosidade intrínseca encontrados para polissacarídeos de fontes diversas podem ser ocasionados pelas diferenças estruturais (WANG *et al.*, 1997) e, em especial, motivado pela presença de cadeias

laterais. Mas, as diferenças de resultados obtidos para o polissacarídeo de uma mesma fonte, podem ser ocasionadas por influência dos processos de extração e purificação empregados para a obtenção do biopolímero.

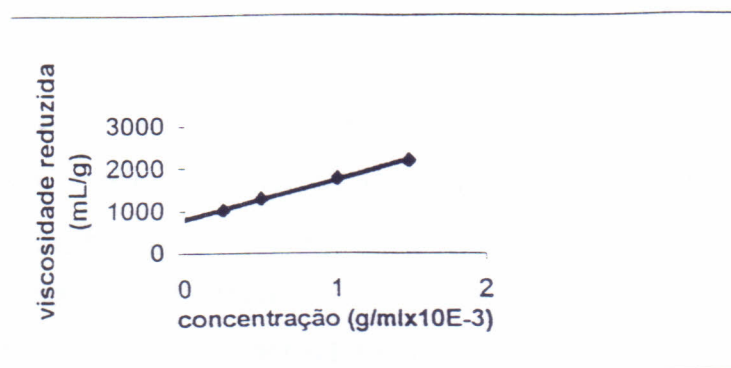


Figura 24 - Viscosidade intrínseca da galactomanana (fração 2) de *P. aculeata* em água (viscosímetro capilar, leituras efetuadas a 20°C).

VI.6 Determinação da massa molar da galactomanana

As medidas de massas molares de galactomananas são relativamente problemáticas, pois dificilmente obtém-se soluções verdadeiras dessas gomas; por esta razão, as soluções devem ser filtradas ou centrifugadas para remover substâncias insolúveis ou goma parcialmente hidratada. É muito comum para esta classe de biopolímeros a formação de agregados moleculares, o que levaria a uma determinação errônea da massa molar pelo método de gel permeação, uma vez que esse envolve a medida do volume hidrodinâmico das moléculas (DEA *et al.*, 1975).

Quando os valores de massa molar são obtidos por métodos como difusão de luz ou medidas de viscosidade, faz-se necessário uma avaliação da forma molecular. Esse método permite a medida da massa molar ponderal média (M_w) e massa molar numérica média (M_n). Aqueles polímeros que possuem massa molar ponderal média (M_w) e massa molar numérica média (M_n) muito próximos atribui-se-lhes um alto grau de homogeneidade e quanto maior for a sua diferença, tanto maior será a polidispersidade da amostra (MATHESON, 1990).

A massa molar foi determinada pelo método de espalhamento de luz. Os valores obtidos para a massa molar ponderal média (M_w) e massa molar numérica média (M_n) para a galactomanana da fração 1 do endosperma de sementes de *P. aculeata* foram, respectivamente, 775700 e 272400 g/mol. A relação M_w/M_n , superior a 1 ($\sim 2,84$) indica polidispersidade característica para esse tipo de polímero. Para a fração 2 os valores de M_w e M_n foram respectivamente de 726100 e 444100 g/mol, com razão M_w/M_n de $\sim 1,65$. Essa razão mostra polidispersão e confirma os dados obtidos para k' por medidas de viscosidade discutidas anteriormente.

O raio de giração (R_g), foi determinado para a solução de galactomanana da fração 1 encontrando-se valor igual a 624 Å, e para a fração 2 foi determinado como sendo de 641 Å. Esses valores permitem concluir que a galactomanana apresenta conformação enovelada, conforme esperado para soluções desses polissacarídeos, e foram semelhantes aos encontrados por TAVARES (1994) e AMARAL (1998) que, também trabalharam com uma galactomanana pouco substituída.

No perfil das análises, tanto por CGP como medidas de índice de refração verifica-se a presença de um ombro no perfil da fração 1 (Figura 25), o que mostra que essa não é homogênea, e até pode apresentar mais que um polímero em solução conforme sugerem os resultados de constituintes monossacarídeos apresentados na Tabela VI (pg 62). A presença de um único pico para a fração 2 sugere, que essa amostra está homogênea, polidispersa e sem contaminações (Figura 26).

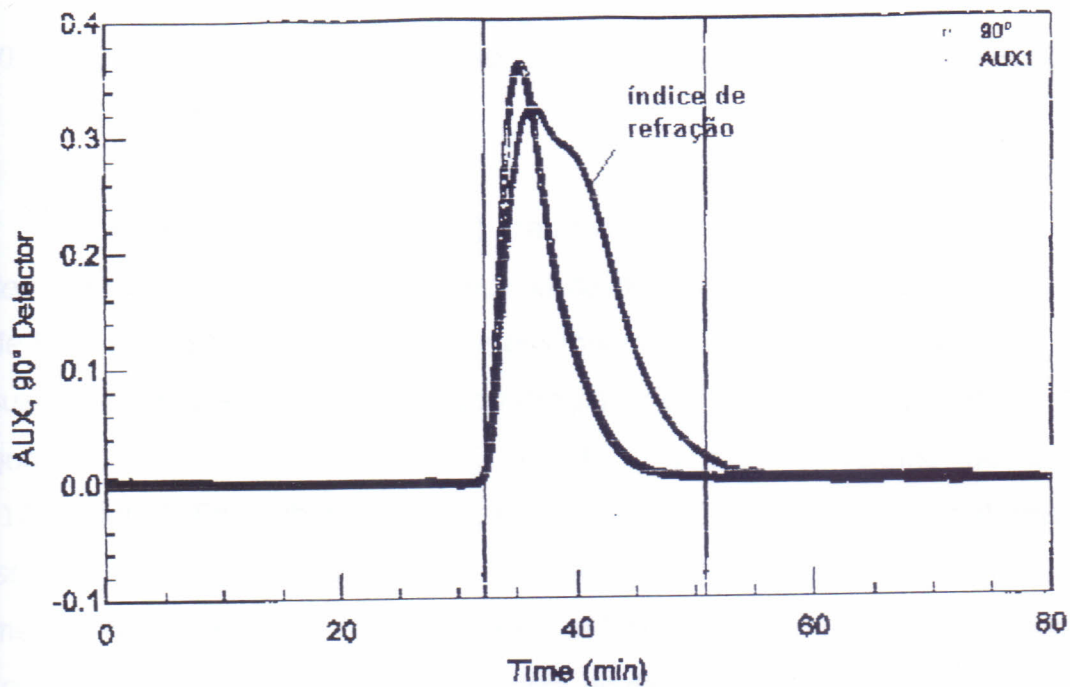


Figura 25 - Perfis de eluição por CGP, empregando os detetores de espalhamento de luz e Índice de refração, para fração 1.

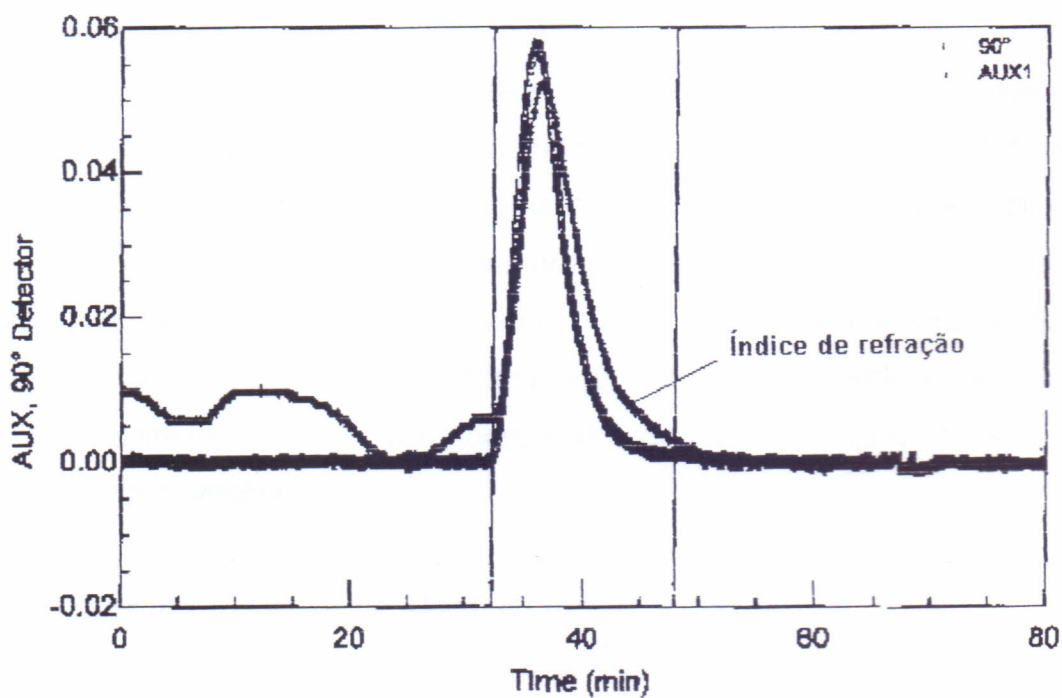


Figura 26 - Perfis de eluição por CGP, empregando os detetores de espalhamento de luz e Índice de refração, para a fração 2.

VI.7. Tratamento dos polissacarídeos endospérmicos de *Parkinsonia aculeata*, com epicloridrina

APPUKUTTAN *et al.* (1977) trataram a goma endospérmica de *Cyamopsis tetragonolobus* (guar) com epicloridrina na proporção de 10 g de goma para 30 mL de NaOH 3 mol/L contendo 3 mL de epicloridrina (12,38 mol/L). TAVARES (1998), por sua vez, tratou a goma de *Adenantha pavonina* (carolina) na proporção de 1 g de goma para 40 mL de NaOH 3 mol/L e o mesmo volume de epicloridrina (12,38 mol/L). Em ambos os casos, foi possível montar colunas cromatográficas para isolamento, por afinidade, de lectinas galactose-ligantes. Assim, usando a metodologia descrita por TAVARES (1998), 1 g de goma endospérmica (polissacarídeos totais), de *Parkinsonia aculeata* foi reticulada e com ela montada uma coluna cromatográfica. Quando uma solução da lectina bruta (fração protéica rica em lectinas) de *Artocarpus incisa* foi aplicada, por eluição com NaCl 0,15 mol/L, foi obtido um pico não retido que, devido à grande quantidade de lectina aplicada, apresentava atividade hemaglutinante.

Um segundo pico, retido, representando a fração lectínica, que foi eluído com galactose 0,1 mol/L. Observou-se, no entanto, que o gel obtido era pouco consistente e o leito da coluna apresentava fraca sedimentação, causando uma diluição pronunciada das frações. Seguindo-se o método descrito por APPUKUTTAN *et al.* (1977), para o tratamento da goma de *Parkinsonia aculeata* com epicloridrina, por outro lado, foi encontrada uma grande dificuldade de homogeneização da mistura provocado, provavelmente pela reticulação não homogênea, o que pode levar a uma lixiviação das galactomananas com o uso prolongado da matriz. Resultado semelhante também foi observado por TAVARES (1998) para a goma de *Adenantha pavonina*.

Os resultados obtidos para a goma endospérmica de *Parkinsonia aculeata*, tratada quer nas condições de APPUKUTTAN *et al.* (1977), que produziu uma mistura não homogênea ou de TAVARES (1998), que produziu uma goma pouco consistente, não foram plenamente satisfatórios. Por esta razão foram testadas diferentes concentrações de goma, epicloridrina e NaOH, de modo a se obter-se: a) diferentes

relações goma:epicloridrina, b) diferentes volumes de NaOH e c) diferentes concentrações de NaOH. A Tabela X mostra as condições utilizadas, onde se pode notar que a relação goma:epicloridrina variou de 0,020 até 0,162.

TABELA X. Tratamento dos polissacarídeos totais (goma endospémica bruta) de *Parkinsonia aculeata*, com diferentes concentrações de NaOH, goma e epicloridrina.

Tratamento	Quantidade utilizada			Concentração final no meio de reação			Relação Epicloridrina/ goma (Mol/Kg)
	Goma (g)	NaOH Vol. / mol/L	Epicloridrina* ML	Goma (g/mL)	NaOH (mol/L)	Epicloridrina (mol/L)	
A ₁	0,5	4,0 / 3	0,25	0,118	2,82	0,728	6,2
A ₂	0,5	4,0 / 3	0,50	0,111	2,67	1,376	12,4
A ₃	0,5	4,0 / 3	1,00	0,100	2,40	2,476	24,8
A ₄	0,5	4,0 / 3	2,00	0,083	2,00	4,127	49,7
B ₁	0,5	1,5 / 3	0,50	0,333	2,25	3,095	9,3
B ₂	0,5	3,0 / 3	0,50	0,143	2,57	1,769	12,4
B ₃	0,5	4,0 / 3	0,50	0,111	2,67	1,376	12,4
B ₄	0,5	5,0 / 3	0,50	0,091	2,73	1,125	12,4
C ₁	0,5	4,0 / 1	0,50	0,111	0,89	1,376	12,4
C ₂	0,5	4,0 / 2	0,50	0,111	1,78	1,376	12,4
C ₃	0,5	4,0 / 3	0,50	0,111	2,67	1,376	12,4
C ₄	0,5	4,0 / 3	0,50	0,111	3,56	1,376	12,4
Guar	0,5	1,5 / 3	0,15	0,333	2,73	1,125	3,4
Carolina	0,5	20 / 3	6,32	0,020	2,28	3,000	150,0

* (12,38 mol/L)

Os diferentes tratamentos para reticulação foram avaliados sob dois aspectos: a) capacidade de sedimentação, avaliada pelo fluxo obtido e b) capacidade de reter lectinas, avaliada pela quantidade saturante da lectina.

Para testar a eficiência de cada preparação em reter lectinas, utilizou-se uma solução de fração rica em lectina de *Artocarpus integrifolia* (30 mg/5 mL) foi aplicada às colunas, sendo obtido para cada tratamento, um pico não retido, eluído com NaCl 0,15 mol/L, com atividade hemaglutinante residual e um segundo pico, retido, contendo a fração lectínica que podia ser eluído com tampão glicina, 0,1 mol/L, pH 2,6, contendo NaCl 0,15 mol/L. Quanto a este aspecto, pude-se observar

(Figura 27 e Tabela XI) que embora todas fossem capazes de reter lectinas, as que apresentaram maior capacidade foram aquelas do tratamento A₂, B₃ e C₃. É importante se notar que os tratamentos A₂, B₃ e C₃ são iguais.

TABELA XI. Teor de proteína (em DO a 280nm) dos picos obtidos por cromatografia de afinidade de frações ricas em lectinas de *Artocarpus incisa* em colunas de goma de *Parkinsonia aculeata*, reticulada em diferentes condições.

Matriz	PI	PII	PI+PII	PII (%)	PI Corrigido	PII Corrigido
A1	26,11	14,55	40,66	35,78	19,26	10,74
A2	25,78	20,73	46,51	44,57	16,62	13,38
A3	23,46	14,91	38,37	33,86	18,34	11,66
A4	26,69	3,00	29,69	10,10	26,96	3,04
B1	28,08	0,00	28,08	0,00	30,00	0,00
B2	15,10	10,86	25,96	41,83	17,44	12,56
B3	14,68	11,80	26,48	44,56	16,64	13,36
B4	21,22	5,28	26,50	19,92	24,02	5,98
C1	28,59	1,34	29,93	4,48	28,66	1,34
C2	27,05	0,00	27,05	0,00	30,00	0,00
C3	13,90	12,30	26,2	46,95	15,92	14,08
C4	29,78	10,77	40,55	26,56	22,04	7,96

Tomando-se como modelo o tratamento A₂, 0,5 g das diferentes frações polissacarídicas obtidas por fracionamento da goma bruta, foram tratadas com 0,5 mL de epicloridrina (12,38mol/L) e 4,0 mL de NaOH 3mol/L e as matrizes obtidas, utilizadas para montar colunas cromatográficas para isolamento, por afinidade, de lectinas ligantes de galactose.

Quando colunas cromatográficas foram montadas com as matrizes preparadas, tanto de endosperma total como das frações polissacarídicas, foram obtidos diferentes volumes, devido a diferenças na capacidade de intumescimento das mesmas (Tabela XII). Esta característica de intumescer depende do modo como a matriz foram reticuladas o que, em última análise, está relacionado com a ramificação do polissacarídeo.

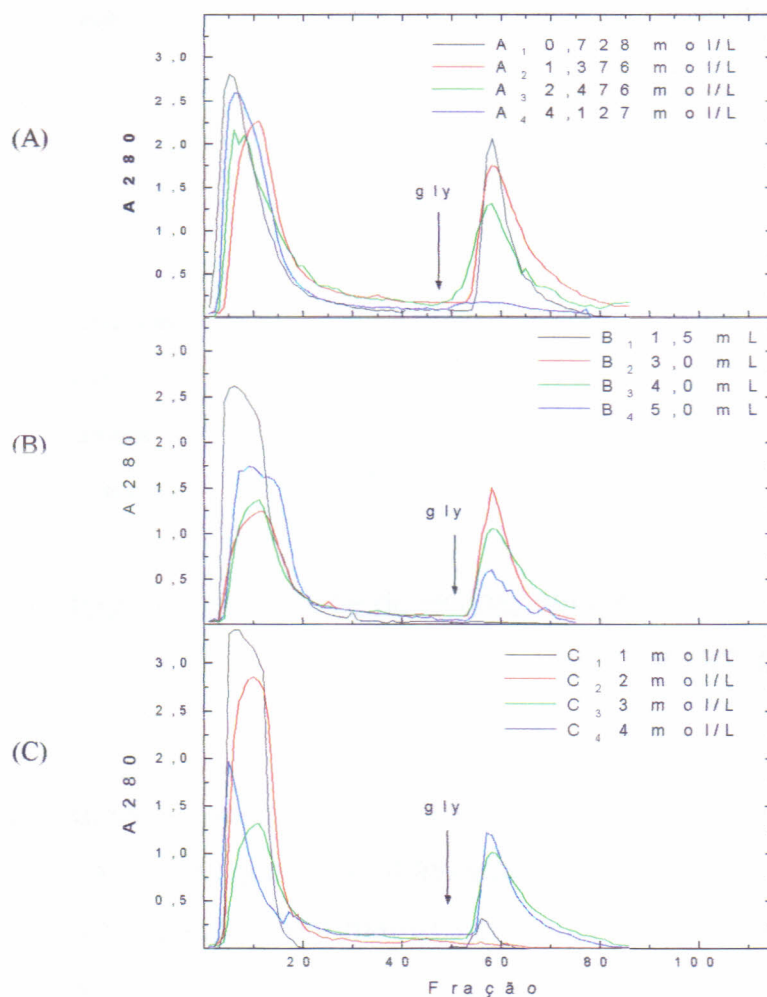


Figura 27. Cromatografia de afinidade em coluna de goma endospermica de *Parkinsonia aculeata* L. reticulada com diferentes concentrações de epicloridrina (A), volumes de NaOH 3mol/L (B) e concentração de NaOH (C). Amostra: fração rica de *Artocarpus integrifolia* (30mg/2mL). Eluição: solução de NaCl 0,15 mol/L seguido de tampão glicina-HCl 0,1 mol/L pH 2,6 contendo NaCl 0,15 mol/L.

TABELA XII. Comparação de volumes ocupado pelas frações polissacarídicas de *Parkinsonia aculeata* L., tratadas com epicloridrina e suspensa em NaCl 0,15 mol/L*

Fração	Volume final mL
P ₁	7.6
P ₂	10.2
P ₃	10.9
P ₄	1.3
Goma bruta	7.0
Guar	5.1
Carolina	6.1

*a partir de 0,5 g

VI.8. Cromatografia de afinidade de lectinas em colunas preparadas com matrizes de galactomananas de *Adenantha pavonina*, *Cyamopsis tetragonolobus* e *Parkinsonia aculeata*.

No intuito de avaliar o comportamento da goma bruta de *Parkinsonia aculeata* comparando-a com as gomas de *Adenantha pavonina* e *Cyamopsis tetragonolobus* foram montadas colunas com matrizes preparadas com estas gomas seguindo-se o tratamento A₂.

Os resultados obtidos para lectinas brutas de *Artocarpus integrifolia*, *Artocarpus incisa* e *Abrus precatorius* são mostrados nas Figuras 28 e Tabela XIII onde pode-se observar que embora seja capaz de isolar as diferentes lectinas, a goma de *Parkinsonia aculeata* é menos eficiente que as outras duas. Por outro lado, pode-se observar que as lectinas de *Abrus precatorius* não foram isoladas eficientemente em nenhuma das colunas preparadas com as três galactomananas empregadas como suportes.

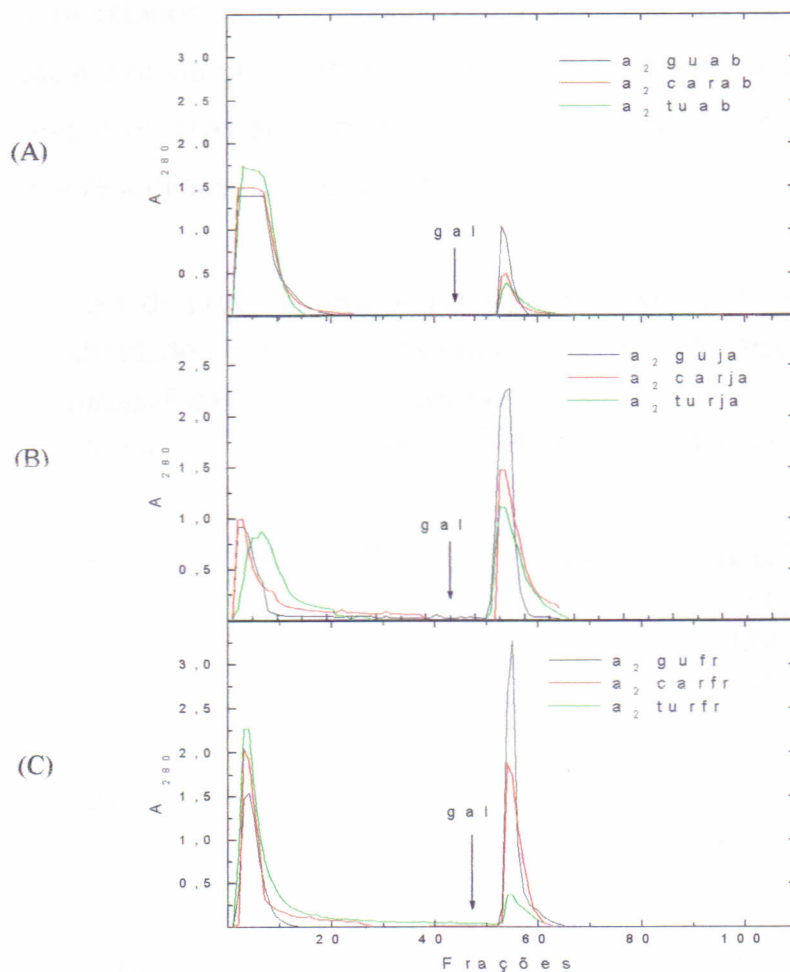


Figura 28. Cromatografia de afinidade em coluna de gomas endospérmica de *Cianopus tetragonolobus* (guar), *Adenantha pavonina* (carol), *Parkinsonia aculeata* (turco) no tratamento A_2 . Amostra: frações rica de lectina de *Abrus precatorius* (A); *Artocarpus integrifolia* (B); e *Artocarpus incisa* (C) (30 mg/2mL). Eluição: solução de NaCl 0,15 mol/L seguido de solução de galactose 0,2 mol/L contendo NaCl 0,15 mol/L.

VI.9. Cromatografia de afinidade de lectinas em colunas preparadas com frações polissacarídicas endosperma de *Parkinsonia aculeata*

Os resultados obtidos, quando frações protéicas ricas em lectinas foram submetidas a cromatografia de afinidade em colunas preparadas com as várias frações polissacarídicas endospermicas de *Parkinsonia aculeata* são mostrados na Figura 29, e resumidos na Tabela XIII.

TABELA XIII. Teor de proteína (em DO) dos picos obtidos por cromatografia de afinidade de frações ricas em lectinas de *Artocarpus incisa*, *Artocarpus integrifolia* e *Abrus precatorius*

Lectina	Matriz	PI	PII	PI+PII	PII (%)	PI	PII
						Corrigido	Corrigido
Abrus	Guar	12.086	2.732	14.818	18,44	12.234	2.766
	Carolina	12.341	1.669	14.011	11,92	13.212	1.788
	Turco	13.176	1.762	14.938	11,80	13.230	1.770
A incisa	Guar	6.488	8.391	14.879	56,40	6.540	8.460
	Carolina	7.135	6.334	13.469	47,03	7.055	7.055
	Turco	11.192	1.491	12.284	11,75	13.237	1.763
A integrifolia	Guar	4.234	8.997	13.231	68,00	4.800	10.200
	Carolina	4.623	7.646	12.269	62,32	5.652	9.348
	Turco	7.816	6.988	14.804	47,21	7.918	7.082
Abrus	Fração 1	14.370	0.588	14.957	3,93	14.411	0.589
	Fração 2	14.635	0.193	14.829	1,30	14.804	0.196
	Fração 3	14.788	0.058	14.846	0,39	14.942	0.058
	Fração 4	14.663	0.092	14.955	0,62	14.906	0.094
A integrifolia	Fração 1	8.277	4.623	12.900	35,84	9.642	5.358
	Fração 2	12.280	2.401	14.691	16,34	12.549	2.451
	Fração 3	12.359	1.955	14.313	13,66	12.951	2.049
	Fração 4	12.474	0.715	13.189	5,42	14.187	0.813
A incisa	Fração 1	9.548	4.431	13.979	31,70	10.245	4.755
	Fração 2	11.879	2.239	14.118	15,86	12.621	2.379
	Fração 3	12.109	1.041	13.150	7,92	13.813	1.187
	Fração 4	12.108	0.784	12.892	6,08	14.088	0.912

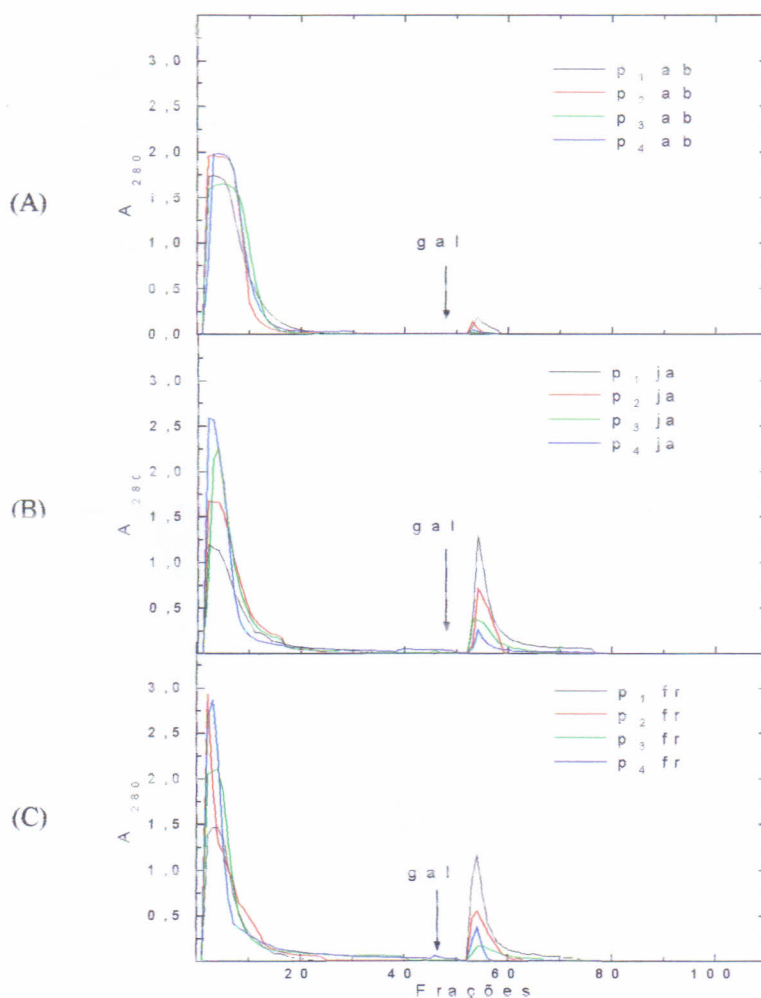


Figura 29. Cromatografia de afinidade em coluna de gomas endospérmica de frações: 1, 2, 3 e 4 *Parkinsonia aculeata* (turco) no tratamento A₂. Amostra: frações rica de lectina de *Abrus precatorius* (A); *Artocarpus integrifolia* (B); e *Artocarpus incisa* (C) (30 mg/2mL). Eluição: solução de NaCl 0,15 mol/L seguido de solução de galactose 0,2 mol/L contendo NaCl 0,15 mol/L.

Analisando-se os resultados obtidos, verifica-se que a fração 1 mostrou-se mais eficiente que as demais, no isolamento das lectinas testadas. É interessante notar que esta fração, quando analisada quanto à sua relação manose:galactose demonstrou uma maior ramificação, proporcionando, assim, mais sítios galactose disponíveis, e estão de acordo com os resultados obtidos para as colunas reticuladas com o gel de guar e de carol.

VI.10 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Para avaliar a capacidade das colunas de reterem apenas as lectinas os picos correspondentes foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS e β -mercaptoetanol. O resultado obtido é apresentado nas Figuras 30 e 31 onde se observa que apenas as bandas correspondentes às lectinas foram encontradas.

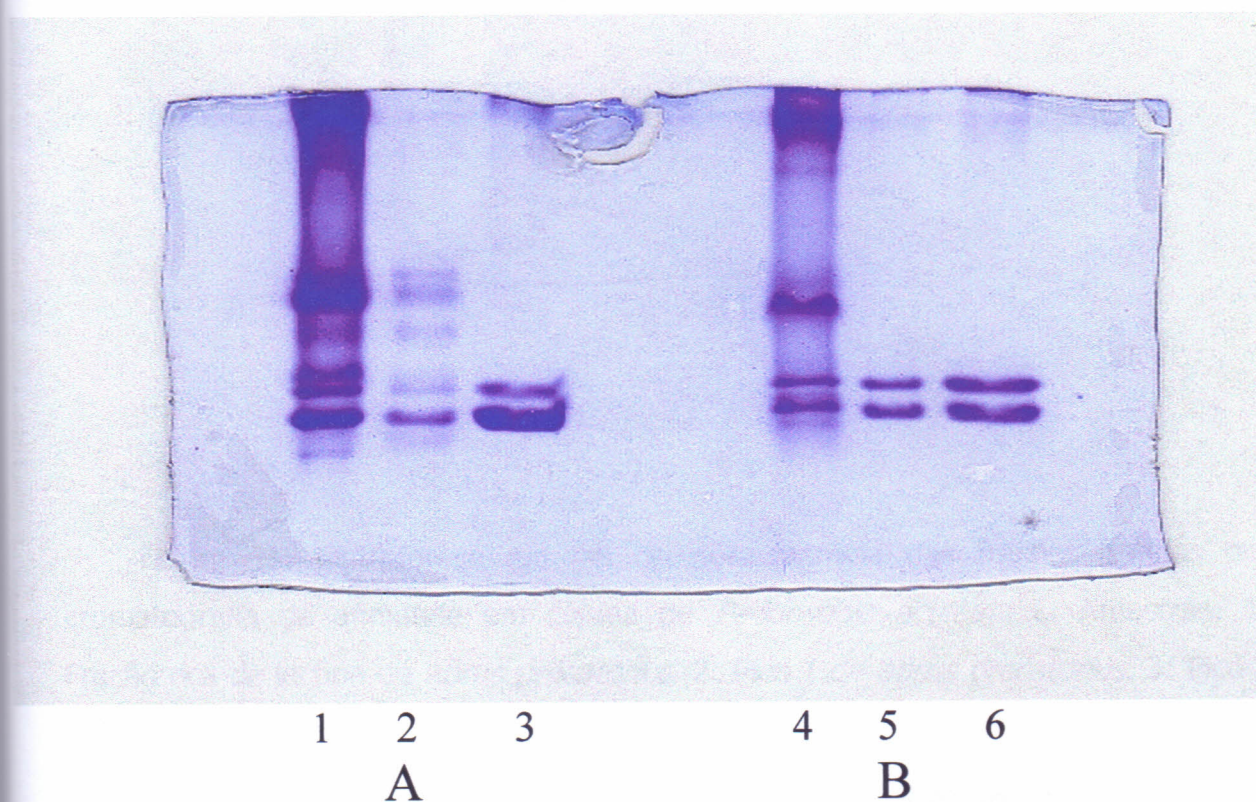
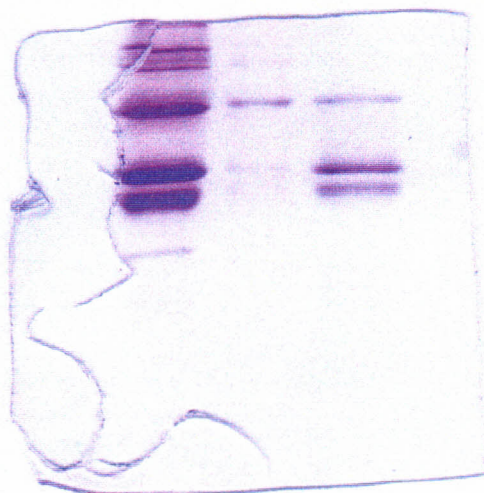


Figura 30: Eletroforese em gel de poliacrilamida das frações obtidas por cromatografia de afinidade em coluna de *Parkinsonia aculeata* L. Amostras: (A) 1: Fração rica de lectina de *artocarpus integrifolia*, 2: Pico 1 de *artocarps integrifolia*, 3: Pico 2 de *artocarps integrifolia*. (B) 4: Fração rica de lectinas de *Artocarpus incisa*, 5: Pico 2 de *Artocarpus incisa*, 6: Pico 2 de *Artocarpus integrifolia*



1 2 3

Figura 31: Eletroforese em gel de poliacrilamida das frações obtidas por cromatografia de afinidade em coluna de *Parkinsonia aculeata* L. Amostras: 1: Fração rica de lectina de *abrus precatorius*, 2: Pico 1 de *abrus precatorius*, 3: Pico 2 de *Abrus precatorius*.

Na Figura 30 (A) observou-se que a lectina de *Artocarpus integrifolia* foi resolutiveamente purificada, o que é demonstrado pela presença de duas bandas correspondentes ao ponto de aplicação da amostra (3).

Na figura 30 (B) é evidente a presença de duas bandas proteicas no ponto de aplicação (5), correspondentes a lectina purificada de *Artocarpus incisa* (pico retido na coluna) e de *Artocarpus integrifolia* no ponto de aplicação (6).

Na figura 31, no ponto de aplicação (3) da amostra, observa-se a presença de bandas proteicas que correspondem à lectina de *Abrus precarorius* purificada.

É evidente que este experimento demonstra que essas lectinas foram isoladas e purificadas na coluna em estudo.

VII. RESUMO DOS RESULTADOS

VI. RESUMO DOS RESULTADOS

Todos os polissacarídeos isolados são estruturalmente formados de unidades de D-manose e D-galactose, portanto denominados galactomananas. Verificou-se que os polissacarídeos apresentam variabilidade quantitativa/proporcional, de (manose:galactose), sugerindo a presença de uma família de galactomanana na mesma semente.

Os polissacarídeos (galactomananas), quimicamente modificados e transformados em matrizes cromatográficas de afinidade apresentaram diferentes graus de eficiência resolutiva no isolamento das lectinas ligantes de galactose (*Artocarpus integrifolia*, *Artocarpus incisa* e *Abrus precatorius*).

Sob as condições experimentais do tratamento A₂ de reticulação para galactomanana de guar, carolina e turco foi observado que o volume das colunas é maior para galactomananas menos substituídas por outro lado a eficiência cromatográfica para afinidade com lectinas de sementes *Artocarpus integrifolia*, *Artocarpus incisa* e *Abrus precatorius* está relacionada com a maior quantidade de galactose na galactomanana original.

Os polissacarídeos totais e aqueles obtidos em sequência de goma endospermica de *Parkinsonia aculeata* podem ser utilizados como matrizes cromatográficas de afinidade, com exceção daquele extraído com solução de hidróxido de sódio (fração 4).

A viscosidade intrínseca da fração 1 em água é de 428,87 mL/g e em solução de NaCl mol/g é de 532,9.

A Massa molecular ponderal média da fração 1 é de 775700 g/mol. A massa molecular numérica média 272.400 g/mol. Todas determinadas por GPC. Estes dados indicam polidiversidade para este polímero.

VIII. CONCLUSÃO

VII. CONCLUSÃO

Os polissacarídeos de gomas endospermicas de *Parkinsonia aculeata* demonstraram significativa capacidade de isolar lectinas ligantes de galactose.

IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRAWAL, B.B. & GOLDSTEIN, I.J. (1965). Specific binding of Concanavalin A to cross-linked dextran gels. **The Biochemical Journal**, **96**: 23-25.
- AHUJA, M. & RAI, A. K. (1997). Adsorption studies with some chelating ion exchange resins derived from guaran. **Carbohydr. Polym.**, **v.33**, p.57-62, 1997, citado por REICHER, F. (1998).
- AMARAL, J., FREITAS, R.A., GANTER, J.L.M.S., SIERAKOWSKI, M. R. (1998). The Xanthan-Galactomannan System: Rheological Properties. **Natural Fibers**. Poznan, p. 110-111.
- ANDERSON, D.M.W. & McDOUGALL, F.J. (1987). **Food Hydroc.** **1**, 327, citado por PAULA (1990).
- APPUKUTAN, P. S., SUROLIA, A. & BACHHAWAT, B. K. (1977). Isolation of two galactose binding protein from *Ricinus communis* by affinity chromatography, **Indian J. Biochem. Biophys.** **14**: 382 - 384.
- ASPINALL, G. O. (1982). Isolation and fractionation of polysaccharides. In: **The Polysaccharides. Vol.1**, Academic Pres., New York, p. 19-26.
- BAETHGEN, W. E. & ALLEY, M. M. (1989). A manual colorimetric procedure for measuring ammonium nitrogen in soil and plant Kjeldahl digests. **Commun. in Soil Sci. Plant. Anal.**, **20** (9 e 10): 961-969.
- BANWELL, J.G., HOWARD, R., COOPER, D. & COSTERTON, J.W. (1985). Intestinal microbial flora after feeding phytohemagglutinin lectins. **Applied and Environmental Microbiology** **50**, 68-80.

- BARDOEZ, S., EWEN, S.W.B., GRANT, G., STEWART, J. C. DUGUIO, J.T. PEUMANS, W.J., Van DAMME, E. J. M. & PUSZTAI, A. (1993). A Dietary lectin induced growth and changes in sugar receptor expression in the rat small intestine Biological effects of lectins. In: BASU, J., KUNDU, M., & CHAKRABARTI, P. **Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry**, **9**, p. 123-130.
- BARROSO, G. M., MORIN, M. P., PEIXOTO, A. L., IDROSO, C. L. F. (1999). Frutos e sementes. Morfologia aplicada a sistemática de dicotiledôneas. Editora UFV, Viçosa, 443p.
- BEATHGEN, W.E. & ALLEY, M.M. (1989). **Sci Plant Anal**, 20:961-969
- BENEVIDES, N.M.B., LEITE, A. M., FREITAS, A. L. P. (1996) Atividade hemaglutinante na alga vermelha *Solieria filiformis*. **R. Bras. Fisiol. Veg.**, **8(2)** 117-122.
- BENEVIDES, N.M. B., SILVA, S. M. de S., MAGALHÃES, S. R., MELO, F. R., FREITAS, A.L.P. & VASCONCELOS, I. M. (1998). Proximate analysis, toxic and antinutritional factors of tem brasilian marine algae. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, **10(1)**, 31-36.
- BENEVIDES, N.M.B. & OLIVEIRA, S.R.M. (1999). Seasonal variations in hemagglutinating activity and chemical composition of two red Marine algae *Gracilaria domigensis* and *Gelidium pusillum*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, **11 (2)**: 91-95.
- BEWLEY, J. D. & BLACK, M. (1986). Seeds germination structure and composition. In: Seeds physiology of development and germination, New York. Plening Pre, p. 1-27.

- BLUNT, H. G. (1926). Gum Arabic. **Encyclopedia of Chemical Technology**, 12: 4, John Wiley & Sons, 1980. Oxford University Press, citado por PAULA (1990).
- BOURNE, Y., ZAMBONI, V., BARRE, A., PEUMANS, W., VAN DAMME, E. J. M. & ROUGE, P. (1999). *Helianthus tuberosus* lectin reveals a widespread scaffold for mannose-binding lectins. **Structure**, 7: 1473-1482.
- BRADFORD, M. M. (1976). A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.**, 72, 248-254.
- BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará**. 3a, edição comemorativa do II Congresso Brasileiro de Florestas Tropicais. Mossoró 18 a 24 de julho de 1976.
- BRESOLIN, T. M. B. (1988). **Propriedades físico-químicas de biopolímeros: xantana/galactomananas**. Tese de Doutorado em Bioquímica. Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Ceará, Curitiba.
- BROEKAERT, W.F., NSIMBA-LUBAKI, M., PEETERS, B. & PEUMANS, W. (1984) A lectin from elder (*Sambucus nigra* L.) bark. **Biochemical Journal**, 221: 163-169.
- BUCKERIDGE, M.S., PANEGASSI, V.R., ROCHA, D.C. and DIETRICH, S.M.C. (1995). Seed galactomannan in the classification and evolution of leguminosae. **Phytochemistry**, v. 38: (4), p. 871-875.
- CARON, M. CHADLY, A., SÈVE, A.P., LUTOMSKI, D. BLADIER, D. & JOUBERT-CARON, R. (1997). Review Glycobiology **International Journal of Bio-Chromatography (I.J.B.C.) v. 3** (2), pp. 11-122.

- CHURMS, S. C., STEPHEN, A. M. & STEYN, C. B. (1986). **Phytochemistry**, **25**: 2807, citado por PAULA (1990).
- CIUCANU, J. KEREK, F. A. (1984). Simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. **Carbohydr. Res.** **131**: 209-217.
- CLARK, A.H.; DEA, I.C.M. & McCLEARY, B.V. (1986). The effect of galactomannan fine structure on their interaction properties. In: PHILIPS, G.O.; WEDLOCK, D.J. & WILLIAMS, P.A. (Ed). **Gum and stabilizers for the food industry**. Elsevier Applied Science Publishers, London. p. 429-440.
- CORRÊA, J. B. C. (1971). Métodos químicos para determinação de estrutura de polissacarídeos Notas de aula, 62 p.
- COSTA, F.H.F., SAMPAIO, A. H., NEVES, S.A., ROCHA, M.L.A., BENEVIDES, N.M.B. & FREITAS, A. L.P. (1999). Purification and characterization of a lectin from the Red Marine Alga *Amansia multifida*. **Physiol Mod. Biol. Plants**, **5**: 53-61.
- CUATRECASAS, P., WILCHECK, M. & ANFISEN, C. R. (1968). **Biochemistry**, **61**: 636, citado por SPADARO, A.C.C. & FONSECA, M.J.V. (1993).
- CUI, W. ESKIN, N.A.M., BILIADERIS, C. G. & MAZZA, G. (1995). Synergistic interactions between yellow mustard polysaccharides and galactomannans. **Carbohydr Polym.**, **v. 27**, p. 123-127.
- DANGUY, A., DECAESTECKER, C., GENTEN, F., SALMON, I. & KISS, R. (1998). Applications of lectins and neoglycoconjugates in histology and pathology. **Acta. Anat.** **161**:206-218.

- DEA, I. C. M. & MORRISON, A. (1975). Chemistry and interruptions of seed galactomannans. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.**, **31**: 241-312, citado BUCKERIDGE (1995).
- DEA, I. C. M., MacKINNON, A. A. & REES, D. A. (1972). Tertiary and quaternary in aqueous polysaccharide systems with model cohesion: reversible changes in conformation and association of agarose, carrageenan and galactomannans. **J. Mol. Biol.**, **68**: 153-172.
- DEA, I.C.M.; CLARK, A.H. & McCLEARY, B.V. (1975) Effect of galactose-substitution-patterns on the interactions properties of galactomannans. **Carbohydr. Res.** **v.147**, p. 275-294, citado por REICHER (1998).
- DEA, I.C.M., CLARK A. H. & McCLEARY, B. V. (1986). Effect on the molecular fine structure of galactomannans on their interaction properties the role of unsubstituted sides. **Food hidrocolloids 1(2)**, 129-140.
- DETERMANN, H. (1969). Gel filtration. Gel permeation. Molecular sieves. In: Gel Chromatography. 2^a ed. Springer-Verlag. New York, 202 pp., citado por TAVARES (1998).
- DEY, P.M. (1978). Biochemistry of Plant Galactomannans. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem**, **35**: 341-376.
- DIAZ, C.L., MELCHERS, L.S., HOOYKAAS, P.J.J., LUGTENBERG, B.J.J. & KIJNE, J.W., (1989). Root lectin as a determinant of host-plant specificity in the *Rhizobium* legume symbiosis. **Nature**, **338**: 579-581.
- DUBEY, P., & GUPTA, P. C. (1979). A new water-soluble polysaccharide from the seeds of *Cassia multijuga*. **Carbohydr. Res.**, **v. 72**, p151-155, citado por REICHER (1998).

- DEBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P. A., SHITH, F.(1956). Colorimetric method for determination of sugar and related substances. **Analytical Chem.**, **28(3)**, 350-356.
- ELFSTRAND, M. (1897). Über Giftig Eiweisse Welche Blutkörtchen. Verkleben. Thesis, Uppsala, citado por Koucorek (1986).
- EHRlich, P. (1981b). Experimentelle Untersuchungen über Immunität II. Über Ricin **Dtsch. Med. Wschr**, **17**, **1218-1219**, citado por Gold & Balding, 1975.
- ETZLER, M.E. (1985). Plant lectins molecular and biological aspects. **Ann. Rev. Plant. Physiol.** **36**: 209-234.
- FABREGAS, J. MUNOZ, A., LLOVO, J. & CARRACEDO, A. (1988) – Purification and partial characterization of tomentine: an N-acetylglucosamine-specific lectin from the green alga *Codium tomentosum* (Huds) Stackh **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, **124**:21-30.
- FERREIROS, C. M. & CRIADO, M.T. (1983). Purification and partial characterization of a *Fucus vesiculosus* agglutinin. **Revista Española de Fisiología**, **39**, p. 51-60.
- FISCHER, J. FAKLA, I., JOUBERT-CARON, R. & CARON, M. (1994). Lactoseries of glycoproteins as extracellular matrix components between some nervous and their glial envelope. In VAN DRIESSE, E., FISCHER, J., BEECKMANS, S. & BOGHANSEN, T. C. (1994). *Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*, textop, Hellerup (Denmark), 374pp.
- FLODIN, P. (1962). Dextran gels and their applications in gel filtration. **Dissertation** 85 pp., AB Pharmacia, Uppsala, Sweden.

- FREEMAN, H. J. (1983). Lectin histochemistry of 1,2-dimethylhydrazine-induced rat calon neoplasia – **J. Histochem. Citochem.**, **31:n 1241-1245**
- FUGITA, Y, OISHI, K., SUZUKI & IMAHORY, K. (1975). Purification and properties of Anti-B hemagglutinin produced by *Streptomyces sp.* **Biochemistry**, **14**: 4465-4470.
- GANTER, J.L.M.S, HEYRAUD, A., PETROWICZ, C.L.O., RINALDO. M. & REICHER, F. (1995). Galactomannans from Brazilian seeds: characterization of the oligosaccharides produced by mild acid hydrolysis. **Int. J. Biol. Macromol. V.17** n. 1: 13–19.
- GANTER, J. L. M. S., ZAWADZKI-BAGGIO, S. F., LEITNER, S. C. S., SIERAKOWSKI M. R. & REICHER, F. (1993). Structural studies on galactomannans from Brazilian seeds. **J. Carbohydr Chem.**, **V. 12**, n. 6, p.753 – 767.
- FREITAS, A. L. P., TEIXEIRA, D. I. A., COSTA, F.H.F, FARIAS, W.R.L. LOBATO, A.S.C. SAMPAIO, A.H. & BENEVIDES, N.M.B. (1997). A new survey of Brazillian marine algae for agglutinins. **Journal of Applied Phycology** **9**:495-501.
- GANTER, J.L.M.S., MILAS, M., CORRÊA, J.B.C., REICHER, F. & RINAUDO, M. (1992). Study of solution properties of galactomannan from the seeds of *Mimosa scabrella*. **Carbohydr. Polym. V 17**, p. 171-175.
- GARETH JONES, E.G. (1994). Fungal adhesion. **Mycol. Res**, **98**:961-981.
- GERMANO, S. (1996). Heparinóides produzidos por modificação química em galactomananas de sementes de *Cassia fastuosa* Wild e *Mimosa scabrella* Bentham. Curitiba. Tese (Mestrado em Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

GOLDSTEIN, I. J., HUGUES, R. C., MONSIGNY, M. OSAWA, T. & SHARON, N. (1980).
What should be called a lectin. **Nature**, **285**: 66

GOLDSTEIN, I.J. & PORETZ, R.D. (1986) – Isolation, physicochemical, characterization, and carbohydrate-binding specificity of lectins. In: LIENER, I.E. SHARON, N. & GOLDSTEIN, I. J. eds. The lectins: Properties, Functions, and Application in Biology and Medicine. Academic Press, Inc. 600 p.

GONÇALVES, M. P., GOMES, C., LANGDON, M. J., VIEBKE, C., WILLIAMS, P. A. (1997). Studies on k-carrageenan/locust bean gum mixtures in the presence of sodium chloride and sodium iodide. **Biopolymers v. 41**, n. 6, p. 657-671, citado por REICHER (1998).

GORIN, P. A. J. & MAZUREK, M. (1975). Further studies on the assignment of signals in ^{13}C magnetic resonance spectro of aldoses and derived methyl glycosides. **Com. J. Chem. V. 53**, p 1212-1223.

GRANT, G., MORE, I.J., MCKERIZIE, N.H., STEWART, J.C. and PUSZTAI, A. (1983)
In: Pusztai, A., Grant, G. and Oliveira, T.A. Local (gut) and systemic responses to dietary lectins. **IRCS Medical Science, v. 14** p. 205-208, 1986.

GRANT, G., WATT, W.B., STEWART, J.C. & PUSZTAI, A. (1987). Effects of dietary soyabean (*Glicine max*) lectin and trypsin inhibitors upon the pancreas of rats. **Medical Science Research, 54**, p. 337-346.

GRANGEIRO, T.B., (1996). Clonagem, sequenciamento e expressão do gen da lectina (Con Br) de sementes de *Canavalia brasiliensis*. Tese de Doutorado – Fortaleza – Ceará.

GUPTA, D. S.; JANN, B.; BAJPAI, K. S. & SHARMA, S. C. (1987). Structure of a galactomannan from *Cassia alata* seed. **Carbohydr. Res., v. 162**, p. 271-276.

- GURHA, S. G. & SINGH, L. (1988). Structural studies of D-galacto-D-mannan from the seeds of *Parkinsonia aculeata* Linn. **Carbohydr. Res.** **V**, 182, p. 144-149.
- GYNTHER, J. & HUHTIKANGAS (1984). A. Guar gum, chemistry and applications. **Acta Pharm. Fenn.**, **93**: 175-184.
- HAMMARSTROM, S. (1977). Snail (*Helix pomatia*) hemagglutinin. **Methods in Enzymology**, **25**:368-382.
- HARRIS, E. L. V. e ANGAL, S. (1995). Protein Purification Applications: A practical approach. The Practical Approach Series. Oxford University Press. U K.
- HARTRE, E. F. (1972), Determination of protein: a modification of the lowry method that gives a linear photometric response. **Anal Biochem.**, **v. 48**, p. 422-427.
- HATA, T., MUKUNAKI, Y., TSUKAMOTO, I., MIYOSHI, M. & HASEGAWA, K. (1984). In: Pusztai, A., Grant, G. & Oliveira, T. A. (1986). Local (gut) and systemic responses to dietary lectins. **IRCS Medical Science**, **v.14**, p. 205-208.
- HEDO, J. A. HARRINSON, L. C. & ROTH Jr. (1981). Binding of insulin receptors to lectins.
- HELLIN, H. (1891). Der giftig Eiweisskorper Abrin und dessen wirkung auf das Blut. Thesis, Dorpat, citado por GOLD & BALDING (1975).
- HELM, R.M. & FROESE, A. (1981). Binding of the receptors for IgE by various lectins. **International Archives of Allergy and Applied Immunology**, **65**. 81-84, citado por MUNIZ-FILHO (1997).

- HUGGINS, M. (1942). Theory of solutions of high polymers. **J. Am. Chem. Soc.**, v. **64**, p. 1712.
- INBAR, J. & CHET, I. (1997). Lectins and Biocontrol. **Critical Reviews in Biotechnology**, **17(1)**: 1-20.
- KENNEDY, J. F. & WHITE, C. A. (1988). em **Carbohydrate Chemistry**, Clarend Press Oxford. New York.
- KILLPATRICK, D.C., PUSZTAI, A. GRANT, G. GRAHAN, C. & EWEN, S.W.B. (1985). Tomato lectins resist digestion in mammalian alimentary canal and binds to intestinal villi without deleterious effects. **FEBSLETTERS**, **185**, 299.
- KOCOUREK, J. & HOREJSI, V. (1981). Defining a lectin. **Nature**, **290**:188pp.
- KOSHTE, V.L. DJIK, W.V.; VAN DER STELT, M.E. & AALBERSE, R.S. (1990) – Isolation and characterization of BanLec-I, a mannoside – binding lectin from *Musa paradisiaca* (Banana). **Biochem. J.**, **272**, 721-726.
- LAEMMLI, U.K.(1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, **227**: 680-685.
- LANDSTEINER & RAUBITSCHCK (1907). Beobachtungen uber Hamolyse and Hemagglutination. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 45 p. 660.
- LAPASIN, R., DE LORENZI, L., PRICL, S. & TORRIANO, G. (1995) - Flow properties of hydroxypropyl guar gum and its long – chain hydrophobic derivatives. **Corbohydr. Polym.**, v. **28**, p. 195 – 202, citado por REICHER (1998).

- LIENER, I. E., SHARON, N. & GOLDSTEIN, I.J. (1986). The Lectins. Properties, Functions and Applications. In: **Biology and Medicine, 600**, pp., Academic Press. Inc. New York, citado por RAMOS (1996).
- LIS, H. & SHARON, N. (1986) Application of lectins in Liener, I.E. Sharon, N. & Goldstein, I.J. **The Lectins: properties, functions, and applications in biology and medicine**. Academic Press, Inc. New York.
- LIS, H. & SHARON, N. (1998) Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins that mediate cellular recognition. **Chem. Rev., 98**, 637-674.
- LUCK, K. EHWALD, R., ZISKA, P. & KOPPITZ, H. (1992). Affinity sorbent da galactose-specific lectins consisting off deproteinized plant cell wall ghosts. **Plant Science, 82**, 29-35
- LUNDIN, L. & HERMANSSON, A-M. (1995-a). Supermolecular aspects of xanthan locust bean gum gels based on rheology and electron microscopy. **Carbohydr Polym. v. 26**, p 129-140-a.
- LUNDIN, L. & HERMANSSON, A.M. (1995b). Influence of locust bean gum on the rheological behavior and microstructure of k-carrageenan. **Carbohydr. Polym. V. 28** p. 91-99.
- MAKELA, D. , (1957). Studies in haemagglutinins of Leguminosae seeds. **Annals of Medical and Experimental Biology Fenn. 35**: S 11, 1-156.
- MANOCHA, M. S. & CHEN, Y. (1990). Specificity of attachment of fungal parasites to their hosts **Can. J. Microbiol, 36**: 69-76, citado por INBAR & CHET (1997).
- MANOCHA, M.S. (1990). Cell-cell interaction in fungi. **J. Plant. Dis. Prot., 97**: 655-669.

- MANOCHA, M. S. & SAHAI, A. S. 1993. Mechanisms of recognition in necrotrophic and biotrophic mycoparasites. *Can. J. Microbiol* **39**, 269-275.
- MANTELL, C. L. (1947). **The Water - Soluble Gums**, Reinhold Publishing Corporation, citado por PAULA (1990).
- MANZI, A.E. & MANZINI, M.N. & CERESO, A.S. (1984). The galactomannan system from the endosperm of the seed of *Gleditsia triacanthos*. **Carbohydr. Res. v. 125**, p. 127-143.
- MARBAN-MENDONZA, N., JEYAPRAKASH, A., JANSSEON, H.-B., DAMON, Jr. R.A. & ZUCKERMAN, B.M. (1987). Control of root-knot nematodes on tomato by lectins **J. Nematol. 19**, 331-335.
- MATHESON, N.K. (1990). Mannose-based polysaccharides In: **Methods in Plant. Biochemistry.** (ed) DEY, P.M. & HARBONE, J.B. London Academic Press limited,: **Carbohydrates, v. 2**, p. 371-413.
- MATHUR, R. & MATHUR, H.K. (1992). Chemically modified guar gum (galactomannan) having emulsion stabilising properties In: PHILLIPS, G.O., WILLIAMS, P.A, WEDLOCK, D.J. **Gums and Stabilisers for the food industry. 6** Oxford: IRL Press. p. 379-382, citado por REICHER (1998).
- MORAES, S. D. M. (1992). **Purificação, caracterização parcial e estudos preliminares de mobilização durante a germinação da lectina de *Erythrina velutina* forma aurantiaca (Ridley) Krufoff.** Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, 109 pp., Fortaleza.

- MOREIRA, R. A. & OLIVEIRA, J.T.A. (1983a). Comparative studies of seed proteins of the genus *Artocarpus* with respect to lectins. **Biologia Plantarum**, **25** (5): 336-342.
- MOREIRA, R.A. & OLIVEIRA, J.T.A. (1983b). Lectins from the genus *Artocarpus* **Biologia Plantarum**, **25** (5): 343-348.
- MOREIRA, R. A, AIHOUZ, I. L., OLIVEIRA, J. A.T. & CAVADA, B. S., (1991). Plant lectins, chemical and biological aspects. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 86 (II): 211-218.
- MOREIRA, R. A. (1998). **Lectinas vegetais: uma abordagem química e físico-química. Tese de Titular.** Universidade Federal do Ceará, 600p.
- MOREIRA, R. A., BARROS, A. C. H., STEWART, J. C. & PUSZTAI, A., (1983). Isolation and characterization of a lectin from the seeds of *Dioclea grandiflora* (Mart). **Planta**, **158**: 63-69.
- MOREIRA, R.A., CORDEIRO, E.F. CAVADA, B.S. NUNES, E.P., FERNANDES, A.G. & OLIVEIRA, J.T.A., (1993). Plant lectins A possible marker for chemotaxonomy of the genus *Canavalia* **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, **5** (2): 127-132.
- MOREIRA, R.A. MONTEIRO, A.C.O. HORTA, A.C.G. OLIVEIRA, J.T.A. & CAVADA, B.S., (1997). Isolation and characterization of *Dioclea altissima* var. megacarpa seed lectin **Phytochemistry**, **46**(1):139-144.
- MOREIRA, R. A. & PERRONE, J. C., (1977). Purification and partial characterization of a lectin from the seeds of *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiology**, **v. 59**, p. 783-787.

- MUNIZ-FILHO, W.E. (1997). **Estudo comparativo de representantes do sub-tribo *Diocleinae* (*Leguminosae-Phaseoleae*) usando lectinas de sementes como modelo.** Tese de Mestrado, apresentada ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará. P.124. Fortaleza.
- NICHOLSON, R. L. & EPSTEIN, L. (1991). Adhesion of fungi to the plant surface: prerequisite for pathogenesis. In: *The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals*. P. 3-23. Cole, G. T. and Hoch. H. C., Eds., Plenum Press. New York.
- NOWEL, P.C. (1960). Phytohemagglutinins an initiator of mitosis in culture of animal and human leukocytes. **Cancer Res.**, **20**, 462p.
- PARSONS, D. F. & SUBJECK, J.R. (1972). The morphology of the polysaccharide coat of mammalian cells. *Biochimica, Biophysica. Acta*, **265**: 85-113, citado por DAWIDOWICZ (1975).
- PAULA, R. C. M. (1995). **Characterization of Brazilian Tree Exudate Gums from *Anacardium occidentale* and *Anandenanthera macrocarpa* B.** Tese de Doutorado apresentada ao Departamento de Química da Universidade de Manchester, 169 pp., Oxford Road.
- PETROWICZ, C. L. O. (1993). **Biopolímeros da semente de *Schizolobium amazonicum* (PINHO CUIABANO): galactomananas e arabinanas.** Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, 106 pp. Curitiba.
- PEUMANS, W.J. & VAN DAMME, E.J.M.. (1993). Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**, **109**: 347-352.

- PHARMACIA BIOTHEC (1995). **Gel Filtration, Theory and Practice** Pharmacia - LKB Biotechnology, Upssala, Sweden.
- PETKOWICZ, C.L.O; SIERAKOWSKI, M.R.; GANTER, J.L.M.S. REICHER, F. (1998). Arabinans from the Braziliam seeds *Phytochemistry*. **49**(3). P. 737-743.
- PINTO, F.S.C. (1987) – **Isolamento e caracterização das lectinas de sementes de *Artocarpus incisa* L. Var. seminífera**. Tese de Mestrado apresentada ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 125p.
- POWER, O. & CAMBIER, O. (1889). On the chemical constituents and poisonous principles of the bark of *Robinia pseudoacacia*. Read before the Winskonsin Academy of Sciences, **Arts and Letters**, Dec 27th, 1889, Pharmac. Redsch p. 29, citado por GOLD & BALDING (1975).
- PRESTON R.D. (1979). Polysaccharide conformation and cell wall function. **Ann. Rev. Plant. Physiol. v. 30**, p. 55-78.
- PUSZTAI, A., WATT, W. B. and STEWART, J. C. (1991). A comprehensive scheme for isolation of trypsin inhibitors and the agglutinin from soybean seeds. **J. Agric. Food Chem. 39**: 862 – 866.
- PUSZTAI, G., GRANT, G. and OLIVEIRA, J.T.A., (1986). Local (gut) systemic responses to dietary lectins **IRCS Medical Science, v.14**, p. 205-208.
- RECHIA, C.G.V. (1992). Estudo de polissacarídeo da semente de *Senna multijuga*. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba.

- RECHIA, C.G.V., SIERAKOWSKI, M.R., GANTER, J.L.M.S. & REICHER, F. (1995). Polysaccharides from the seeds of *Senna multijuga*. **Int J. Biol Macromol.** v. **17**, n. 6 409-412.
- REES, P. A. & WELSH, E. J. (1977). *Angew Chem.*, 1st ed. *Enge.*, 16: 214, citado por Paula (1990).
- REICHER, F. (1998). **Estrutura e propriedades de glicanas de espécies nativas**. Dissertação (Concurso Professor Titular) apresentada ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná. 188 pp., Curitiba.
- REICHER, F., LEITNER, S.C.S., SIERAKOWSKI, M.R., FONTANA, J.D. & CORRÊA, J.B.C. (1991). Properties of seed gum of *Stryphnodendron barbatiman*. **Appl. Biochem. Biotechnol**, Clifton, 28/29, p. 353-361.
- REICHER, F.; LEITNER, S. C. S., SIERAKOWSKI, M. R., FONTANA, J. D. & CORRÊA, J. B. C. (1992). Seed gum of *Stryphnodendron barbatiman* (barbatimão). **Appl. Biochem. Biotech.**, Clifton, v. **34/35**, p. 349-357.
- ROGERS, D. J., FISH, B. & BARWELL, C. J. (1990). Isolation and properties of lectin from two red marine algae: *Plumaria elegans* and *Ptilota serrata*. In BOGHANSEN, T. C. ed.: *Lectins Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*. Walter de Gruyter. Berlin/New York, pp. 49-52.
- ROSENTHAL, F. R. T. (1955) – **Revista de Química Industrial** n. **24**, 17.
- SALES, P.V.P., OLIVEIRA, J.T.A., MOREIRA, R.A. & CAVADA, B.S. (1989). Isolation and characterization of a lectin from *Vaitarea macrocarpa*. Duke seeds. **Arq. Biol. Technol.** **32** (1):151.

- SELVENDRAN, R.R., MARCH, J. F., RING, S.G. (1979). Determination of aldoses and uronic acid content of vegetable fiber. **Anal Biochem.**, **96**: 282-292.
- SHARON, N. & LIS, H. (1989a). **Lectins**. 126 p. Chapman and Hall, London.
- SHARON, N. & LIS, H. (1989b). Lectins as cell recognition molecules. **Science**, **246**:227-234.
- SHARON, N. & LIS, H. (1990). Legume lectins. - a large family of homologous proteins. **The FASEB Journal**, **4**:3198 -3207.
- SIERAKOWSKI, M.R., MILAS, M., DESBRIERES, J. & RINAUDO, M. (1999). Specific modifications of galactomannans. **Carbohydr. Polym.**, accepted for publication.
- SMITH, G. (1904). **Proc. Linn Soc. N.s. Wales** **29**, 217, citado por Encyclopedia of Chemical Technology, 12, 4 John Wiley & Sons, 1980, citado por Regina Celia, 1990.
- SPADARO, A. C. C. & FONSECA, M.J.V. (1993). Cromatografia por bioafinidade, in: COLLINS, C.N, BRAGA, G.L., BONATO, P.S. (Coordenadores). **Introdução a Métodos Cromatográficos**. Editora UNICAMP, 279pp.
- STEPHEN, A. M. (1983), Other plant polysaccharides. In: ASPINALL, G. O.. **The polysaccharides**. v.2. New York: Academic Press., p. 98-180, REICHER (1998).
- STILLMARK (1988). **Über Rizin, ein Giftiges Ferment aus Samen Von *Ricinus Communis* L., und Einigen Anderen Euphorbiaceen**. Tese de Doutorado, Universidade de Dorpat, Dorpat (Tartu), citado por Liener (1986).

- SUDHAKAR, V., SINGHAL, R. S. & KULKARNI, P.R. (1996). Effect of salts on interactions of starch with guar gum. **Food Hydrocolloids**, v.10, n.3, p.329-334.
- TAGER, A. (1978a). Determination of molecular mass of polymers, size and shape of macromolecules: Estimation of thermodynamic flexibility of a chain In: **Physical chemistry of polymers** (Ed) TAGER, A. Moscow: Mir Publishers, p. 175-523.
- TAVARES, G.A. (1994). **Estrutura e propriedades físico-química da galactomanana de sementes de *Cassia fastuosa* Willd.** Tese (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba.
- TAVARES, R. O. (1998). **Galactomanana de *Adenantha pavonina* L. Aplicação para o isolamento de lectinas galactose-específicas.** Dissertação de Mestrado apresentado ao Departamento de bioquímica e biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará. 95 p. Fortaleza.
- TORRES-PINEDO, R. (1983). Lectins and the intestine. In: HYSAYASU, S., ORIMU, H., MIGITA, S. IKEDA, Y., SATOH, K., SHINJO, S. (KANDA), HIRAY, Y. & YOSHINO, Y. Soybean Protein isolate and soybean lectin inhibit iron absorption in Rats. **American Institute of Nutrition.**
- TUNLID, A., JANSSON, H.B. & NORDBRING-HERTZ, B. (1992). Fungal attachment to nematodes. **Mycol. Res.**, 96: 401-412.
- URAU, A. M. & CHOY, Y.M. (1970). Identification of linkages of a galactomannan isolated from seeds of *Caesalpinia pulcherrima* **Carbohydr. Res**, V.14, p.151-158.

- VAN DAMME, E.J.M., ALLEN, A. K. & PEUMANS, W.J. (1987a). Isolation and characterization of a lectin with exclusive specificity towards mannose from snowdrop (*Galanthus nivalis*) bulbs. **FEBS LETTERS**, **215**(1):140-144.
- VAN DAMME, E.J.M., ALLEN, A. K. & PEUMANS, W.J. (1987b). Leaves of the orchid twayblade (*Listera ovata*) contain a mannose-specific lectin. **Plant Physiol**, **85**:566-569.
- VAN DAMME, E.J.M., GOLDSTEIN, I.J. & PEUMANS, W.J. (1991). A comparative study of mannose-binding lectins from the *Amaryllidaceae* and *Alliaceae* **Phytochemistry**, **30** (2). 509-514.
- VIEBKE, C. & PICULELL, L. (1996). Adsorption galactomannans on to agarose. **Carbohydr. Polym.** **v. 29**, n 1, p 1-5.
- WANG, Q., ELLIS, P. R., ROSS-MURPHY, S. B. & BURCHARD, W. (1997). Solution characteristics of the xyloglucan extracted from *Dentarium senegalense* Gmelin. **Carbohydr. Pol.**, **v. 33**, p. 115-124.
- WANG, Z., ZHANG, Q., KONNO, M., SAITO, S. (1994). Sol-gel transition of alginate solution by the addition of various divalent cations: a rheological study. **Biopol.** **V. 34**, p. 737-746.
- WHISTLER, R. L. & BeMILLER. J. N. (1993). Polysaccharides and Their Derivatives. In: **Industrial Gums**. New York: Academic Press, 3^a Gums. ed., 619 p..
- WHITTAKER, R.H. (1969). New concepts of Kingdoms of organisms. **Science** **163**: 150 –160, citado por CÂMARA (1994).

- WU, A. M., SUGII, S. & HERP, A. (1988). A guide for carbohydrate specificities of lectins. In: WU, A. M. The molecular Immunology of complex carbohydrate. **Plenum Publ.** Co. 819-847.
- YOSHIDA, K., MORIGUCHI, H., SUMI, S., HORIME, H., KITAHARA, S., UMEDA, H. & UEDA, Y. (1999). Alteration of asparagine-linked sugar chains of N-acetyl-beta-D-hexosaminidase during humam renal oncogenesis: a preliminary study using serial lectin affinity chromatography. **Journal of chromatography B**, v. **723**, p. 75-80
- ZAWADZI-BAGGIO. S., SIERAKOWSKI., CORRÊA, J.B.C. & REICHER, F. (1992). Linear (15)-linked - L-arabinofuranan from the seeds of guapuruvu (*Stryphnodendron parahybum*). **Carbohydr. Res.**, v. **233**, p. 265-269.