

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

Silvana Braga da Silveira

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA  
LECTINA DA FRAÇÃO DAS GLUTELÍNAS  
ÁCIDAS DAS SEMENTES DE  
Acacia farnesiana (L.) Willd.**

N.Cham. T 574.192 S591p

Autor: Silveira, Silvana B

Título: Purificação e caracterização de



013843061

Ac. 72176

BCT

**FORTALEZA — CEARÁ  
2005**

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

*Silvana Braga da Silveira*

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA LECTINA  
DA FRAÇÃO DAS GLUTELÍNAS ÁCIDAS DAS  
SEMENTES DE *Acacia farnesiana* (L.) Willd.

BB7/WFC CATIVO

FORTALEZA  
2005

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

*Silvana Braga da Silveira*

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA LECTINA  
DA FRAÇÃO DAS GLUTELINAS ÁCIDAS DAS  
SEMENTES DE *Acacia farnesiana* (L.) Willd.**

Tese apresentada à coordenação do curso de Pós-Graduação em Bioquímica como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Bioquímica pela Universidade Federal do Ceará

**FORTALEZA  
2005**

ii

**BCT, UFC CATIVO**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

S591p Silveira, Silvana Braga da.

Purificação e caracterização de uma lectina da fração das glutelinas ácidas das sementes de *Acacia farnesiana* (L.) Willd / Silvana Braga da Silveira. – 2005.

98 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2005.

Orientação: Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada.

1. Bioquímica. I. Título.

CDD 572

---

Esta Tese foi apresentada à coordenação do curso de Pós-graduação em Bioquímica como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em bioquímica pela Universidade Federal do Ceará e encontra-se disponível a todos os interessados na Biblioteca Central desta Universidade.

É permitida a transcrição desta Tese, desde que seja feita de acordo com as normas ética científica.

**Silvana Braga da Silveira**

Tese aprovada em 25 / 02 / 2005.

**BANCA EXAMINADORA**

Professor Dr. ~~Benildo Sousa Cavada~~  
Orientador de Tese  
Presidente

Professor Dr. ~~Jorge Luiz Martins~~,  
UFPEL/Conselheiro

Professora Dra. ~~Vânia Marilande Ceccatto~~  
UECE/Conselheira

Professora Dra. ~~Claudia Ferreira Santos~~  
UECE/Conselheira

Professora Dra. Creuza Maria Silveira Araújo Farias  
UNIFOR /Conselheira

## Dedico

Aos meus pais, Fco Soares e Ma Emília  
A meus filhos Larissa e Levi Silveira  
A meu esposo Marcos Eduardo e em especial  
Ao Prof. Dr Benildo Sousa Cavada

## AGRADECIMENTOS

De forma muito especial ao meu Orientador Professor Benildo de Sousa Cavada, pela amizade, incentivo, dedicação e incomparável contribuição na minha formação.

A todos que fazem do BioMoLab (laboratório de moléculas biologicamente ativas) um espaço de intensa pesquisa e de grandes amizades.

Aos doutorandos Carlos Gadelha, Tatiane Santi, Kyria Nascimento, Emanuel e Luciana pela importante contribuição na realização dos experimentos.

Aos professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular que se mostraram prestativos e atenciosos.

De uma forma especial ao professor Fernando por sua grandiosa amizade.

Aos estudantes e funcionários do departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.

Ao departamento de farmacologia da Universidade Estadual do Ceará.

Aos meus pais que sempre me incentivaram e fizeram de minha vida algo mais especial.

Os meus queridos e adoráveis filhos, Larissa e Levi, que sempre foram tão presentes em minha vida.

Ao meu esposo Marcos Eduardo que diante de tantas adversidades, soube me compreender e incentivar.

Enfim, a FUNCAP, pelo apoio financeiro.

E a todas pessoas que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

## ESTE TRABALHO FOI REALIZADO GRAÇAS AO AUXÍLIO DAS SEGUINTE INSTITUIÇÕES

Fundação Cearense de Amparo à Pesquisa (FUNCAP) pela Bolsa de Doutorado concedida para o desenvolvimento deste trabalho e pelos convênios/auxílios concedidos ao BioMol-Lab (Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelos constantes auxílios de pesquisa concedidos ao BioMol-Lab (Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, bem como pela bolsa de Produtividade em Pesquisa concedida ao orientador desta Tese.

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelos projetos CAPES/COFECUB concedidos ao BioMol-Lab, bem como pelos convênios estabelecidos com o Programa de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

A coordenação do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, por todas as facilidades oferecidas para o desenvolvimento deste trabalho.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
ABREVIATURAS	x
RESUMO	Xi
ABSTRACT	xii
1. <b><u>INTRODUÇÃO</u></b>	1
1.1 Lectinas	1
1.2 Breve Histórico	2
1.3 Interações Proteínas - Carboidratos	4
1.4 Ocorrência	7
1.4.1 Lectinas Vegetais	7
1.4.2 Lectinas Animais	10
1.4.3 Lectinas de Parasitas	12
1.5 Lectinas como Ferramentas Biotecnológicas	13
1.6 O Gênero Acácia	15
1.6.1 <i>Acácia farnesiana</i>	21
2. <b><u>OBJETIVO</u></b>	23
3. <b><u>MATERIAIS</u></b>	24
3.1 Material Vegetal	24
3.2 Eritrócitos	24
3.2.1 Preparação de eritrócitos	24
3.3 Reagentes	27
4. <b><u>MÉTODOS</u></b>	28
4.1 Preparação da farinha de sementes de <i>Acacia farnesiana</i> (L.) Willd.	28
4.2 Fracionamento protéico por solubilidade das proteínas presentes em farinha de sementes de <i>Acacia farnesiana</i> (L.) Willd.	28
4.3 Determinação da atividade hemaglutinante	29
4.4 Quantificação de proteínas solúveis nos extratos e frações protéicas da farinha de sementes de <i>Acacia farnesiana</i>	30
4.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS) e 2-mercaptoetanol das frações protéicas obtidas da farinha de sementes de <i>Acacia farnesiana</i>	32
4.6 Cromatografias	33
4.6.1 Cromatografia de troca iônica da fração das glutelinas ácidas obtida da farinha de sementes de <i>Acacia farnesiana</i>	33
4.6.2 Cromatografia de fase reversa da lectina isolada da fração das glutelinas ácidas de <i>Acacia farnesiana</i> em coluna de C <sub>18</sub> acoplada a um sistema FPLC/HPLC (Akta)	34
4.6.3 Cromatografia de exclusão molecular da lectina isolada da fração das glutelinas ácidas de <i>Acacia farnesiana</i>	34
4.6.4 Cromatofocalização da lectina isolada da fração das glutelinas ácidas de <i>Acacia farnesiana</i>	35

4.6.5	Cromatografia de afinidade em coluna de CNBr-Sepharose/Anti-PPL da lectina isolada da fração das glutelinas ácidas de <i>Acacia farnesiana</i>	35
4.7	PAGE-SDS do pico da Anti-PPL/Sepharose	36
4.8	Coeficiente de extinção molar da lectina isolada da fração das glutelinas ácidas de <i>Acacia farnesiana</i>	37
4.9	Análise de aminoácidos e de aminoaçúcares da lectina isolada da fração das glutelinas ácidas de <i>Acacia farnesiana</i>	37
4.10	Determinação da seqüência N-terminal de aminoácidos da lectina isolada da fração das glutelinas ácidas de <i>Acacia farnesiana</i>	38
4.11	Atividades biológicas da lectina isolada da fração das glutelinas ácidas de <i>Acacia farnesiana</i>	39
4.11.1	Atividade antibacteriana contra <i>Xanthomonas axopodis</i> pv <i>passiflorae</i> ou <i>Clavibacter michiganensis</i> da lectina isolada da fração das glutelinas ácidas de <i>Acacia farnesiana</i>	39
4.11.2	Atividade antibacteriana contra <i>Streptococcus mutans</i> da lectina isolada da fração das glutelinas ácidas de <i>Acacia farnesiana</i>	40
4.11.3	Ensaio de agregação plaquetária da lectina isolada da fração das glutelinas ácidas de <i>Acacia farnesiana</i>	40
4.11.4	Microscopia eletrônica de varredura	41
5.	<b><u>RESULTADOS E DISCUSSÃO</u></b>	43
5.1	Atividade hemaglutinante e atividade específica das frações protéicas obtidas por diferentes solubilidades das proteínas da farinha de sementes de <i>Acacia farnesiana</i>	43
5.2	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS) e 2-mercaptoetanol das frações protéicas obtidas da farinha de sementes de <i>Acacia farnesiana</i>	44
5.3	Cromatografias	46
5.3.1	Cromatografia de troca iônica da fração das glutelinas ácidas obtida da farinha de sementes de <i>Acacia farnesiana</i>	46
5.3.2	Cromatografia de fase reversa da lectina isolada da fração das glutelinas ácidas de <i>Acacia farnesiana</i> em coluna de C <sub>18</sub> acoplada a um sistema FPLC/HPLC (Akta)	48
5.3.3	Cromatografia de exclusão molecular da lectina isolada da fração das glutelinas ácidas de <i>Acacia farnesiana</i>	49
5.3.4	Cromatofocalização da lectina isolada da fração das glutelinas ácidas de <i>Acacia farnesiana</i>	51
5.3.5	Cromatografia de afinidade em coluna de CNBr-Sepharose/Anti-PPL da lectina isolada da fração das glutelinas ácidas de <i>Acacia farnesiana</i>	53
5.4	PAGE-SDS do pico da Anti-PPL/Sepharose	54
5.5	Coeficiente de extinção molar da lectina isolada da fração das glutelinas ácidas de <i>Acacia farnesiana</i>	55
5.6	Análise de aminoácidos e de aminoaçúcares da lectina isolada da fração das glutelinas ácidas de <i>Acacia farnesiana</i>	56
5.7	Determinação da seqüência N-terminal de aminoácidos da	

	lectina isolada da fração das glutelinas ácidas de <i>Acacia farnesiana</i>	58
5.8	Atividades biológicas da lectina isolada da fração das glutelinas ácidas de <i>Acacia farnesiana</i>	60
5.8.1	Atividade antibacteriana contra <i>Streptococcus mutans</i> e fitopatógenos <i>Xanthomonas axopodis</i> pv <i>passiflorae</i> e <i>Clavibacter michiganensis</i> da lectina isolada da fração das glutelinas ácidas de <i>Acacia farnesiana</i>	60
5.8.2	Ensaio de agregação plaquetária da lectina isolada da fração das glutelinas ácidas de <i>Acacia farnesiana</i>	64
6.	<b><u>CONCLUSÃO</u></b>	68
7	<b><u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u></b>	69

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Legenda	Página
1	Exsicata (EAC20273) de <i>Acacia farnesiana</i>	26
2	Esquema de fracionamento protéico da farinha de sementes de <i>Acacia farnesiana</i>	32
3	Eletroforese em gel de poliacrilamida 15% em presença de SDS e $\beta$ -Mercaptoetanol.	45
4	Cromatografia de troca iônica em coluna Mono Q HR 5/5 acoplada a um sistema de cromatografia líquida de baixa pressão – AKTA Purifier.	47
5	Cromatografia de fase reversa em coluna C <sub>18</sub> acoplada a um sistema de cromatografia líquida de alta pressão – HPLC	49
6	Gráfico de exclusão molecular realizada em coluna de sílica gel (TSK-GSW 3000).	50
7	Cromatofocalização em coluna Mono-P HR 5/5 da lectina presente na fração glutelina ácida de sementes de <i>Acacia farnesiana</i> purificada em cromatografia de troca iônica em coluna Mono Q HR 5/5.	52
8	Cromatografia de afinidade da lectina da fração das glutelinas ácidas de <i>Acacia farnesiana</i> em coluna de CNBr-Sepharose Anti-PPL	53
9	Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS e 2-mercaptoetanol do pico retido (lectina) na cromatografia de afinidade em coluna de CNBr-Sepharose/Anti-PPL	54
10	Espectro de absorção da lectina da fração das glutelinas ácidas de sementes de <i>Acacia farnesiana</i>	55
11	Atividade antibacteriana da lectina da fração das Glutelinas Ácidas da farinha de <i>Acacia farnesiana</i>	62
12	Microscopia de Varredura mostrando a atividade antibacteriana da lectina da fração das Glutelinas Ácidas da farinha de <i>Acacia farnesiana</i>	63
13	Atividade de agregação plaquetária da lectina da fração das Glutelinas Ácidas da farinha de <i>Acacia farnesiana</i>	66
14	Efeito comparativo de agregação plaquetária da lectina agregação plaquetária da lectina da fração das Glutelinas Ácidas da farinha de <i>Acacia farnesiana</i> com a lectina da fração das Albuminas da mesma semente	67

## LISTA DE TABELAS

Tabela	Legenda	Página
1	Teor de Proteínas e Atividade Hemaglutinante das Frações Protéicas de farinha de sementes de <i>Acacia farnesiana</i> .	44
2	Comparação da composição de aminoácido da lectina da fração das glutelinas ácidas de <i>Acacia farnesiana</i> as do gênero <i>Parkia</i>	57
3	Alinhamento da seqüência N-terminal da lectina da fração das Glutelinas Ácidas com as seqüências N-terminais de outras lectinas de espécies da sub-família Mimosoideae e de lectinas de espécies da sub-família Papilionoideae	59

## ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
$\mu$ L	microlitros
$\mu$ m	Micrômetro
AfAL	Lectina da fração glutelina ácida de <i>Acácia farnesiana</i>
AfGlu	Lectina da fração glutelina ácida de <i>Acácia farnesiana</i>
ARG	Argenina
ASX	Ácido aspaártico/asparagina
BHI	Infusão de cérebro e Coração
ConA	Lectina de <i>Canavalia ensiformes</i>
CRD	Domínio globular de reconhecimento a carboidratos
DST	Doença sexualmente transmissível
EAC	Herbário Prisco Bezerra
gF	Gramas de farinha
GLX	Ácido glutâmico/glutamina
KDa	Kilodaltons
Leu	Leucina
MBL	Lectina ligadoras de manana
mg	Miligramas
mgP	Miligramas de proteínas
mL	Microlitros
mM	micromolar
NA	Nutrient Agar
PAGE-SDS	Eletroforese em gel de poliacrilamida – Dodecil sulfato de sódio
PHA	Lectina de sementes de <i>Phaseolus vulgaris</i>
PPL	Lectina de <i>Parkia Platycephala</i>
PRP	Platelet-rich plasma
RIPs	Proteínas inativadoras de ribosomos
UFC	Unidade formadora de colônia
UH	Unidade hemaglutinante
UV	Ultra violeta
VIS	Visível
WGA	Lectina de gérmen de trigo
$\alpha$	Alfa

## RESUMO

*Acácia farnesiana* pertence ao subgênero *Acácia* da subtribo *Mimosoideae* (*Leguminosae*). Esta espécie é conhecida por suas propriedades medicinais, sem contudo existir referências mais detalhadas sobre a análise bioquímica de seus componentes químicos. Estudos revelaram a existência de lectina na fração albumínica na farinha das sementes desta espécie. As lectinas são proteínas que possuem no mínimo um sítio de ligação a açúcar, por isso, são capazes de interagir com células e elicitar uma variedade de fenômenos biológicos. Neste trabalho descreve-se o isolamento e caracterização de uma segunda lectina no extrato da farinha de *Acácia farnesiana* na fração das glutelinas ácidas. Essa lectina mostrou especificidade sanguínea por hemácias, tratadas ou não com enzimas proteolíticas, de coelho. Um valor protéico de 4,2mgP/gF. Em análise eletroforética verificou-se uma massa em torno de 60-65KDa. A lectina isolada da fração das glutelinas ácidas foi purificada em coluna de troca iônica mostrando um único pico onde se concentrava toda atividade hemaglutinante e confirmada pela cromatografia de fase reversa que apresentou também um único pico. A lectina apresentou um único ponto isoelétrico em pH 4,6 mostrando seu caráter ácido e sua pureza. A lectina da fração das glutelinas ácidas de *Acacia farnesiana* foi reconhecida pelos anticorpos anti-PPL (*Parkia phatycephala*). Esses resultados demonstram claramente que existem epitopos comuns entre estas duas lectinas. Submetida a análise de aminoácidos e aminoaçúcares verificou-se maior conteúdo de resíduos de ácido ASX (ácido aspártico/asparagina), GLX (ácido glutâmico/glutamina) e leucina. Seqüência composta por: QSFKNNNFNEASIIILQGDAIISSTGVLQLTNVVDNGESPT. Quando testado sua atividade biológica contra bactérias patogênicas (*Streptococcus mutans*) e fitopatógenos (*Xanthomonas axopodis* pv *passiflorae* e *Clavibacter michiganensis*) inibiu em até 92% número de colônias de xantomonas numa concentração de 400µg de lectina glutelina ácida /ml e 100% quando a espécie foi a *Clavibacter*. Em ensaios de agregação plaquetária, a lectina conseguiu ativar as plaquetas de maneira dose dependente.

## ABSTRACT

*Acacia farnesiana* belongs to the subgenera *Acacia* from the subtribe *Mimosoideae* (*Leguminosae*). This specie is known for its medicinal properties, but further specific references about its biochemical analysis and its chemical components. Studies revealed the existence of a lectin in the albumin fraction extracted from its seeds. Lectins are proteins having at least one carbohydrate binding site, therefore, presenting the ability to interact with cells and provoke a series of biological phenomena. In this work, the isolation and characterization of a second lectin from the acid gluteline from *Acacia farnesiana* seeds is described. This lectin has presented specificity for rabbit erythrocytes, native or submitted to treatment with proteolytic enzymes. Through PAGE-SDS analysis an apparent weight of approximately 60-65kDa was found. The lectin from the acid gluteline fraction was purified through ion exchange chromatography which has generated a single retained peak that concentrated all the hemagglutination activity and through a subsequent step of reverse phase chromatography that has also generated a single peak, corresponding to the the lectin. The latter fraction was submitted to a chromatogofocusing procedure that revealed the existence of a single isoelectric point in pH 4.6, data that confirmed not only its acid character but also its purity. This new *Acacia farnesiana* lectin was recognized by anti-PPL (*Parkia platycephala* lectin) antibodies, result demonstrating the existence of a common epitope within these lectins. The amino acids and amino sugars analyses revealed a major content of ASX (aspartic acid/asparagine) GLX (glutamic acid/glutamine) and leucine. The N-terminal sequence presented was SFKNNNFNEASII LQGDAIISSTGVLQLTNVVDNGESPT. When assayed against patoghenic bacteria (*Streptococcus mutans*) and phytopathogens (*Xanthomonas axopodis* pv *passiflorae* and *Clavibacter michiganensis*) this lectin was capable of inhibiting 92% of number the viable colonies from *X. axopodis*. in a 400 µg/mL concentration and 100% of the viable colonies from *C. michiganensis*). In Platelet Aggregation assays, this protein was able to activate platelets in dose dependent way.

# 1. - INTRODUÇÃO

## 1.1 - Lectinas

Reconhecidas inicialmente como proteínas com capacidade de aglutinar hemácias, as lectinas fazem parte de um grupo de proteínas amplamente distribuídas na natureza. Presentes na maioria dos seres vivos, tanto no reino vegetal, animal e em microorganismos como bactérias, protozoários e vírus, as lectinas tem sido amplamente estudadas e se tem chegado à conclusão de que sua principal importância está centrada em suas propriedades biológicas, em seu poder de aglutinar eritrócitos e outras células como linfócitos, plaquetas, etc. e pela capacidade de induzir mitoses e efeitos citotóxicos sobre os linfócitos e aglutinar vírus.

O estudo de suas propriedades e caracterização no decorrer de anos foi base para melhor definir estas proteínas. Assim, numa versão mais recente lectinas são definidas como grupos de proteínas não pertencentes ao sistema imunológico, possuindo pelo menos um sítio ligante não catalítico, a qual se liga de forma reversível a carboidratos, sem alterar a sua estrutura covalente. (Peumans & Van Damme 1995).

Esta versão abrange uma gama muito extensa de lectinas que se comportam de maneira diferente, tanto do ponto de vista de suas propriedades aglutinantes como de sua capacidade de precipitar glicoconjugados, assim pressupõe a divisão dessas em quatro grupos, segundo Van Damme 1998: **Merolectinas**- lectinas que possuem exclusivamente um sítio de ligação a carboidratos (domínio lectínico) e que

devido sua natureza monovalente, não são capazes de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados. Neste tipo estão incluídas, por exemplo a heveína, proteína ligante de quitina encontrada no látex da seringueira (Van Parijjs & col., 1991); e as proteínas monoméricas ligantes de manose, presentes em orquídeas.

**Hololectinas** - lectinas que possuem exclusivamente domínios lectínicos, no mínimo dois sítios de ligação a carboidratos, e portanto são capazes de aglutinar células e precipitar glicoconjugados. São conhecidas como "hemaglutininas". Nesse grupo se encontra a maioria das lectinas já estudadas. **Quimerolectinas**- lectinas que além do sítio de ligação a carboidrato possuem atividade catalítica ou outra atividade biológica, em outro sítio de ligação. Incluem-se nesses grupos as RIPs ("ribosome inactivating proteins") tipo 2 (abrin e ricina) e as quitinases classe 1 de plantas. **Superlectinas** - quimerolectinas que possuem mais dois domínios que diferem do sítio de ligação a carboidratos tanto em estrutura como em função. A lectina de tulipa é um exemplo desse grupo (Van Damme & col., 1996).

## 1.2 - Breve Histórico

O primeiro estudo sobre lectinas foi reportado por Stillmark em 1888 quando, estudando toxicidade das sementes de *Ricinus communis* (mamona), observou que o extrato desta semente provocava aglutinação de células vermelhas de animais de diferentes espécies. Ele denominou de ricina o princípio ativo deste extrato e sua ação tóxica foi atribuída à propriedade de aglutinar hemácias em vasos sanguíneos pequenos (citado por Roque-Barreira, 1998).

Posteriormente, Hellín demonstrou efeitos aglutinantes similares ao da ricina, estudando uma proteína das sementes de *Abrus precatorius* (jequiriti), a abrina. Numerosas substâncias aglutinantes tóxicas e não tóxicas foram descobertas depois em outras plantas (citado por Roque-Barreira, 1998).

Foi então pelo ano de 1919 que se obteve a primeira lectina na forma cristalizada, descoberta por James B. Summer, a partir de sementes de *Canavalia ensiformes*, a concanavalina A (ConA) (citado por Bernard, 1993.) Na década de 40, os investigadores Rose M. Reguera e William C. Boyd, reportaram que certas sementes contêm aglutininas específicas para antígenos dos grupos sanguíneos humanos. Observaram que extratos de *Phaseolus lunatus* aglutinavam seletivamente eritrócitos do grupo A e descreveram que, dentre extratos de sementes de 57 diferentes espécies, havia diversos com especificidade para grupos sanguíneos particulares.

O primeiro a usar o termo lectina (do latim *legere*, escolher, selecionar) foi Boyd & Shapleigh em 1954 ao observar que algumas aglutininas obtidas de sementes de plantas podiam reconhecer um grupo específico e aglutiná-lo (citado por Perez-Cornélio, 1999). Foi somente a partir de 70 que as lectinas passaram a ser tema de investigação de vários grupos de pesquisa.

O crescente aumento em pesquisas com lectinas parece ter relação com a descrição de suas propriedades biológicas como cita Sharon, 2003: a ConA, por exemplo, uma das lectinas mais investigadas, quando imobilizada em agarose, é utilizada para isolamento de polissacarídeos e glicoproteínas; Lectinas de *Dolichos biflorus* e de *Vicia graminea* são utilizados em bancos de sangue para identificação de hemácias do grupo A e N, respectivamente; Lectina de *Ulex europeus* usada para identificar indivíduos secretores de substâncias dos grupos sanguíneos A, B ou H na

saliva ou outros fluidos biológicos; Aglutininas de gérmen de trigo (WGA), ConA e aglutinina da soja usada para aglutinar preferencialmente células neoplásicas.

No decorrer dos últimos 20 anos, centenas de lectinas foram purificadas e caracterizadas. O conhecimento da diversidade destas proteínas isoladas de plantas, animais e microorganismos, aliado a sua grande e diferente especificidade por açúcares, faz dessa classe de proteínas ferramentas valiosas tanto para detecção e isolamento de glicoproteínas, como também para caracterização parcial das porções carboidrato destas e acompanhamento de mudanças que ocorrem nos açúcares de superfície das células em processo de desenvolvimento ou de transformação. Além disto, o estudo do maior número possível de lectinas é fundamental para a elucidação de suas funções biológicas endógenas.

### 1.3 - Interações proteínas – carboidratos

Os primeiros relatos sobre o papel dos carboidratos no reconhecimento celular foram feitos por Burnet em 1951, na Austrália, através da demonstração de que a presença de resíduos de ácido siálico na superfície da membrana eritrocitária é um requerimento absoluto para a ligação do vírus influenza, uma vez que o tratamento prévio das células com neuraminidase abolia a reação de ligação (Burnet, 1951). Foi então que em 1986 Cook estabeleceu que a maioria das células tem em sua superfície carboidratos na forma de glicoproteínas, glicolipídios e polissacarídeos. Posteriormente tornou-se evidente o enorme potencial que esses carboidratos de superfície assumia como codificador de informações biológicas (Sharon & Lis, 1989).

A idéia de que carboidratos de superfície pudessem desempenhar um papel importante no reconhecimento celular fez com que as lectinas, conhecidas até então por sua propriedade de ligação a carboidratos, assumissem um importante lugar como decodificadoras da informação biológica contida nos açúcares

Uma grande diversidade de estruturas de carboidratos tem sido detectada em associação com glicoconjugados solúveis ou ligada a superfícies (Galego- Del- Sol & col., 2005). Há fortes indícios de que essa diversidade seja biologicamente significativa, pois, em muitas situações, carboidratos modificam as atividades de proteínas as quais estão associadas e também servem como marcadores de diferenciação celular, desenvolvimento e estados patológicos (Hakomori, 1984).

As bases estruturais da interação lectina - sacarídeo foram revistas por Rini, 1995; Weis & Drickamer, 1996 e Elgavish & Shaanam 1997, fundamentados nas estruturas tridimensionais conhecidas de 30 complexos lectina - carboidratos.

Carboidratos interagem com lectinas através de pontes de hidrogênio, de coordenação por metil, forças de Van der Waals e interações hidrofóbicas (Elgavish & Shaana, 1997). A disponibilidade de um grande número de grupos hidroxila nos açúcares os transforma em fortes candidatos como participantes óbvios em redes complexas de pontes de hidrogênio; os grupos hidroxilas de açúcar agem como doadores ou como receptores de hidrogênio. Átomos de cadeia lateral dos aminoácidos Asp e Asn do CDR (domínio globular de reconhecimento de carboidrato) e os hidrogênios da amida da cadeia principal e o oxigênio de carbonilas geralmente participam dessas pontes. O reconhecimento seletivo de hidroxilas epiméricas é um aspecto importante da ligação diferencial de açúcares pelas lectinas. Pontes de hidrogênio mediadas por água também participam das interações lectina - carboidrato, podendo contribuir com força de grandeza

semelhante à proporcionada por pontes diretamente estabelecidas entre a proteína e o açúcar (citado por Roque-Barreira, 1998).

Merece destaque o fato de que, geralmente, os aminoácidos envolvidos na ligação aos carboidratos sejam os mesmos de uma lectina para outra, ainda que elas difiram em suas especificidades. Os aminoácidos, entretanto, ligam-se aos carboidratos com diferentes orientações, dependendo da lectina. Aparentemente, não só o aminoácido é importante para a ligação, mas também é fundamental a "moldura" proporcionada pela cadeia peptídica, conforme observações feitas pelo grupo liderado por Osawa (Yamamoto & col., 1992).

Dois aspectos da organização das lectinas auxiliam na compreensão do papel que exercem. O primeiro se refere ao fato de que a atividade ligante a açúcar é atribuída a uma porção limitada da molécula, correspondendo tipicamente a um domínio globular de reconhecimento de carboidrato (CRD), de menos de 200 aminoácidos. O segundo diz respeito a que os CRDs de muitas das lectinas relacionam-se entre si, quanto à seqüência de aminoácidos, o que faz com que as lectinas conhecidas, em sua grande maioria, possam ser reunidas em um número relativamente pequeno de grupos (citado por Weis & Drickamer, 1996).

Cavada & col., 2001 demonstraram que lectinas de especificidade semelhantes por carboidratos pode, em alguns casos, apresentar afinidade pelo ligante diferenciada, sugerindo que algum tipo de diferença estrutural entre as lectinas pode ocasionar diferenças de afinidade em cada complexo estabelecido entre lectina - ligante, e isto se refletir na potência das atividades biológicas desempenhadas por estas proteínas.

## 1.4 – Ocorrência

As lectinas estão amplamente distribuídas na natureza, pois além de serem detectadas em plantas superiores, já foram isoladas de todas as classes e famílias de seres vivos: algas, vertebrados, invertebrados e microorganismos, incluindo fungos e vírus, apresentando uma grande variedade de formas e tamanhos. Muitas destas proteínas podem ser agrupadas em famílias distintas que exibem similaridade quanto às propriedades estruturais e de seqüência de aminoácidos em suas cadeias polipeptídicas. No reino vegetal, podem-se citar algumas espécies como as da família Leguminosae aonde podem ser encontradas lectinas com alto grau de homologia de seqüência, evidenciando assim, uma linha taxonômica bem definida (Sharon & Lis, 1995), ou ainda que estas proteínas tenham um ancestral comum ao longo do processo evolutivo. É importante destacar que até o presente momento se conhece um maior número de lectinas de sementes de plantas pelo simples fato de que sementes são mais abundantes e mais fáceis de trabalhar (não apresentam pigmentos), mas que não significa que seja de fato o grupo de seres vivos que apresentem de fato mais lectinas.

### 1.4.1 Lectinas Vegetais

Isoladas preferencialmente de leguminosas, as lectinas vegetais, são encontradas geralmente nos cotilédones e endospermas das sementes, porém também estão presentes nas folhas, raízes, tubérculos e flores. Acredita-se que as lectinas são sintetizadas nas folhas e imediatamente transferidas para as sementes,

fato evidenciado pelo aumento da concentração de lectinas nas sementes em desenvolvimento que é paralelo a um rápido decréscimo de suas concentrações nas folhas maduras.

Entre as lectinas de vegetais melhor estudadas se encontram as seguintes:

- a) Concanavalina A, uma proteína obtida da planta *Canavalia ensiformis* que reconhece preferencialmente resíduos de  $\alpha$ -D-glucose e  $\alpha$ -D-manose (Bittiger & Schnebli, 1976);
- b) Aglutinina de germen de trigo, também chamada de WGA (wheat germ agglutinin), cujo sítio de ligação é o ácido  $\alpha$ -N-acetilneuramínico.
- c) Fitohemaglutinina, ou PHA, lectina encontrada no Feijão *Phaseolus vulgaris*. Sabe-se que tem ação mitogênica e, eventualmente, capacidade de aglutinar especificamente células malignas (Mitchell & col., 1998). Assim, essa lectina tem despertado um grande interesse na investigação para utilizá-las como controle no tratamento de tumores.

A função fisiológica que as lectinas desempenham em plantas ainda permanece um enigma. Algumas funções foram propostas: as lectinas podem funcionar como transportadoras e conseqüentemente na armazenagem de carboidratos nas sementes (Nakamura & col., 2004); no processo de ligação entre bactérias fixadoras de nitrogênio e a raiz na inibição do crescimento de fungos, na proteção contra ataque de insetos (Wang & col., 2000a e b); na regulação hormonal do crescimento e desenvolvimento da planta (Sanz-Aparicio & col., 1997).

Tem sido proposto também que devido a sua ampla distribuição em vegetais, as lectinas podem estar associadas a papéis de defesa dos vegetais contra ataques de bactérias e vírus patogênicos (Giles & Hector, 1998) e mesmo contra herbívoros,

auxiliando, assim, a preservar e a perpetuar as espécies onde são encontradas. Outros usos para as lectinas vegetais estão sendo propostos, como por exemplo o de promotoras de adesão entre diversas células (ou organismos), destacando os trabalhos de Bar-Shavit (1976) e Gallily (1984) que utilizaram concanavalina A para favorecer a fagocitose de microorganismos por macrófagos.

As lectinas de vegetais são classificadas em sete diferentes famílias: as lectinas de leguminosas; lectinas de monocotiledôneas; lectinas ligadoras de manose; lectinas ligadoras de quitina; RIPs tipo 2; lectinas relacionadas a jacalina; lectinas relacionadas a amarantina e lectinas de floema de Cucurbitaceae. As três últimas classes são compostas por um número pequeno de lectinas (Van Damme & col., 1998).

Os principais grupos de especificidade encontrados entre as lectinas da classe das leguminosas são: manose, glicose e seus  $\alpha$  - glicosídeos - neste grupo todas as lectinas ligam-se igualmente tanto a manose como glicose; galactose e N-acetilgalactosamina - as lectinas incluídas neste grupo são específicas para ambos os açúcares, entretanto em alguns casos, na ligação a um deles pode ocorrer mais fortemente; N-acetilglicosamina - lectinas que se ligam mais fortemente através das formas oligoméricas do tipo  $\beta$ -1,4 (dímeros, trímeros, tetrâmeros, etc.);  $\alpha$ -L-fucose ; e oligossacarídeos complexos (Rudiger, 1997).

Uma mesma planta pode conter lectinas completamente diferentes em termos de especificidade de ligação a carboidratos. Por exemplo, em *Vicia cracca*, além de uma série de isolectinas típicas que ligam N-acetilglicosamina (Rudiger, 1977), existe também uma segunda lectina reconhecadora de glicose/manose (Baumoum & col., 1979).

As lectinas de leguminosas são sintetizadas como peptídeos de aproximadamente 30 kDa, com uma seqüência sinalizadora de 20 resíduos de aminoácidos, que precede a cadeia da lectina madura e guia seu transporte para a luz do retículo endoplasmático. As cadeias de 30 kDa podem se combinar para formar dímeros de 60 kDa, ou tetrâmeros de 120 kDa.

Estudos de estruturas tridimensionais de lectinas, alguns citados por Rougé & col., 1991 e Sharon & Lis, 1993 mostram que lectinas com diferenças na suas estruturas primárias, como também em suas especificidades de ligação a açúcar, têm surpreendentes similaridades de estruturas tridimensionais. As subunidades tem formato de sino com a cúpula plana, formada basicamente por duas folhas  $\beta$ -anti-paralelas, praticamente sem ocorrência de  $\alpha$ -hélice. Entre as lectinas de leguminosas, os sítios de ligação para resíduos hidrofóbicos, íons metal e moléculas de água são altamente conservados (Loris & col., 1994).

#### 1.4.2 Lectinas Animais

Lectinas animais, são encontrados tanto em invertebrados como caracóis, caranguejos, camarões, moluscos, peixes, helmintos etc., como também em vertebrados. Entre as lectinas do reino animal hoje é conhecido os seguintes grupos principais:

**a) lectinas do tipo C, dependentes de cálcio:** apresentam como peculiaridade o fato de só ter sua atividade ligante manifestada na presença de cálcio, em pH de aproximadamente 6,5 (Drickamer, 1988). A família inclui receptores endocíticos dos hepatócitos e macrófagos, moléculas de adesão celulares denominadas selectinas e

moléculas secretadas encontradas na matriz extracelular e no plasma. Cada uma dessas proteínas contém um ou mais CRD, combinado com outros domínios que participam da determinação das funções da molécula (Weis & col., 1992). São representantes desse grupo as proteínas ligantes de manose (Taylor & col., 1989), as selectinas (Springer, 1991), as calnexinas chaperonas (Ware & col., 1995) e as lectinas de superfície de células natural "Killer" (Bezouska col., 1994).

**b) lectinas do tipo S, ou galectinas, ligantes de lactose:** constituem uma grande família de proteínas ligantes de lactose, além de uma ampla gama de papéis por elas desempenhados, muitos dos quais relacionados com função imunológica. Foram, durante a evolução, altamente conservadas, e em mamíferos distribuem-se em tecidos diversos, onde propiciam interações célula/célula ou célula/matriz extracelular, através do reconhecimento específico de estruturas contendo  $\beta$ -galactosídeos (N-acetil-lactosamina). As galectinas mais estudadas são a galectina 1 com 13-14,5 KDa (Harrison, 1991), galectina 3 com 29-35 KDa (Hughes, 1994).

**c) lectinas do tipo P, receptores de manose 6-fosfato:** grupo de lectinas que apresentam receptores para manose-6-fosfato (Gabijs, 1997).

**d) lectinas do tipo I, com domínio imunoglobulínico:** engloba um grupo de proteínas que compartilham um motivo estrutural, um domínio imunoglobulínico, e foram descritas pela primeira vez em anticorpos. Estas proteínas se ligam a carboidratos independentemente da presença de cálcio. Uma proporção expressiva de lectinas do tipo I estabelece interações dependentes do reconhecimento de ácido siálico (Collins & col, 1997). Há lectinas de mamíferos do tipo I que desempenham

papel importante em funções imunológicas, destacando-se a sialoadesina de macrófagos, CD22 de linfócitos B e CD33 de células mielomonocíticas (Hanasaki & col, 1995; Crocker & col., 1997; Sgroi & col, 1996).

As lectinas de tipo C e S são as mais abundantes entre os vertebrados. Essa classificação porém, não abrange todas as lectinas encontradas e isoladas em animais. Propõe-se que pentraxinas – lectinas dependentes de cálcio, mas que não apresentam homologia estrutural com as lectinas do tipo C – constituam um quinto tipo de lectina animal (Vasta & col., 1994) e que lectinas de tipo L – que têm homologia de seqüência com lectinas de legumes – constituam um grupo adicional de lectinas animais (Drickamer, 1995).

#### 1.4.3 Lectinas de parasitas

As lectinas têm emergido como estruturas importantes no processo de reconhecimento tecidual pelos microorganismos, influenciando sua adesão ao tecido hospedeiro e o desenvolvimento de diversas infecções. Johnson em 1994 demonstrou que nas fimbrias tipo 1 de *Escherichia coli* existe uma lectina que se liga preferencialmente a oligomanose e oligossacarídeos híbrido de glicoproteínas da superfície de animais. Esses açúcares estão presentes no epitélio do trato urinário de algumas espécies de mamíferos, e o seu reconhecimento pela lectina das fimbrias promove a adesão do patógeno a células do epitélio local. Essa lectina é também responsável pela fagocitose e o “burst” respiratório de neutrófilos e por desgranulação de mastócitos, com conseqüente liberação de mediadores inflamatórios (Malaviya & col., 1994; Abrahan & Malaviya, 1997), fenômenos

importantes na resposta inflamatória aguda e que podem influenciar no curso da infecção

No campo da parasitologia, as lectinas têm sido amplamente utilizadas com diversas finalidades, como definir estágios de desenvolvimento de parasitas, identificar lectinas seletivas para determinar espécies ou formas de parasitas, localizar resíduos de açúcares, caracterizar glicoconjugados, discriminar entre formas patogênicas e não patogênicas de organismos (Jacobson & Doyle, 1996).

Um enfoque especial tem sido dado aos estudos de lectinas mediando a adesão e fagocitose de protozoários. A adesão e internalização de leveduras ou de hemácias por *Acanthamoeba castellani* foi observada ser especificamente inibida por manose, sugerindo a presença de lectina na superfície de *Acanthamoeba* (Allen & Dawidowicz, 1990). *Entamoeba histolytica* liga-se a carboidratos ou glicoproteínas através de lectina presente em sua superfície. Essa lectina medeia a aderência de *E. histolytica* às células epiteliais humanas, através do reconhecimento específico de resíduos galactose e N-acetil D-galactosamina (Petri & col., 1989).

Também foram identificadas lectinas ligantes de galactose em alguns nematóides como *Caenorhabditis elegans* (Arata & col., 1997) e *Teladorsagia circumcita*, que apresentam similaridade entre si e com uma proteína ligante de  $\beta$ -galactosídeos de *Onchocerca volvulus* (Newton & col., 1997).

### 1.5– Lectinas como ferramentas biotecnológicas

Atualmente já é consenso a potencialidade da gama de variadas aplicações em diversas áreas da ciência como pode ser observado pela variedade de

empresas e catálogos comercializando estas proteínas para os mais diversos usos. Assim, estas proteínas podem ser utilizadas em (entre outras aplicações):

- Estudo químico da estrutura de superfície celular de grupos sanguíneos e na tipificação dos mesmos
- Tipagem e caracterização de microorganismos;
- Na detecção do tipo de açúcares presentes na superfície celular e processos de reconhecimentos mediados pela interação específicas de carboidratos com receptores;
- Para determinar a patogenicidade dos microorganismos em suas relações de adesão célula (Giles & Héctor , 1998).
- Reconhecimento específico de transformações neoplásicas;
- Excelentes indutores de proliferação de linfócitos (ação mitogênica);
- Ferramentas importantes para se estudar os mecanismos complexos envolvidos nos processos inflamatórios;
- Indutores da síntese de citocinas tanto *in vitro* como *in vivo*;
- Ferramentas fundamentais para se estudar os mecanismos envolvidos no fenômeno de apoptose;
- Ferramentas fundamentais para se estudar os mecanismos envolvidos nos processos alérgicos;
- Imunoadjuvantes de vacinas;
- Moléculas chaves para processos de controle de liberação e/ou direcionamento de drogas (drug delivery);
- Moléculas fundamentais para a construção de mísseis biológicos dirigidos contra alvos específicos dentro do organismo;

- Ferramentas importantes para se estudar a contratilidade muscular;
- Devido a variabilidade de especificidade por carboidratos, excelentes ferramentas para se estudar funções renais in vitro, in vivo e ex vivo;
- Fundamentais na cancerologia moderna, tanto para diagnóstico (reconhecimento específico de determinados tipos de câncer) como para terapia (construção de drogas dirigidas especificamente contra células neoplásicas);

## 1.6 - Gênero Acácia

Pertencente a família *Leguminosae* (ou *Fabaceae*), subfamília *Mimosoideae* o gênero Acácia é um grande táxon composto por mais de 1350 espécies distribuídas por todo o mundo, em especial nas regiões tropicais e subtropicais (Seigler, 2003).

A família *Leguminosae* é uma das maiores dentre as dicotiledôneas, compreendendo mais de 13.000 espécies reunidas em mais de 600 gêneros distribuídos mundialmente, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais (Joly, 1998).

Segundo Engler, a família *Leguminosae* é dividida nas subfamílias *Mimosoideae*, *Caesalpinioideae* e *Faboideae* (*Papilionideae*); enquanto que para Cronquist, o conjunto das subfamílias está englobado nas famílias *Mimosoideae*, *Caesalpinaceae* e *Fabaceae* (*Papilionaceae*) (citado por Joly, 1998).

A subfamília *Mimosoideae*, encontra-se distribuída nas regiões tropicais, subtropicais e cáldo-temperadas, com 50 a 60 gêneros que englobam aproximadamente 2.800 espécies em sua maioria pertencentes aos gêneros *Acacia*, *Mimosa* e *Inga* (Barroso, 1991).

O gênero *Acacia* é um dos maiores nas Angiospermas. Um dos gêneros exóticos com maior representatividade, sendo responsável pela cobertura de extensas áreas. Dentro desse gênero pode-se encontrar desde árvores, arbustos até trepadeiras lenhosas. Considerada cosmopolita, de clima tropical e subtropical é muito abundante em savanas e matas na América tropical, África, Ásia e Austrália (Seigler, 2003).

Diversas espécies deste gênero são utilizadas como ornamental; por sua madeira, em marcenaria, como lenha, ou para obtenção de carvão; em curtumes, devido à presença de taninos; para extração de gomas; pelas essências florais, empregadas em perfumaria; fixação de dunas; formação de cercas vivas, com as espécies aculeadas e a maioria apresentam flores melíferas (Correa, 1984).

Diversas espécies de *Acacia* são utilizadas tradicionalmente para o tratamento das mais diversas patologias. Andrade & col., 2003 cita alguns exemplos do uso medicinal destas espécies:

- na Somália utiliza-se a goma da *A. tortilis* como medicamento contra a asma, conhecido como *Qurac*, os ativos foram encontrados como sendo quracol A (1-(2,4-dihidroxifenil)-3-(3-hidroxifenil)-propan-2-ol, quracol B e fisetinidol (1-(2,4-dihidroxifenil)-3-(3,4-hidroxifenil)-propan-2-ol (Hagos & Samuelsson, 1988).

- *Acacia nilotica* é utilizada para tratamentos de enfermidades do trato respiratório, diarreias e hemorróidas, devido às suas propriedades tônicas, adstringentes e estimulantes (Nabi & col., 1992). No Zimbábue esta planta é utilizada no tratamento das DSTs (Kambizi & Afolayan, 2001).

- Chhabra & col., 1990 cita que *Acacia mellifera* e *A. kirkii* são utilizadas no tratamento do câncer.; *A. Pentagona* é empregada na amenorréia; *A. polyantha*,

em crises asmáticas; a raiz da *A.robusta* é empregada em casos de esquistossomose.

- As sementes da *A. concinna* são utilizadas para o tratamento de doenças da pele (SEKINE et al., 1997).

- Foram observados efeitos tóxicos com espécies da *Acacia* como *A. berlandieri* e *A. riqula*, devido à presença de alcalóides e amins tóxicas, conduzindo a ataxia locomotora e efeitos sobre a fertilidade de ovelhas e cabras (Clement, 1997), (Clement; & col., 1998).

- Efeito antimicrobiano foi verificado com extratos de diversas espécies de *Acacia*. Extratos de *A. Koa* demonstraram atividade contra *Pseudomonas aeruginosa* Bushnell & col., (1950) e da *A. Robusta* contra cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (Khan & col.,1980).

- Extratos da *A. angustifolia* inibiram o crescimento de cepas de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Candida albicans* (Hoffmann &col., 1993).

- O extrato metanólico das cascas da *A.Senegal* inibiu o desenvolvimento de *Streptococcus mutans*, *Actinomyces viscosus* e da levedura *Candida albicans* (Khan & col., 2000).

- Utilizando extratos hexânicos e metanólicos da *A. senegal* e *A. nilotica*. Ali & col., 2001, obtiveram inibição das cepas de *E. coli* e de *Staphylococcus aureus*.

- Significativa ação sobre bactérias Gram positivas e negativas foi demonstrada com extratos da *Acacia nilotica* (Kambizi; Afolayan, 2001). Os extratos aquosos e etanólico dos frutos da *A. nilotica* apresentaram atividade contra cocos Gram positivos e bacilos Gram negativos, enquanto que o extrato hexânico apresentou atividade contra *Candida albicans* (Mustafa & col., 1999). Devido ao teor

de taninos, o extrato das suas folhas demonstrou efeito antimicrobiano sobre *Clostridium perfringens* (Sotohoy; & col., 1995). Extratos aquosos e etanólicos desta espécie também demonstraram atividade contra *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella* spp (Chandel & col., 1993). Estudos com esta espécie permitiram a observação de atividades antipiréticas e antiinflamatórias (Dafallah & Mustafa, 1996); antihipertensiva, antiespasmódica (Gilani & col., 1999); atuação considerável *in vitro* sobre a replicação viral do HIV-1 (Hussein & col., 1999) e contra *Plasmodium falciparum* (El-Tahir & col., 1999).

- Efeito hipotensor em cães e ratos foi observado com o extrato aquoso dos galhos da *A. catechu* (Sham & col., 1984). Uma potente ação hepatoprotetora foi observada com extratos desta espécie (Jayasekhar & col., 1997).

- Os extratos etanólicos da *A. nilotica* e *A. farnesiana* demonstraram uma intensa atividade hipoglicêmica (Wassel & col., 1992).

- Estudos realizados com diversas espécies de *Acacia* demonstraram ação contra ovos do molusco *Planorbis corneus* (Gurevich, 1948).

- Atividade contra *Biomphalaria alexandrina*, molusco envolvido na transmissão da esquistossomose, foi observada com a *A. nilótica* (Elsheikh & col., 1990; Nazif & col., 2001) e com a *A. saligna* (Ahmed & col., 1999).

- Estudos dos extratos de espécies de *Acacia* do Sudão, entre as quais a *A. albida* e a *A. seval*, demonstraram ação molusquicida contra *Bulinus truncatos* e *Biomphalaria pfeifferi*, no controle da esquistossomose transmitida por estes caramujos (Ayoub & Yakov, 1985a).

- Na *A. catechu* esta atividade foi relacionada a compostos fenólicos (Ayoub; Yakov, 1985b). Atividades molusquicidas e cercaricidas foram também constatadas com os extratos da *A. concinna* (Hyalij, 1999).

- Atividades antihelmínticas foram verificadas com o extrato metanólico da *A. auriculiformis* (Ghosh & col., 1993 e 1996; Babu & col., 1997; Sarkar & col., 1998). A fração butanólica do extrato desta planta testada em camundongos, apresentou potencial efeito antidepressivo (Sahai & col., 1980).

- Inibição do crescimento da *Entamoeba histolytica* em cobaias com amebíase intestinal foi verificada com a *A. arabica* (Chakraborty & DAS, 1989).

- Inibição de proteínas quinase C em cérebros de ratos foi verificada com os derivados da catequina extraídos da *A. meianoxylon* (Polya & Foo, 1994).

- Propriedades antiinflamatórias, pela inibição da ciclooxigenases, foram observadas com a *A. rehmanniana* (Graw & col., 1997).

- Atividades antitumorais foram observadas com extratos aquosos da *A. decurrens* (Oliveira, 1972), com a *A. pennatuia* (Popocca & col., 1998) e com a *A. laeta* (Nassar, 1999).

- Forte efeito antioxidante para variados ensaios foi demonstrado com as cascas da *A. confusa* (Tzen & col., 2001).

- No gênero *Acacia* foi verificada atividade alelopática com várias espécies, interferindo na germinação e/ou no crescimento de diferentes espécies que se desenvolvem ao seu redor (Ohno & col., 2001).

- Forte efeito alelopático foi verificado para a *A. confusa* com estudos realizados por Chou (1980).

- A germinação e o crescimento da raiz e hipocótilo de *Trifolium pratense*, *Trifolium repens*, *Phleum pratense* e *Lolium perenne* frente às folhas e flores da *A. dealbata* e dos solos coletados abaixo da planta foram fortemente inibidas (Reigosa & col., 1984; Bhaskak & Dasappa, 1986).

- A inibição da germinação do algodão, girassol, berinjela, tomate e pimenta, bem como do crescimento da radícula e da plúmula foram verificados com os extratos das cascas e folhas da *A. nilotica*. O extrato das cascas promoveu uma inibição maior que o extrato das folhas (Swamina & col., 1989).

- Foi observado que sementes de arroz embebidas com o lixiviado das folhas da *A. auriculiformis* sofriam redução da germinação, do crescimento e da matéria seca acumulada da plúmula (Jadhav & Gaynar, 1992).

- Extratos dos resíduos da decomposição da *A. menoxylon* em quatro diferentes tipos de solo foram avaliados. Efeito inibitório sobre o crescimento da *Lactuca sativa* foi observado para os extratos dos resíduos do início da decomposição (González & col., 1995).

- Potencial efeito alelopático sobre o milho (*Zea mays*) foi verificado pelas substâncias produzidas pela *A. xanthopholea* (Nsolomo & col., 1995). Inibição do crescimento de *Pennisetum glaucum* foi obtido com extratos aquosos de folhas, raízes, inflorescências da *A. tortilis* e por solos ao seu redor (Anurag; Sharma & Saxena, 1996).

- Inibição da germinação de sementes de gergelim e retardo no desenvolvimento da planta foram observados com o extrato das folhas da *A. senegal* (FADL, 1997).

- O extrato aquoso da *A. pubescens* inibiu a germinação de sementes de *Lactuca sativa* (Kitou, 1999).

Segundo Seigler, 2003 as substâncias mais evidentes e estudadas em grande maioria das espécies de *Acácia* foram as cumarinas, taninos, glicosídeos e cianogênicos, alcalóides, esteróides e flavonóides.

Embora, o gênero *Acácia* seja bem difundido e os extratos de várias espécies de plantas deste gênero, sejam utilizados no tratamento de doenças, defesa contra ataque de parasitas, ovicida, musquicida, etc., pouco se sabe sobre a estrutura química desses extratos das espécies de *Acácia*.

#### 1.6.1 - *Acácia farnesiana*

Espécie originária de regiões secas da América Tropical é comum em todo o Nordeste. Botanicamente, é um arbusto ramosíssimo com estípulas espinescentes e retas. Pinas 2 – 3 pares nos ramos com flores de 4 a 8 pares nos ramos vegetativos (Fotos A e B). Folíolos de 20 a 25 pares, a maioria com 4 mm de comprimento. Pedúnculo de 2,5 a 3,8 cm. Capítulo globoso. Brácteas ovais, agudas, membranáceas. Flores glabras e sésseis. Cálice paleáceo. Corola 1,5 vezes maior que o cálice, 5-fendida. Estames além de 50, com o dobro do comprimento da corola. Leguem quase fusiforme, com 5 a 7,5 cm de comprimento, glabro, dotado de uma polpa carnosu-esponjosa, ficando depois completamente seca.

*Acácia farnesiana*



A



B

## 2. - OBJETIVO

### 2.1- Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo a purificação e caracterização de uma nova lectina da fração das Glutelinas Ácidas da farinha das sementes de *Acacia farnesiana* (Família: *Leguminosae*; Sub-família: *Mimosoideae*; Tribo: *Acacieae*).

### 2.2- Objetivos Específicos

- Fracionar as proteínas, por solubilidade, do extrato da farinha das sementes de *Acácia farnesiana*;
- Quantificar as proteínas no extrato e nas frações protéicas ;
- Determinar o perfil eletroforético das proteínas fracionadas;
- Isolar e caracterizar, por meio de cromatografias, a lectina presente na fração das glutelinas ácidas;
- Determinar a seqüência N-terminal de aminoácidos da lectina isolada da fração das glutelinas ácidas;
- Realizar atividades biológicas com a lectina isolada da fração das glutelinas ácidas.

### 3. – MATERIAIS

#### 3.1 – Material Vegetal

Para o desenvolvimento do presente estudo foram utilizadas sementes quiescentes (Figura 1) de *Acacia farnesiana* (L.) Willd (Família: *Leguminosae*; Sub-família: *Mimosoideae*; Tribo: *Acacieae*), conhecida popularmente como Coronha porque as raízes da árvore constituem material de excelente qualidade para a confecção de coronhas de armas. Todo o material foi coletado na praia do Icarai, Caucaia/Ceará e um exemplar deste material está herborizada na forma de excicata no Herbário Prisco Bezerra (EAC) do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará sob o número EAC 20.273.

#### 3.2 - Eritrócitos

Eritrócitos de coelhos albinos foram obtidos de animais adultos e sadios mantidos no biotério do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

##### 3.2.1 - Preparação dos eritrócitos

Os eritrócitos de coelho foram submetidos à lavagem com NaCl 0,15M gelado, centrifugado para a total separação das hemácias do plasma e dos glóbulos

brancos. Este processo foi realizado cinco vezes até a obtenção de hemácias livres de outras células sanguíneas. Parte dessas hemácias foram ressuspensas em NaCl 0,15M numa concentração final de 2%, suspensão esta denominada de eritrócitos nativos e o restante foi submetido a tratamento enzimático com tripsina e papaína, sendo denominados de eritrócitos tratados. Sabe-se que a região externa da membrana celular apresenta glicoproteínas além de outras biomoléculas. A tripsina é uma enzima proteolítica capaz de clivar o lado carboxílico de resíduos de lisina e arginina presentes nas cadeias protéicas presentes nas membranas. Com essa clivagem, ocorre uma maior exposição de carboidratos presentes nas membranas das hemácias que antes estavam escondidos no glicocálix das células. Essa exposição aumenta, em alguns casos, a possibilidade da ocorrência de aglutinação, de maneira que algumas lectinas só aglutinem após tratamento enzimático prévio das hemácias. O tratamento enzimático consiste na incubação momentânea da enzima proteolítica com os eritrócitos lavados. A concentração de tripsina e papaína foi de 0,01 mg/mL de eritrócito a 2%. Essa mistura fica em repouso por uma hora à temperatura ambiente com agitação ocasional e, posteriormente, o processo de lavagem é novamente realizado para eliminar os restos de enzima e material clivado por ela. Os eritrócitos tratados são novamente ressuspensos em NaCl 0.15 M até uma concentração final de 2% de eritrócitos. Tanto os eritrócitos nativos quanto tratados foram armazenados a 4°C até a utilização.

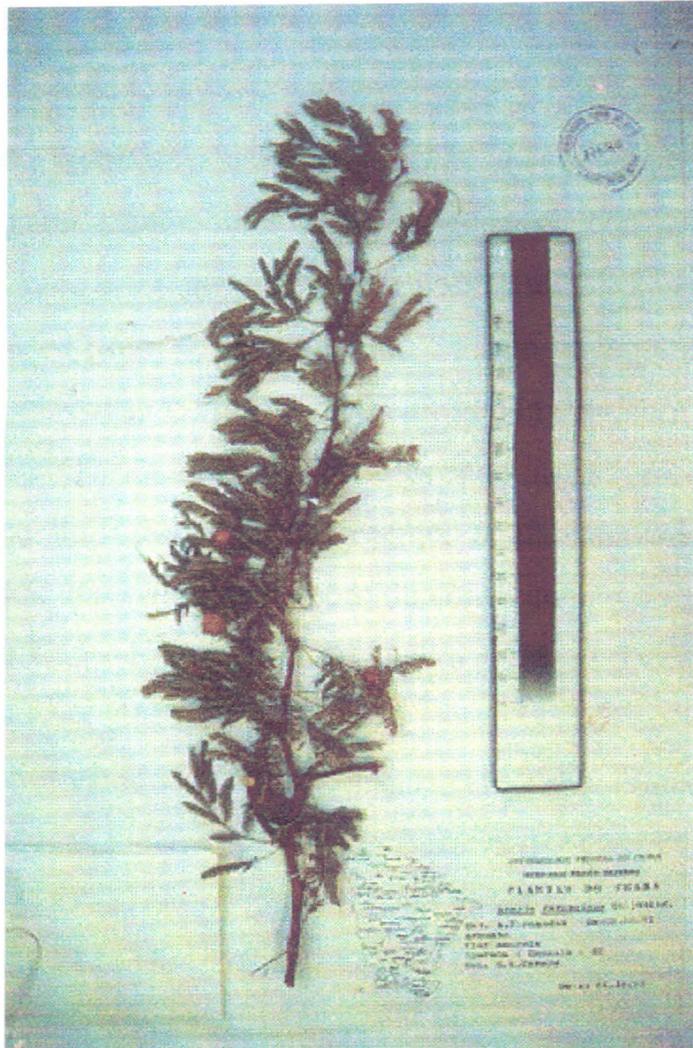


Figura 1 - Flores e folhas de *Acacia farnesiana* (L.) Willd. Exsicata (EAC 20.273) do Herbário Prisco Bezerra (EAC) do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará.

### 3.3. - Reagentes

Acrilamida, N,N-metilenobisacrilamida, agarose, Coomassie Brilliant Blue R-250, Albumina Sérica Bovina, dodecil sulfato de sódio (SDS) e 2-mercaptoetanol foram obtidos da GE-Healthcare (Amersham/Biosciences).

As enzimas protelíticas tripsina e papaína foram adquiridas da Sigma Chemical Co., St. Louis, USA.

## 4. – MÉTODOS

### 4.1 - Preparação da farinha de sementes de *Acacia farnesiana* (L.) Willd

As sementes quiescentes de *Acacia farnesiana* (L.) Willd. foram trituradas em moinho tipo Wiley acoplado com peneira de 60 mesh e o material obtido foi repassado em moinho de café (Krupps tipo 200) resultando em uma farinha bastante fina que foi, então, estocada em frascos hermeticamente fechados mantidos a 4 °C até a utilização.

### 4.2 - Fracionamento protéico por solubilidade das proteínas presentes em farinha de sementes de *Acacia farnesiana* (L.) Willd.

A farinha de sementes de *Acacia farnesiana* (L.) Willd foi posta em contato com solução de NaCl 0,5M (1/10, m/v) por 4 horas sob agitação constante. A suspensão foi centrifugada e filtrada obtendo-se o Precipitado I e sobrenadante. O sobrenadante obtido foi dialisado exaustivamente contra água destilada e submetido à centrifugação, separando-se o precipitado (fração das Globulinas) do sobrenadante (fração das Albuminas). A fração das globulinas foi ressuspensa em solução de NaCl 0,5M, dialisada exaustivamente contra água e liofilizada, enquanto que a fração das albuminas foi submetida à diálise exaustiva contra água e liofilizada.

O precipitado I foi submetido à extração com solução de etanol 70% durante 1 hora, seguido de centrifugação e filtração. O sobrenadante obtido corresponde a fração das Prolaminas, foi dialisado exaustivamente contra água destilada e em seguida liofilizado. O Precipitado II resultante da última centrifugação foi submetido a extração com HCl 0,1M durante 1 hora, seguido de centrifugação e filtração, dando origem a fração das Glutelinas Ácidas (sobrenadante), sofrendo diálise contra água destilada e em seguida liofilizado, resultando também no Precipitado III.

A fração das glutelinas básicas correspondente ao sobrenadante resultante da extração do Precipitado III com NaOH 0,1M durante 1 hora, foi submetida a diálise e liofilização. O resíduo final produzido foi descartado. Cada fração protéica obtida por extração com diferentes soluções foi submetida à detecção da atividade hemaglutinante e dosagem de proteínas solúveis.

Todo o esquema de fracionamento protéico (Figura 2) por solubilização seguiu a metodologia clássica descrita por Osborne, 1924 e foi aplicado inicialmente por Santi-Gadelha (2005) para a farinha de sementes de *Acacia farnesiana*.

#### 4.3 - Determinação de Atividade Hemaglutinante

Para a determinação da atividade hemaglutinante nos extratos e nas diferentes frações protéicas da farinha de sementes de *Acacia farnesiana* foi utilizado o método descrito por Cavada (1980). As amostras a serem dosadas foram submetidas a diluições duplas seriadas (1:2, 1:4, 1:8, ...) em NaCl 0,15 M e, a 200  $\mu$ L de cada diluição, foi adicionado igual volume de uma suspensão de eritrócitos normais e tratados a 2% em NaCl 0,15 M. Os ensaios foram então incubados a 37°C

por 30 minutos e deixados em repouso à temperatura ambiente por mais 30 minutos, após o que, foram centrifugados a 1000 x g por 30 segundos à temperatura ambiente. Os títulos de hemaglutinação foram determinados como sendo o inverso da maior diluição ainda capaz de apresentar aglutinação visível a olho nu.

#### 4.4 – Quantificação de Proteínas Solúveis nos extratos e frações protéicas da farinha de sementes de *Acacia farnesiana*

As determinações de proteínas solúveis nas diferentes frações obtidas da farinha de sementes de *Acacia farnesiana* foram feitas segundo o método de Bradford (1976). Em cada 100  $\mu$ l de amostra, preparadas em diferentes concentrações, foram adicionados 2,5 ml do reagente de Bradford. A mistura foi então deixada em repouso por dez minutos e em seguida determinada à absorbância a 595 nm em um espectrofotômetro VIS LKB Novaspec II (Pharmacia). A concentração de proteínas solúveis em cada fração foi determinada a partir de uma curva padrão obtida com uso de albumina sérica bovina.

Farinha desidratada  
de *A. farnesiana*

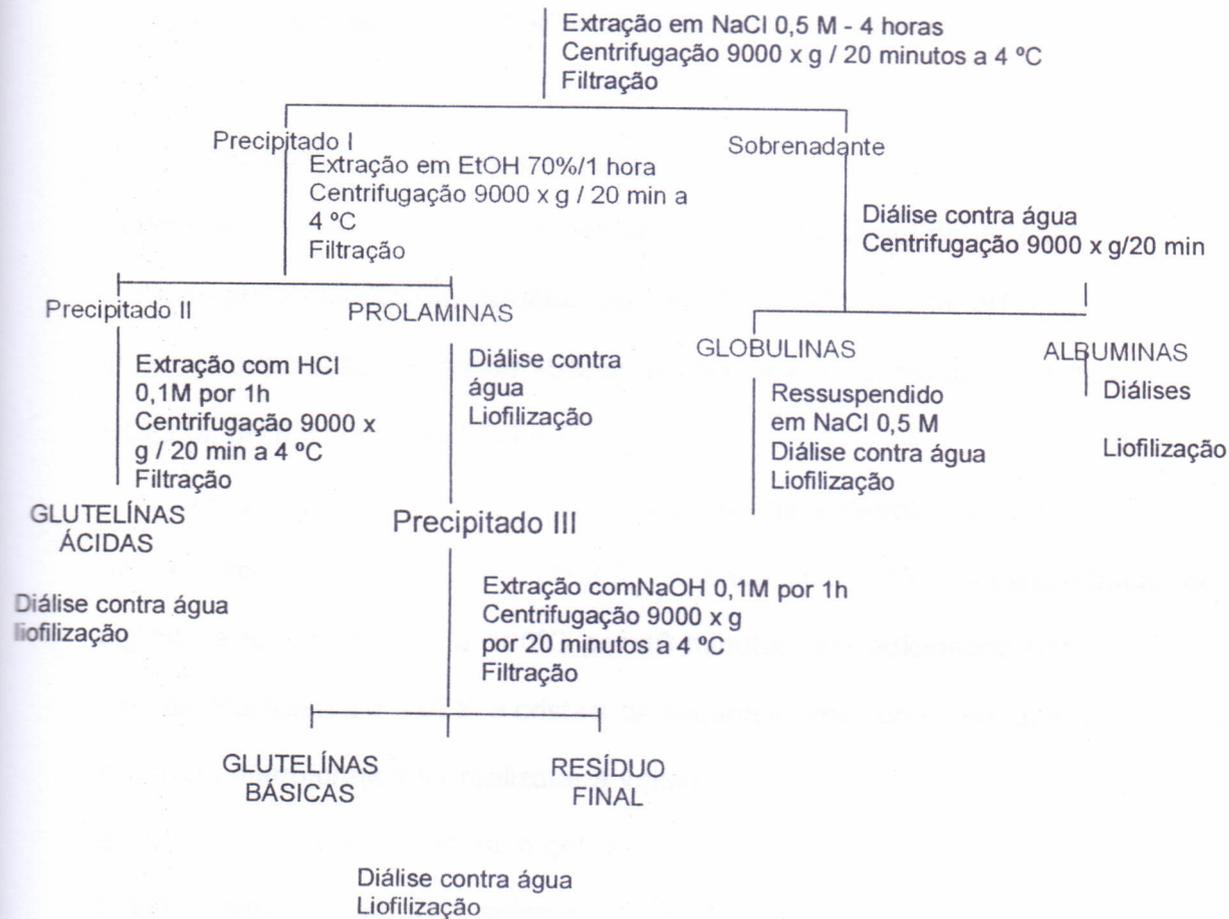


Figura 2 - Esquema de fracionamento do extrato protéico da farinha das sementes de *Acacia farnesiana*. Todas as centrifugações feitas anteriormente foram a 4 °C, durante 20 minutos e a 9000 g.

#### 4.5. - Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfatode sódio (SDS) e 2-mercaptoetanol das frações protéicas obtidas da farinha de sementes de *Acacia farnesiana*

Os experimentos de eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS e 2-mercaptoetanol nas diferentes frações obtidas da farinha de sementes de *Acacia farnesiana* foram realizados segundo a técnica descrita por Laemmli (1970), adaptada para uso de géis de separação em placas. O gel de aplicação (contendo 3,5% de poliacrilamida) foi montado em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 e SDS a 1%. O gel de separação (contendo 15% de poliacrilamida) foi montado em tampão Tris-HCl 3 M, pH 8,8 contendo SDS a 1%.

As amostras liofilizadas, a serem submetidas à eletroforese, foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,0625 M, pH 8,3, contendo SDS a 1%, na concentração de 2 mg/mL, e foram tratadas a 100°C por 10 minutos. Foi adicionado nas amostras o azul de bromofenol a 0,02% e cristais de sacarose antes de serem aplicadas ao gel. A corrida eletroforética foi realizada à voltagem constante (50 volts) por um período de 4 horas. Ao final da corrida, o gel foi corado com commassie brilliant blue R-250 a 0,05%, preparado em uma solução de metanol, ácido acético e água (1 : 3,5 : 8, v/v/v) e o excesso do corante retirado com uma solução de metanol, ácido acético e água (1 : 3,5 : 8, v/v/v), permitindo assim a visualização das bandas protéicas.

## 4.6. - Cromatografias

### 4.6.1. Cromatografia de Troca Iônica da Fração das Glutelinas Ácidas obtida da farinha de sementes de *Acacia farnesiana*

A fração das Glutelinas Ácidas extraída da farinha de sementes de *Acacia farnesiana* foi submetida a cromatografia de troca iônica em coluna Mono Q HR 5/5 acoplada a um sistema de cromatografia líquida de baixa pressão em Akta Purifier. A coluna foi previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,5. A amostra de glutelina ácida liofilizada foi dissolvida numa concentração de 1mg/mL no tampão de equilíbrio e em seguida aplicada na coluna. Após injeção da amostra, a coluna foi eluída em tampão de equilíbrio para a remoção de todo o material não retido pela mesma e em seguida foi realizado um gradiente de NaCl de 0 a 1M em tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,5 para a remoção do material retido na coluna. Os picos cromatográficos obtidos foram monitorados constantemente com comprimentos de onda de 280 nm. O pico ativo foi dialisado (30 trocas) contra água destilada e liofilizado.

Para análise do grau de pureza e posteriores caracterizações química da lectina purificada os processos seguintes foram realizados a partir do material purificado em cromatografia de troca iônica em coluna Mono Q HR 5/5 descrito acima.

#### 4.6.2. Cromatografia de fase reversa da lectina isolada da fração das Glutelinas Ácidas de *Acácia farnesiana* em coluna C<sub>18</sub> acoplada a um sistema FPLC/HPLC (Akta)

Para determinar o grau de pureza da lectina de *Acacia farnesiana* presente na fração glutelína ácida isolada por cromatografia de troca iônica em coluna de Mono Q HR 5/5 foi realizada cromatografia de fase reversa em coluna C18 acoplada a um sistema de cromatografia líquida de alta pressão (sistema AKTA Purifier). A lectina isolada foi dissolvida em água e TFA a 0,1 % na concentração de 1,0 mg/mL e aplicada na coluna 100 µl da amostra. O material não retido foi eluído em tampão de equilíbrio e para remoção do material retido na coluna foi utilizado um gradiente (0 a 100 %) de acetonitrila em TFA a 0,1 %.

#### 4.6.3. Cromatografia de exclusão molecular da lectina isolada da fração das Glutelinas Ácidas de *Acacia farnesiana*

A lectina isolada de *Acacia farnesiana* presente na fração glutelína ácida, obtida da coluna de troca iônica, foi submetida à cromatografia de exclusão molecular em coluna TSK-GelSW3000 acoplada a um sistema de baixa pressão utilizando o equipamento AKTA Purifier para se determinar o grau de pureza, massa molecular aparente e presença e grau de dimerização da lectina isolada. Para isso, a lectina foi dissolvida em Tris-HCl 20 mM, pH 8,0 numa concentração final de 1,0 mg/mL e a eluição realizada com o mesmo tampão de dissolução da amostra com um fluxo de 0,5 mL/min monitorado a 280 nm.

#### 4.6.4. Cromatofocalização da lectina isolada da fração das Glutelinas Ácidas de *Acacia farnesiana*

Para determinar o ponto isoeletrico da lectina isolada foi realizada cromatofocalização em coluna Mono P HR5/5 previamente equilibrada em tampão Tris-HCl, 20 mM, pH 7,4. A amostra foi dissolvida em tampão Tris-HCl, 20 mM, pH 7,4 numa concentração final de 1,0 mg/mL e aplicada na coluna de cromatofocalização. O tampão de equilibrio foi utilizado para eluição do material não retido na coluna. A lectina retida na coluna foi eluída num gradiente de pH utilizando-se tampão Pollybuffer 7 a 4. O valor de pH correspondente ao pico eluído representa o valor do ponto isoeletrico desta lectina. A eluição só se torna possível quando a lectina apresenta carga líquida igual à zero em tampão Pollybuffer 7 a 4 não interagindo mais com a coluna.

#### 4.6.5. Cromatografia de afinidade em coluna de CNBr-Sepharose/Anti PPL da lectina isolada da fração das Glutelinas Ácidas de *Acacia farnesiana*

Anticorpos contra lectina de *Parkia platycephala* (Anti PPL) foram produzidos e imobilizados em gel de Sepharose obtendo-se uma matriz cromatográfica de afinidade. Para se determinar a presença de epítomos semelhantes entre lectinas de diferentes espécies de Mimosoideas foi realizada cromatografia de afinidade em coluna de CNBr-Sepharose/Anti PPL. A lectina presente na fração glutelina ácida de *Acacia farnesiana* foi dissolvida em NaCl 0,5 M numa concentração final de 1,0 mg/mL e aplicada na coluna de CNBr-Sepharose/Anti PPL. O material não retido foi

eluído com a solução de equilíbrio e para remover a lectina adsorvida ao anticorpo imobilizado (Anti PPL-Sepharose) foi utilizado Diaminopropano 0,1 N, pH 11,0.

#### 4.7. PAGE-SDS do pico da Anti-PPL/Sepharose

O pico obtido pela cromatografia de afinidade em coluna de CNBr-Sepharose/Anti PPL foi submetido a análise em eletroforese de gel de poliacrilamida em presença de SDS e 2-mercaptoetanol para determinar se o material retido pelo anticorpo anti PPL correspondia a lectina isolada da fração glutelina ácida de *Acacia farnesiana*. Esta metodologia foi realizada de acordo com a descrita por Laemmli (1970), adaptada para uso de géis de separação em placas. O gel de aplicação (contendo 3,5% de poliacrilamida) foi montado em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 e SDS a 1%. O gel de separação (contendo 15% de poliacrilamida) foi montado em tampão Tris-HCl 3 M, pH 8,8 contendo SDS a 1%.

As amostras liofilizadas, a serem submetidas à eletroforese, foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,0625 M, pH 8,3, contendo SDS a 1%, na concentração de 2 mg/mL, e foram tratadas a 100°C por 10 minutos. Foi adicionado nas amostras azul de bromofenol a 0,02% e cristais de sacarose antes de serem aplicadas ao gel. A corrida eletroforética foi realizada à voltagem constante (50 volts) por um período de 4 horas. Ao final da corrida, o gel foi corado com commassie brilliant blue R-250 a 0,05%, preparado em uma solução de metanol, ácido acético e água (1 : 3,5 : 8, v/v/v) e o excesso do corante retirado com uma solução de metanol, ácido acético e água (1 : 3,5 : 8, v/v/v), permitindo assim a visualização das bandas protéicas.

#### 4.8. - Coeficiente de extinção molar da lectina isolada da fração das Glutelinas Ácidas de *Acácia farnesiana*

O espectro de absorção da lectina isolada da fração das Glutelinas Ácidas de *Acácia farnesiana* foi determinado em espectrofotômetro GENESYS-5 (Spectronic), com cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. A lectina de *A.farnesiana*, a uma concentração de 1 mg/mL, foi preparada em NaCl 0,15 M e a absorbância determinada na faixa da luz ultravioleta. A partir do espectro de absorção foi calculado o coeficiente de extinção molar.

#### 4.9. - Análise de Aminoácidos e de Aminoaçúcares da lectina isolada da fração das Glutelinas Ácidas de *Acácia farnesiana*

As análises de aminoácidos e aminoaçúcares da lectina da fração das Glutelina Ácidas de sementes de *Acacia farnesiana* intacta e reduzida e da lectina alquilada foram realizadas com um analisador de aminoácidos System Gold (Beckman), após a hidrólise ácida com HCl 6 M a 110°C por 24 horas para aminoácidos e com HCl 4 M por 4 horas para aminoaçúcares e acondicionamento das amostras em ampolas lacradas. Para determinações de açúcares neutro e ácido siálico, amostras de 1 mg de lectina de *A.farnesiana* foram hidrolisadas com HCl 2 M por 2 horas a 110°C e ácido trifluoroacético 0,2 M por 1 hora a 80°C, respectivamente. Depois que os monossacarídeos foram hidrolisados e secos em Speed Vac (Savant, Alemanha), os mesmos foram analisados em coluna CarboPac

PA 1 (4 x 200mm), eluída a fluxo 1 mL/minuto com acetato de sódio 60 mM contendo NaOH 16 mM para açúcares neutros ou em acetato de sódio 60mM contendo NaOH 20 mM para ácido siálico, usando analisador Dionex DX-300 equipado com detector amperométrico de pulsação e software cromatográfico AI-450 (Anumula & Taylor, 1991).

#### 4.10. Determinação da Seqüência N-terminal de Aminoácidos da lectina isolada da fração das Glutelinas Ácidas de *Acácia farnesiana*

A seqüência N-terminal de aminoácidos da lectina da fração das Glutelinas Ácidas de sementes de *A. farnesiana* foi determinada por análise da seqüência N-terminal pelo princípio da degradação de Edman (usando seqüenciadores automáticos Applied Biosystem modelos 473A e 492) e por sobreposição das seqüências dos peptídeos gerados por clivagens química e proteolítica. A proteína na concentração de 1 a 5 mg foi dissolvida em 200 µL de tris-HCl 100 mM, pH 8,5 contendo hidrocloreto de guanidina 6 M e reduzido por adição de 10 µL de 2-mercaptoetanol a 50°C por 2 horas. A solução foi resfriada à temperatura ambiente, alquilada com 20 µL de vinilpiridina por 2 horas na ausência de luz, dialisada contra bicarbonato de amônio 200 mM e liofilizada. A busca por similaridade de seqüência de aminoácidos em banco de dados foi realizada com o programa BLASTP 2.0.5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

#### 4. 11. Atividades biológicas da lectina isolada da fração das Glutelinas Ácidas de *Acácia farnesiana*

##### 4.11.1 Atividade antibacteriana contra *Xanthomonas axonopodis pv passiflorae* ou *Clavibacter michiganensis michiganensis* da lectina isolada da fração das Glutelinas Ácidas de *Acácia farnesiana*

Linhagens de bactérias *Xanthomonas axonopods pv passiflorae* ou *Clavibacter michiganensis* foram cultivadas em placa de NA (nutrient agar), enriquecido com peptona e outros nutrientes para o crescimento das bactérias. Após o tempo de incubação, amostras das bactérias crescidas em meio NA foram coletadas e suspensas em tampão fosfato 0,01M, pH 7,4 em presença de peptona a 1%. Estas aliquotas de suspensão bacteriana foram ajustadas até uma concentração mãe de  $10^6$ UFC/ ml, ajustando a absorbância da solução mãe em  $A_{650nm} = 0,3$  unidade de absorbância. Esta suspensão inicial previamente ajustada foi então diluída a uma concentração bacteriana de  $10^3$ UFC/ ml (concentração final) que foi usada para incubação com as proteínas em diferentes concentrações de 0 a 400 $\mu$ g, seguindo então a uma incubação de 20 a 30 minutos. Após o tempo de incubação, cerca de 250 $\mu$ l desta suspensão foi então aplicada sobre placas de petri em NA em estufa a 37°C durante 48h.

#### 4.11.2. Atividade antibacteriana contra *Streptococcus mutans* da lectina isolada da fração das Glutelinas Ácidas de *Acácia farnesiana*

Linhagens de bactérias de *Streptococcus mutans* crescidas em meio BHI (Infusão de Cérebro e Coração – DIFCO), 24 horas antes, foram coletadas e suspensas em tampão fosfato 0,01M, pH 7,4. Estas alíquotas de suspensão bacteriana foram ajustadas até uma concentração mãe de  $10^6$ UFC/ ml, ajustando a absorbância da solução mãe em  $A_{650nm} = 0,3$  unidade de absorbância. Esta suspensão inicial previamente ajustada foi então diluída a uma concentração bacteriana de  $10^3$ UFC/ ml (concentração final) que foi usada para incubação com as proteínas em diferentes concentrações de 0 a 400 $\mu$ g, seguindo então a uma incubação de 20 minutos. Após o tempo de incubação cerca de 250 $\mu$ l desta suspensão foi então aplicada sobre placas de petri com agar sangue e então se procede a uma incubação, em condições de escuro, em anaerobiose (via injeção de CO<sub>2</sub> e retirada completa o ar da câmara de incubação, dando uma concentração final de CO<sub>2</sub> na câmara a 10%) a 37°C para possibilitar o crescimento das colônias de *Streptococcus mutans*, por 72 horas e analisadas posteriormente por contagem de colônias de bactérias.

#### 4.11.3 - Ensaio de Agregação plaquetária da lectina isolada da fração das Glutelinas Ácidas de *Acácia farnesiana*

Amostras de sangue foram coletadas de voluntários sadios que não consumiram nenhum medicamento a pelo menos 14 dias antes da coleta de sangue. O sangue foi coletado em seringas de polipropileno estéreis e transferido

imediatamente para tubos de polipropileno estéreis (tipo falcon) contendo citrato trisódios a 0,38% na solução final no tubo. A amostra de sangue foi então centrifugada por 20 minutos a 150xg para obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP, platelet-rich plasma), que foi usado dentro das três primeiras horas do ensaio. Para a preparação das plaquetas lavadas, o PRP foi recentrifugado em presença de 50nM de prostaciclina a 800xg por 10 minutos para obter o "pellet" plaquetário. O sobrenadante foi recolhido e o "pellet" será suspenso em tampão fisiológico (150mM de NaCl; 5mM de Hepes; 0,55mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 7mM de NaHCO<sub>3</sub>; 2,7mM de KCl; 0,5mM de MgCl<sub>2</sub>; 5,6mM de Glicose; ajustada para com solução de fosfato monofosfato a pH 7,4) e diluído para uma contagem de plaqueta de 3x10<sup>8</sup> plaquetas por ml. As plaquetas foram então deixadas em repouso a fim de recuperar sua capacidade agregante em presença de agentes indutores de agregação plaquetária. A contagem de plaquetas foi feita em um contador Coulter S Plus (Coulter Eletronics, Hialeah, FL, USA) ou por microscopia de contraste de fase. A medida da agregação plaquetária foi feita em um agregometro de plaquetas Chrono-log Lumiaggregometer (Chrono-Log Corp, Haverton, PA, USA) usando alíquotas de 0,45ml de plaquetas de paciente, colocado em cubetas de agregometro e mantido a 37°C e sob agitação constante a 1200 rpm com agitador magnético.

#### 4.11.4 - Microscopia eletrônica de varredura

Amostras foram analisadas em microscopia eletrônica de varredura onde foram examinadas após o tempo de incubação das bactérias com ou sem lectina. Após o tempo de incubação as amostras de bactérias foram fixadas a 4°C em 0,1M

de tampão cacodilato pH 7,4, contendo 2,5% de glutaraldeído por 12 horas para serem preparadas em microscopia eletrônica de varredura. As amostras de bactérias fixadas foram colocadas em filtros de policarbonato (tamanho de poro: 1 $\mu$ m, Millipore) e foram "lavadas" com tampão de cacodilato 0,1M e desidratadas com soluções crescentes de etanol. As amostras foram então cobertas com uma fina película de ouro usando um E5200 Autosputter coater. As análises de microscopia eletrônica de varredura foram feitas usando microscópio eletrônico de varredura Cambridge Stereoscan S240.

## 5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 - Atividade hemaglutinante e atividade específica das frações protéicas obtidas por diferentes solubilidades das proteínas da farinha de sementes de *Acacia farnesiana*

A Tabela 1 apresenta os dados do teor de proteínas solúveis, atividade hemaglutinante e atividade hemaglutinante específica das frações protéicas obtidas por fracionamento sequencial baseado em solubilidade das proteínas da farinha de sementes de *Acacia farnesiana*. Com exceção da fração glutelína básica que não apresentou atividade hemaglutinante contra hemácias de coelho (não tratadas ou tratadas previamente com tripsina ou papaína), todas as outras frações apresentaram atividades hemaglutinantes específicas, destacando-se a fração prolamina com uma atividade hemaglutinante específica significativamente maior, devido, principalmente ao baixo teor protéico. Enquanto a purificação e a caracterização da lectina da fração albumina foi objeto de outro estudo (Santi Gadelha, 2005), o presente trabalho se dedicou a purificação e caracterização da lectina presente na fração glutelína ácida. Através da tabela 1 percebe-se que esta fração apresenta um teor de proteínas razoável (4,2 mgP/gF) quando comparado com as frações albumina (5,5 mgP/gF) e globulina (5,9 mgP/gF), além de apresentar uma maior atividade hemaglutinante específica que aquelas frações. Entretanto, quando comparado com outras leguminosas, constata-se que, em geral, as sementes de *Acacia farnesiana* apresentam baixos teores protéicos nestas frações.

Tabela 1 - Teor de Proteínas e Atividade Hemaglutinante das Frações Protéicas de farinha de sementes de *Acacia farnesiana* contra hemácias de coelho não tratadas e tratadas com enzimas proteolíticas .

Frações	Proteínas (mgP/gF)	Atividade hemaglutinante (UH/gF)			UH/mgP
		Hemácias normais	Hemácias papainizadas	Hemácias tripsinizadas	
Albumina	5,5	640	640	640	116,36
Globulina	5,9	640	640	640	108,47
Glut. ácida	4,2	640	640	640	152,38
Glut. básica	0,5	-	-	-	-
Prolamina	0,5	640	640	640	1280,00

\*Atividade hemaglutinante específica (UH/mgP)

## 5.2 – Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS) e 2-mercaptoetanol das frações protéicas obtidas da farinha de sementes de *Acacia farnesiana*

A Figura 3 apresenta o gel obtido por eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% em presença SDS e 2-mercaptoetanol das frações protéicas obtidas da farinha de sementes de *Acacia farnesiana*, onde o perfil eletroforético da fração glutelina ácida se apresentou caracterizado por uma dupla banda protéica com massa

molecular aparente em torno de 60-65 kDa, indicando que a fração protéica apresenta um grau de pureza satisfatório. Estes dados, juntamente com aqueles obtidos por Santi-Gadelha (2005) durante o processo de purificação de uma lectina presente na fração albumina da farinha da mesma semente, deixam claro que o fracionamento protéico baseado na solubidade preconizado por Osborne (1924), foi bastante eficaz não só para estudos de detecção de lectinas mas também foi bastante efetivo como um processo de purificação dessas proteínas ativas.

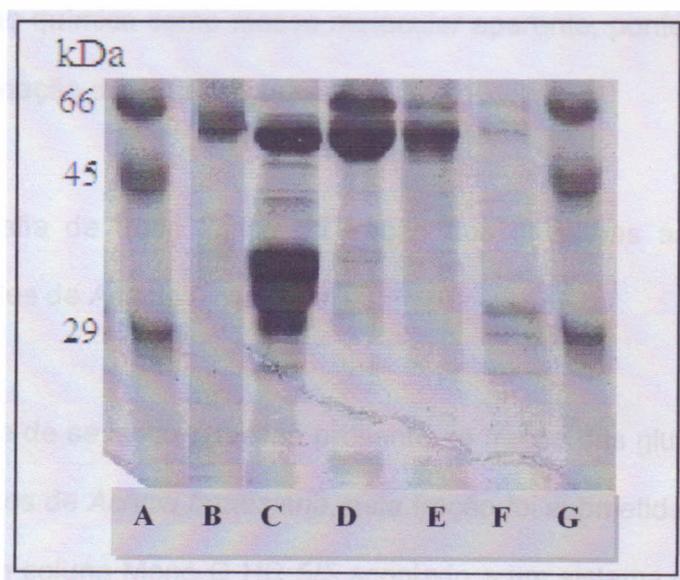


Figura 3 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 15% em presença de SDS e  $\beta$ -Mercaptoetanol. B: Globulinas; C: Albuminas; D: Glutelinas Ácidas; E: Glutelinas Básicas; F: Prolaminas; A e G: Marcadores de massas moleculares aparentes: Albumina sérica bovina (66 kDa); Ovoalbumina (45 kDa); Anidrase carbônica (29 kDa).

### 5.3 Cromatografias

É sabido que técnicas cromatográficas têm sido utilizadas como meios de se isolar lectinas presentes em sementes de muitas leguminosas. Essas técnicas são utilizadas não só como suportes para isolamento mas também são úteis nos processos de caracterização das lectinas isoladas. A fração protéica de glutelina ácida obtida da farinha de sementes de *Acacia farnesiana* foi submetida a diversas técnicas cromatograficas resultando no isolamento de uma lectina ativa bem como sua caracterização química como massa molecular aparente, ponto isoelétrico e até mesmo a determinação do grau de pureza.

#### 5.3.1. Cromatografia de troca iônica da fração das glutelinas ácidas obtidas da farinha de sementes de *Acacia farnesiana*

Na tentativa de se isolar a lectina presente na fração das glutelinas ácidas da farinha de sementes de *Acacia farnesiana*, esta fração foi submetida à cromatografia de troca iônica em coluna Mono Q HR 5/5 acoplado a um sistema de cromatografia líquida de baixa pressão - AKTA Purifier, cujos resultados são apresentados na Figura 4. Para eliminar todo material não retido na coluna esta foi eluída com tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,5 apresentando picos não significativos e bastante assimétricos sem atividade hemaglutinante, indicando a eliminação de contaminantes. A lectina foi eluída em tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,5 em gradiente de NaCl de 0 a 1M, apresentando toda atividade hemaglutinante contida num pico simétrico e bastante significativo quando monitorados por espectrofotômetro a um comprimento de onda de 280 nm. Existem vários exemplos na literatura da obtenção

de lectinas puras com o uso apenas da cromatografia de troca iônica como método de isolamento, como ocorre com a lectina das algas vermelhas *Hypnea musciformis* (Nagano & col., 2002) e *Hypnea cervicornis* (Nascimento & col., 2005).

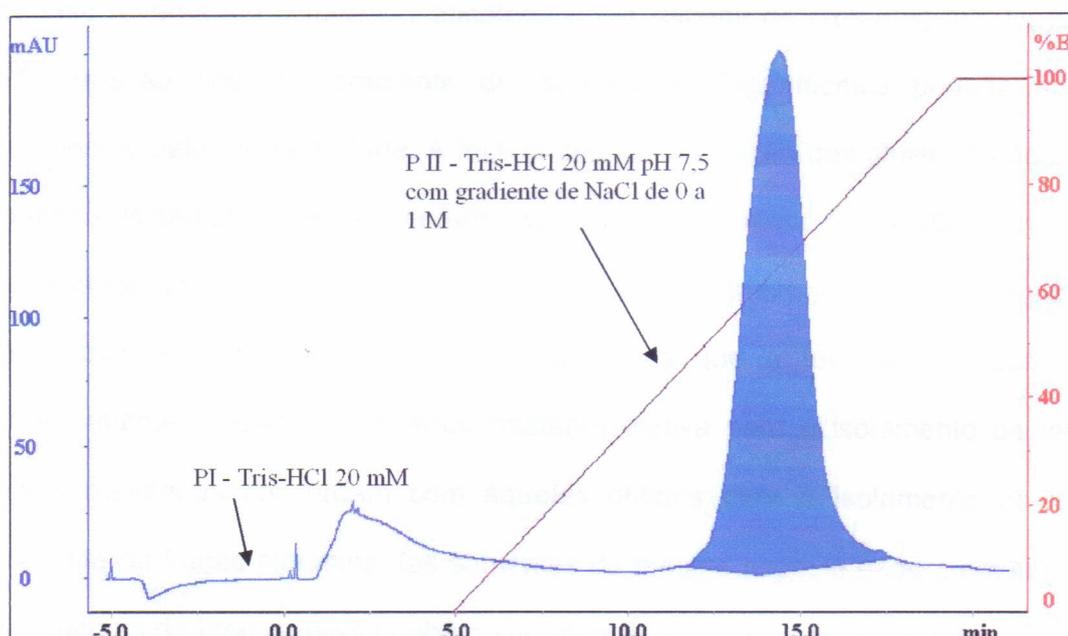


Figura 4 – Cromatografia de troca iônica em coluna Mono Q HR 5/5 acoplada a um sistema de cromatografia líquida de baixa pressão – AKTA Purifier. PI representa o material não retido eluído em tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,5 e o PII corresponde ao material ativo eluído em tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,5 em gradiente de NaCl de 0 a 1 M. O procedimento foi monitorado constantemente por espectrofotômetro com absorvância de 280 nm e um fluxo constante de 1mL/min.

### 5.3.2 - Cromatografia de fase reversa da lectina isolada da fração das glutelinas ácidas de *Acácia farnesiana* em coluna de C<sub>18</sub> acoplado a um sistema de FPLC/HPLC (AKTA)

Uma das maneiras utilizadas para se detectar a pureza da lectina isolada em coluna de troca iônica Mono Q HR 5/5 é a submissão desta lectina a cromatografia de fase reversa em coluna C<sub>18</sub> acoplada a um sistema de cromatografia líquida de alta pressão sob um gradiente de acetonitrila. Esta técnica permite separar compostos pela hidrofobicidade. A lectina oriunda da fração das glutelinas ácidas da farinha das sementes de *Acacia farnesiana* isolada em Mono Q HR 5/5 (troca iônica) apresentou um único pico bastante simétrico quando submetida à cromatografia de fase reversa (Figura 5). Esse resultado indica que a técnica de troca iônica anteriormente utilizada se mostrou bastante efetiva para o isolamento da lectina. Estes resultados concordam com aqueles obtidos para o isolamento da lectina presente na fração albumina das sementes da mesma espécie onde cromatografias em colunas de fase reversa também são efetivas como etapas de purificação (Santi-Gadelha, 2005). Além disto, e não menos importante, o fato de em ambos os casos as lectinas terem sido eluídas como um único pico simétrico indica, fortemente, que estas lectinas se encontram puras e que ocorrem como uma única cadeia polipeptídica (subunidade). No caso das lectinas do gênero *Lathyrus*, com aquelas das sementes de *Lathyrus ochrus* (Rougé & Cavada, 1984) e *Lathyrus cicera* (Cavada & Rougé, 1985), procedimentos de cromatografias em colunas de fase reversa acopladas a sistemas HPLC foram efetivas para a separação das subunidades alfa ou (leve) e beta (pesada) que compõem estas proteínas. Nestes casos esta é uma etapa fundamental para o sequenciamento da subunidade destas

lectinas ou submetê-las a processos de cristalização das mesmas (ativas) separadamente.

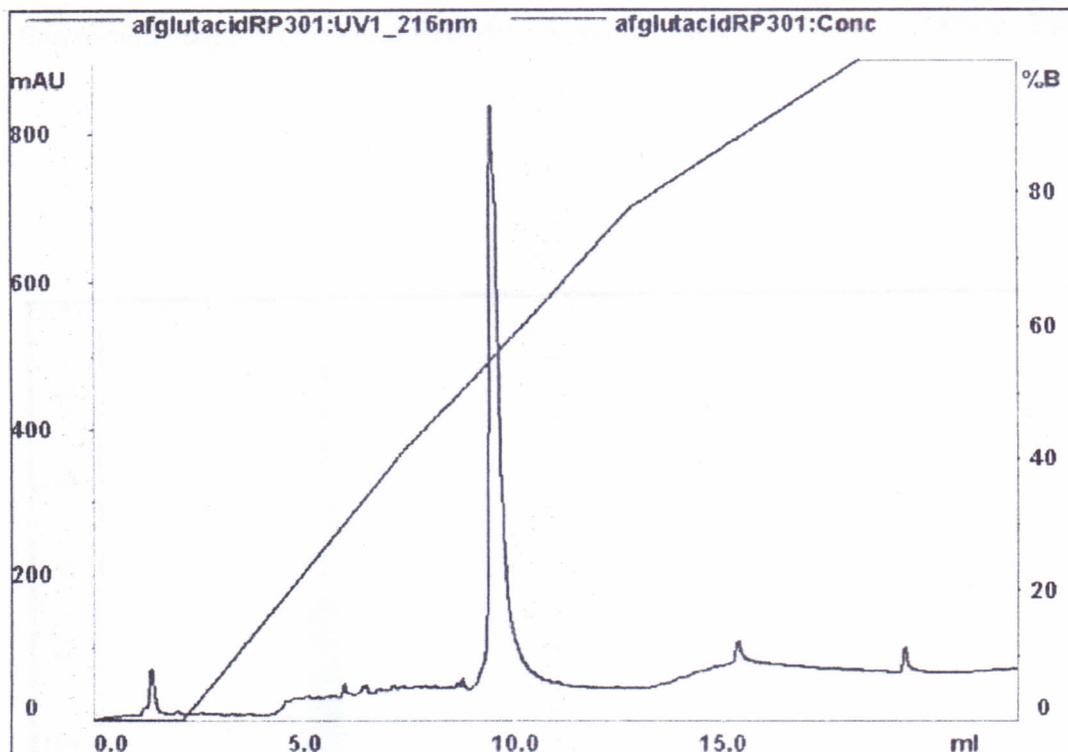
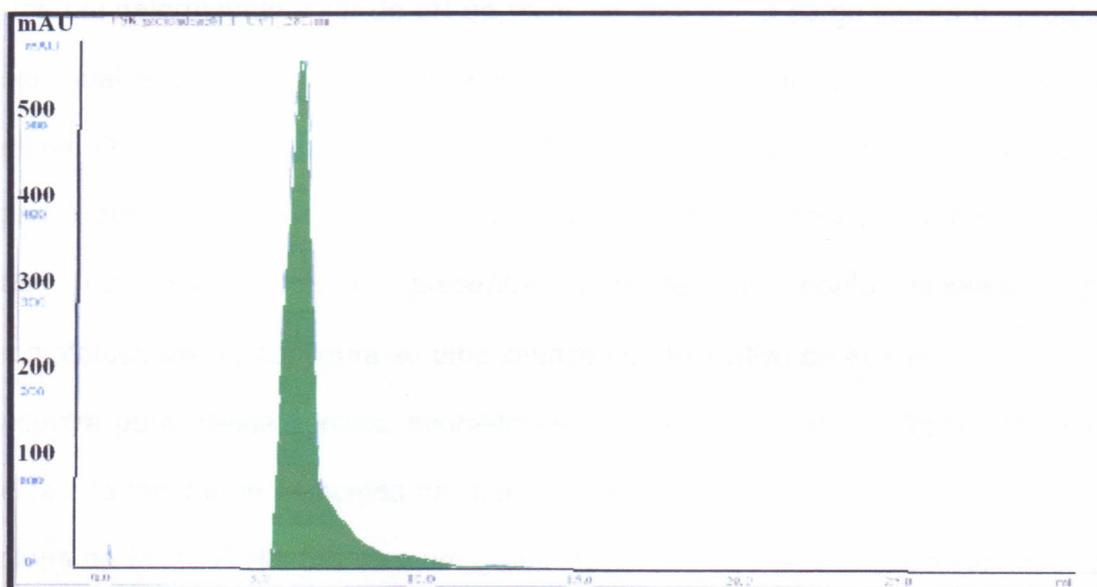


Figura 5 – Cromatografia de fase reversa em coluna C<sub>18</sub> acoplada a um sistema de cromatografia líquida de alta pressão – HPLC.

### 5.3.3 - Cromatografia de exclusão molecular da lectina isolada da fração das glutelinas ácidas de *Acacia farnesiana*.

O resultado de exclusão molecular da lectina de fração das glutelinas ácidas de *Acacia farnesiana* mostra o grau de pureza da lectina, uma vez que o pico

mostrou-se simétrico (Figura 6), além de sugerir que esta lectina não sofre oligomerização, confirmando a presença de uma única massa molecular aparente o que foi reafirmado por PAGE-SDS (dados não mostrados). Estes dados também confirmam os já descritos pela lectina de *Acacia constricta* e das isolectinas de *Phaseolus vulgaris* (PHA-L e PHA-E) como descritos por Guzmán-Partida (2004).



Figuras 6 - Gráfico de exclusão molecular realizada em coluna de sílica gel (TSK-GSW 3000). A lectina da fração glutelina ácida de *Acacia farnesiana* submetida a cromatografia de exclusão molecular equilibrada e eluída em tampão Tris-HCl pH 8,0 20 mM monitorada a 280 nm com fluxo constante de 0,5 mL/min.

#### 5.3.4 – Cromatofocalização da lectina isolada da fração das glutelinas ácidas de *Acacia farnesiana* em coluna Mono P HR 5/5

Uma dos procedimentos mais adequados para avaliar se uma dada proteína ocorre ou não como isoformas é através de procedimentos de cromatofocalização onde a proteína, supostamente pura, é imobilizada em uma coluna carregada negativamente e eluída por um gradiente de pH. A eluição da proteína imobilizada pelos grupamentos negativos acoplados na coluna é feita por um gradiente de pH, onde um determinado valor de pH do meio faz com que a carga líquida da proteína seja igual a zero. Sendo assim, a mesma não apresentando carga é eluída da coluna. O valor de pH do tampão utilizado que leva a proteína a uma carga líquida igual a zero representa o ponto isoelétrico da proteína analisada. Além disto, no caso de uma proteína apresentar somente um ponto isoelétrico por cromatofocalização configura-se uma situação de indicativo de que esta proteína se encontra pura. Neste sentido, submeteu-se a lectina presente na fração glutelinas ácidas da farinha de sementes de *Acacia farnesiana* a uma cromatofocalização em coluna de Mono P HR 5/5 com um gradiente de pH de 7 a 4, cujos resultados são apresentados na Figura 7. A lectina apresentou somente um ponto isoelétrico (pH 4,6), indicando que se encontra pura e que é uma proteína de caráter ácido quando em solução. No caso da lectina presente na fração albumina da mesma espécie, a mesma apresentou um único ponto isoelétrico a pH 4,0 (Santi-Gadelha, 2005), indicando em ambos os casos que a cromatofocalização, nestas situações, é um critério para se monitorar a pureza destas proteínas. Por outro lado, para os dois casos, a cromatofocalização é um forte indicativo de que estas lectinas não apresentam isoformas, como observado para as lectinas das leguminosas *Lathyrus*

*ochrus* (Rougé & Cavada, 1984) e *Lathyrus cicera* (Cavada & Rougé, 1985), que se apresentam como isolectinas com pontos isoelétricos bastante próximos, mas que podem ser discriminados por cromatofocalização.

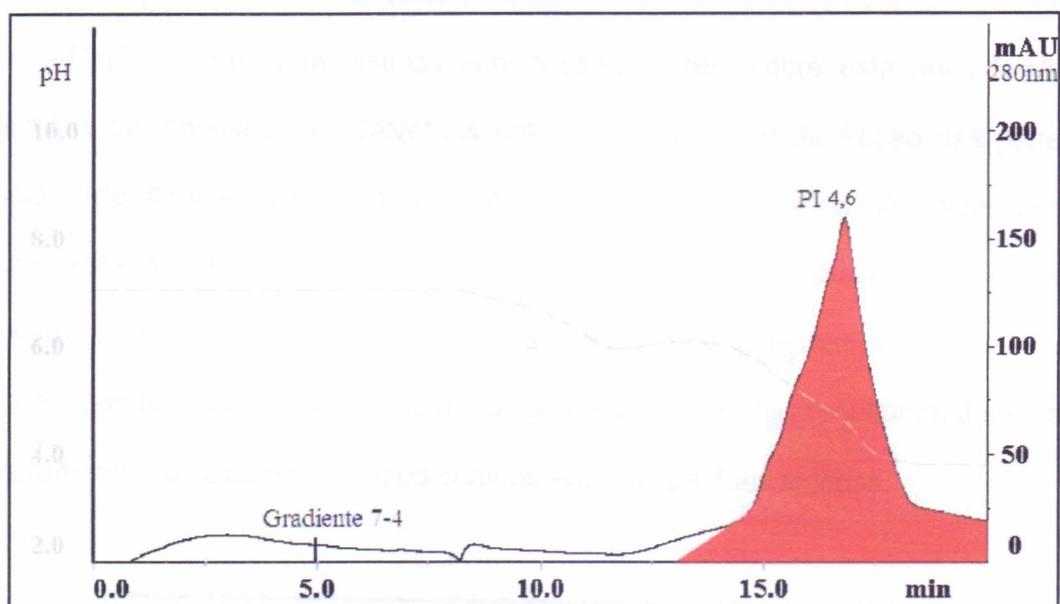


Figura 7 - Cromatofocalização em coluna Mono-P HR 5/5 da lectina presente na fração glutelina ácida de sementes de *Acacia farnesiana* purificada em cromatografia de troca iônica em coluna Mono Q HR 5/5. A lectina foi eluída com um gradiente linear de pH de 7 a 4 utilizando-se pollybuffer 74, com leitura de absorbância a 280 nm e um fluxo constante de 1mL/min.

5.3.5 - Cromatografia de afinidade em coluna de CNBr-Sepharose/AntiPPL da lectina isolada da fração das glutelinas ácidas da farinha de sementes de *Acacia farnesiana*.

Partindo do princípio que existem pouquíssimas lectinas (5) purificadas de espécies da sub-família Mimosoideae, das quais duas lectinas de sementes de *Parkia platycephala* – PPL (Cavada & col., 1996) e de *Parkia discolor* (Cavada & col., 1997), e que pouquíssimas informações se têm sobre esta nova família de lectinas de leguminosas (Calvete & col., 2001), a lectina da fração das glutelinas ácidas de *Acacia farnesiana* foi submetida a uma coluna de afinidade contendo anticorpos anti PPL imobilizados covalentemente em CNBr-Sepharose. A figura 8 mostra que efetivamente a lectina da fração das glutelinas ácidas de *Acacia farnesiana* foi reconhecida pelos anticorpos anti-PPL. Esses resultados demonstram claramente que existem epitopos comuns entre estas duas lectinas.

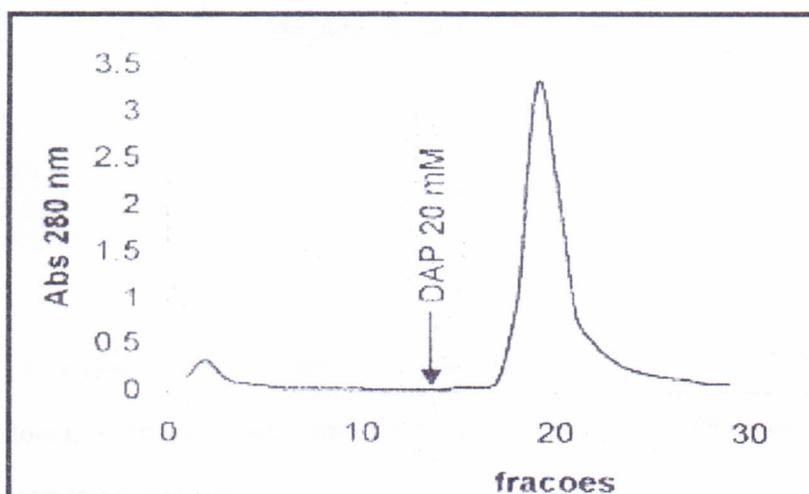
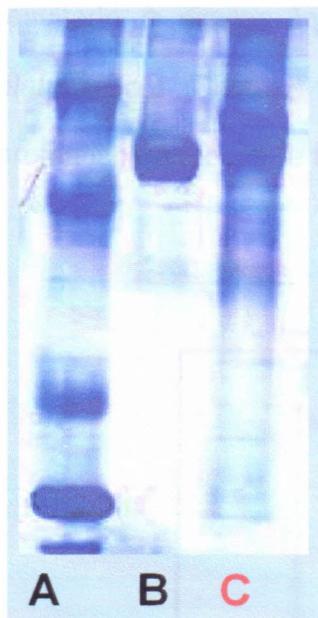


Figura 8: Cromatografia de afinidade da lectina da fração das glutelinas ácidas de *Acacia farnesiana* em coluna de CNBr-Sepharose Anti-PPL

#### 5.4 - PAGE-SDS do pico da Anti-PPL/Sepharose

O pico retido na coluna Anti-PPL/Sepharose, e que contém toda a atividade hemaglutinante, quando submetido a uma eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS e 2-mercaptoetanol (Figura 9), apresentou um perfil eletroforético idêntico ao já observado para a lectina da fração das glutelínicas ácidas de *Acacia farnesiana*.



A: Marcadores moleculares

B: Lectina da fração albumínica de *Acacia farnesiana*

C: Lectina da fração das glutelínicas ácidas de *Acacia farnesiana*

Figura 9. Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS e 2-mercaptoetanol do pico retido (em C) na cromatografia de afinidade em coluna de CNBr-Sepharose/Anti-PPL.

## 5.5 - Coeficiente de extinção molar

Quando a lectina da fração das glutelinas ácidas de sementes de *Acacia farnesiana* foi submetida a uma varredura espectrofotométrica de 200 a 400 nm obteve-se uma absorbância máxima a 280 nm (Figura 10) que permitiu a determinação de um coeficiente de extinção molar de 6,28. Este valor é extremamente inferior aos coeficientes de extinção molar como 12,00 para a lectina de sementes de *Dioclea grandiflora* (Moreira & col., 1983) e 11,00 para a lectina PPL2 de sementes de *Parkia platycephala* (Castellon, 2004). Entretanto, este resultado é similar àqueles encontrados para a PPL de sementes de *Parkia platycephala* (Santos, 1992), o que pode refletir um baixo teor de aminoácidos aromáticos triptofano e tirosina.

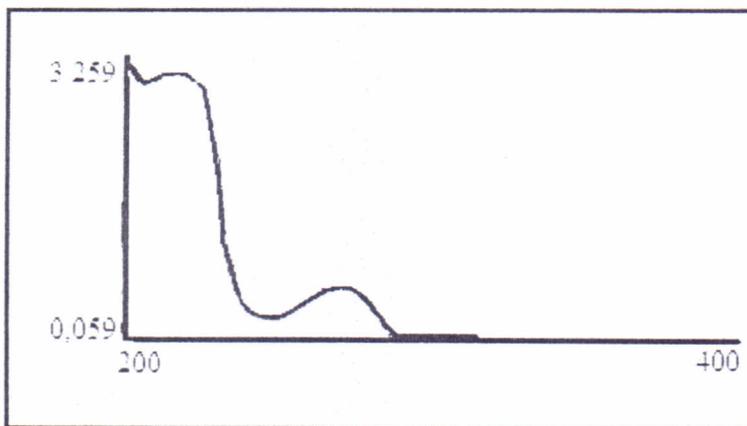


Figura 10 – Espectro de absorção da lectina da fração das glutelinas ácidas de sementes de *Acacia farnesiana*.

## 5.6 - Análise de Aminoácidos e de Aminoaçúcares

Quando a lectina da fração das glutelinas ácidas de sementes de *Acacia farnesiana* foi submetida à análise de aminoácidos e de aminoaçúcares, obteve-se os resultados apresentados na tabela 2. Observa-se que esta lectina apresentou um maior conteúdo de resíduos de ácido ASX (ácido aspártico/asparagina), GLX (ácido glutâmico/glutamina) e leucina. Quando a composição de aminoácidos da lectina isolada foi comparada com as de lectinas das espécies da mesma subfamília *Parkia platycephala* (PPL), *P. discolor* e *P. speciosa* de uma forma geral apresentou valores percentuais parecidos, diferindo apenas por apresentar menores conteúdos de serina, glicina, treonina e lisina. Entretanto, a lectina da fração das glutelinas ácidas de *Acacia farnesiana* apresentou maiores teores de ASX, GLX, ARG e LEU.

Tabela 2 - Comparação da composição de aminoácido da lectina da fração das glutelinas ácidas de *Acacia farnesiana* as do gênero *Parkia*.

Resíduo de Aminoácido	Lectinas da glut. ácidas <i>A. farnesiana</i>	*Lectina de <i>Parkia platycephala</i>	**Lectina de <i>Parkia discolor</i>	***Lectina de <i>Parkia speciosa</i>
Ác. Aspártico/asparagina	12,19	9,80	9,90	11,30
Ác. Glutâmico/glutamina	13,94	4,70	10,20	5,10
OH- Prolina	Nd	Nd	Nd	Nd
Serina	7,33	9,10	7,90	9,20
Glicina	7,47	15,40	12,80	15,80
Histidina	1,60	2,10	1,70	2,50
Arginina	5,65	1,20	3,30	2,70
Treonina	3,73	6,30	6,00	7,10
Alanina	7,78	6,00	7,30	5,60
Prolina	8,99	13,7	9,10	5,40
Tirosina	2,63	4,30	4,00	4,30
Valina	4,82	4,50	4,40	5,70
Metionina	0,86	0,40	0,50	0,50
Cisteina	0,51	0,00	0,10	0,50
Isoleucina	3,94	7,30	5,90	9,20
Leucina	11,55	3,80	6,20	4,90
Triptofano	Nd	Nd	Nd	Nd
Phenilalanina	3,65	5,70	5,00	6,20
Lisina	3,35	5,60	5,60	4,50

\*Farias, 2002; \*\*Cavada & col., 2000; \*\*\*Suvachittanont & Peutpaiboon, 1992.

Nd: não determinado

## 5.7 - Determinação da Seqüência N-terminal de Aminoácidos

A lectina da fração das glutelinas ácidas de sementes de *Acacia farnesiana* foi submetida a sequenciamento de sua porção N-terminal, obtendo-se uma seqüência composta por: SFKNNNFNEASILQGDALISSTGVLQLTNVVDNGESPT. Esta seqüência quando submetida a alinhamentos com outras seqüências N-terminais disponíveis em bancos de dados, apresentou homologia com a lectina da fração das albuminas da mesma semente (alinhamento feito no laboratório pois os dados dessa proteína não estão disponíveis nos bancos de dados) e com a porção N-terminal das lectinas de *Acacia constricta*, *Phaseolus vulgaris* PHA-E e PHA-L, lectinas 1 e 5 de *Dolichos biflorus* e lectinas de *Robinia pseudoacacia*, conforme mostrado na Tabela 3. A surpresa nesses resultados não foi a homologia com as lectinas AFAL e *A.constricta*, pois esses resultados já eram esperados visto serem essas lectinas do mesmo gênero. Entretanto, nem a lectina da fração das glutelinas ácidas de sementes de *Acacia farnesiana* nem a lectina da fração albumínica e *A.constricta* apresentaram homologia significativa da porção N-terminal com a lectina PPL purificada de sementes de *Parkia platycephala* da mesma subfamília. Entretanto, foi a significativa homologia encontrada entre a lectina da fração das glutelinas ácidas de sementes de *Acacia farnesiana* com as lectinas de outra subfamília, no caso de *Phaseolus vulgaris* PHA-E e PHA-L, lectinas 1 e 5 de *Dolichos biflorus* e lectinas de *Robinia pseudoacacia*, o que pode indicar pela primeira vez um elo entre as subfamílias Mimosoideae e Papilionoideae olhando-se do ponto de vista das lectinas.



## 5.8 – Atividade biológica da lectina isolada da fração das glutelinas ácidas de sementes de *Acacia farnesiana*

### 5.8.1- Atividade antibacteriana contra *Streptococcus mutans* e fitopatógenos *Xanthomonas axopodis* pv *passiflorae* e *Clavibacter michiganensis* da lectina isolada da fração das glutelinas ácidas de sementes de *Acacia farnesiana*

Com o intuito de testar o efeito biológico da lectina de *Acacia farnesiana* fração glutelina ácida, colônias bacterianas de bastonetes, como xantomonas e a clavibacter, foram incubadas com diferentes concentrações da lectina (0 a 400µg/ml) como descrito anteriormente. O número de colônias de xantomonas foi inibido em 58% na presença da lectina (Figura 11a) com a concentração de 250 µg/ml, obtendo-se efeito a partir da concentração de 100µg/ml, atingindo 92% de inibição com a concentração de 400µg/ml (Figura 11b) com IC<sub>50</sub> de 220µg/ml.

A Figura 12a mostra que a lectina de *Acacia farnesiana*, além de reduzir o número de bactérias, de certa forma deforma a célula, talvez formando protuberâncias na membrana plasmática, ou até mesmo desestruturando as formas celulares, causando assim a morte bacteriana. A colônia de *Clavibacter* por sua vez, foi a mais potentemente reduzida na presença de lectina em 81% com a concentração de 250 µg/ml obtendo-se efeito a partir de 100µg/ml com 20% de inibição até a dose de 400µg/ml inibindo em cerca de 97% (Figuras 11 a e b).

Na Figura 12b não observamos modificações na estrutura das bactérias o que nos leva a supor que o efeito antibacteriano observado não tenha relação com modificações morfológicas e sim, possivelmente, através de sinalização intracelular.

Quanto aos cocos *S. mutans*, observa-se uma intensa inibição bacteriana (77%), provocada pela lectina iniciando-se na concentração de 50µg/ml em 10%, sendo a concentração de 350µg/ml a dose máxima, obtendo-se 100% de inibição (Figura 11 a e b). A figura 2c mostra rugosidade da célula após o tratamento com a lectina. Os resultados mostram que a lectina de AfGlu consegue, de alguma maneira, causar diminuição do número de bactérias gram-negativas (*Clavibacter*), gram-positivas (*Xanthomonas* e *S. mutans*) e anaeróbios (*S. mutans*). Tem sido reportado que algumas lectinas, tais como a lectina ligada a manana (MDL), consegue se ligar a *S. aureus* variante; a L-ficolina se liga tanto a *Streptococcus aureus*, quanto a *S. pneumoniae*; e a H-ficolina se liga a *Aerococcus viridans* (Krarup & col., 2005) Essas três proteínas pertencem ao caminho complemento das lectinas (lectin pathway of complement). A LLM tem sido bastante estudada clinicamente contra microorganismos como fungo, vírus e bactérias gram-negativas e gram-positivas (Neth & col., 2000; Jack & col., 2001). A L-ficolina se liga ao ácido lipoteicóico da parede das bactérias gram-negativas (Lynch & col., 2004). O efeito da lectina comprova de maneira evidente a sua propriedade de defesa nas plantas, uma vez que possui efeito antibacteriano, de certa forma inespecificamente.

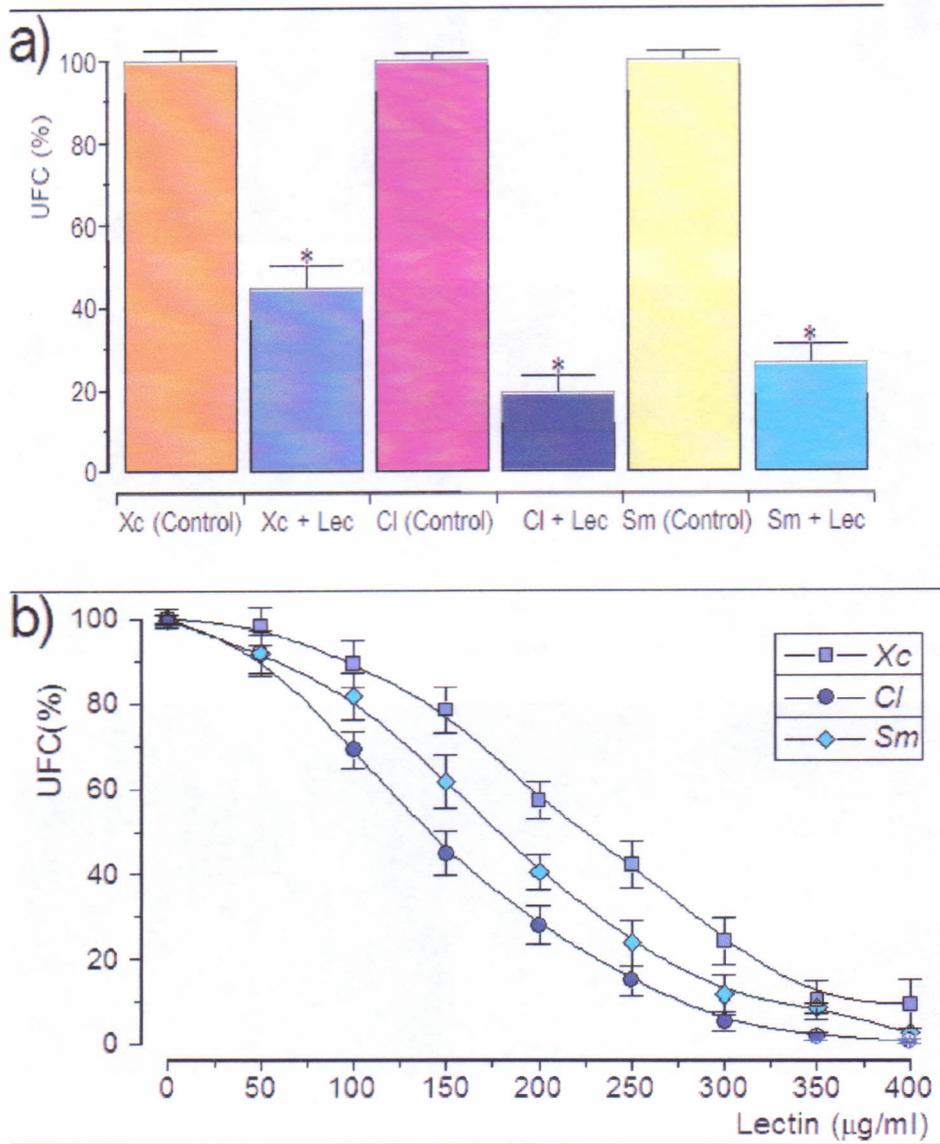


Figure 11. Atividade antibacteriana da lectina da fração das Glutelinas Ácidas da farinha de *Acacia farnesiana*.

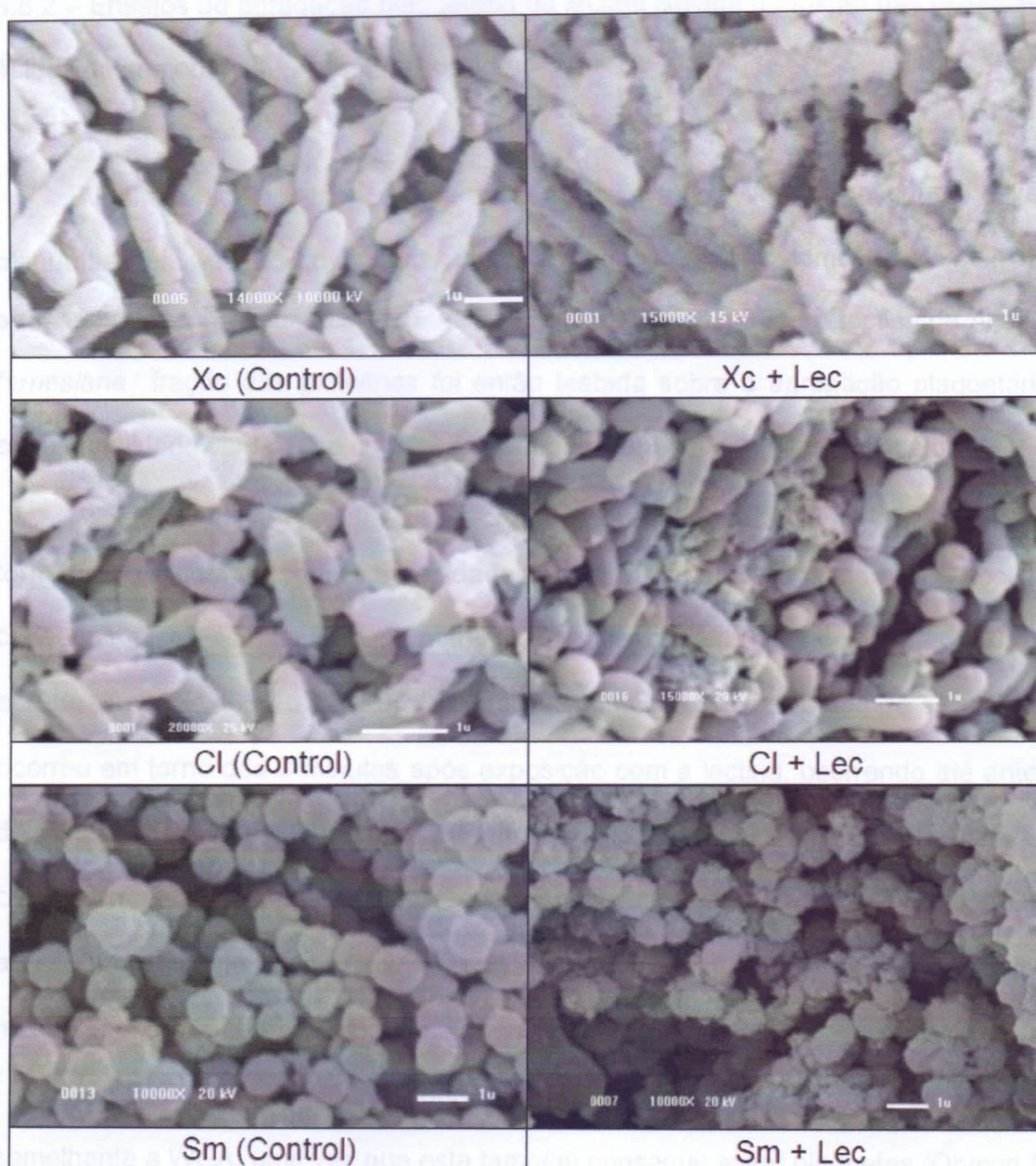


Figura 12 – Microscopia de varredura mostrando a atividade antibacteriana da lectina da fração das Glutelinas Ácidas da farinha de *Acacia farnesiana*. A figura apresenta o controle (Xc, CI e Sm) e a lectina da fração glutelína ácida de *Acacia farnesiana* sobre as bactérias *X. axonopodis* pv *passiflorae* (Xc + lec.), *C. michiganensis michiganensis* (CI + lec) e *S. Mutans* (Sm + lec).

### 5.8.2 – Ensaios de agregação plaquetária da lectina isolada da fração das glutelinas ácidas de sementes de *Acacia farnesiana*.

Algumas lectinas, tais como a de germes de trigo (WGA), conseguem ativar plaquetas pela ligação com outras lectinas plaquetárias tais como a molécula de adesão plaquetária endotelial -1 (MAPE -1; Ohmori & col., 2001). A lectina de *Acacia farnesiana* fração das glutelinas foi então testada sobre a agregação plaquetária com a finalidade verificar se esta lectina também conseguia ativar tais células.

A trombina conseguiu induzir a agregação de plaquetas em duas doses, em torno de 60% com a dose de 50 unidades, e em 90% com 100 unidades. A lectina conseguiu ativar as plaquetas de maneira dose dependente, nas doses de 5, 10, 20 e 30µg em 15%; 40%; 67% e 90% respectivamente. O pico de tempo de agregação ocorreu em torno dos 8 minutos após exposição com a lectina, ocorrendo até antes do pico da trombina (>10 minutos) (Figura 13 a e b e Figura 14). Em comparação com outra lectina encontrada na fração albumínica de *Acacia farnesiana*, a AfGlu apresenta o mesmo comportamento na dose sub-máxima (20µg), sendo um pouco menos intenso do que o efeito da maior concentração de trombina.

Esses resultados levam a sugerir, *a priori*, que a AfGlu pode agir de maneira semelhante a WGA, uma vez que esta também consegue ativar plaquetas (Ohmori & col., 2001). A WGA induz uma forte fosforilação da tirosina da MAPE-1, a ativação da fosfolipase C e conseqüente mobilização de cálcio intracelular. Algumas outras proteínas animais semelhantes a lectinas, tais como a mucetina, extraída do veneno de *Trimeresurus mucrosquamatus*, em ausência do fator de von Willebrand, ativam plaquetas pela ligação com a glicoproteína-1b (GP1b) da membrana plaquetária (Tai & col., 2004; Lu & col., 2004), lembrando-se que a iniciação do processo da

formação do trombo se dá pela ligação dessas glicoproteínas ao fator de von Willebrand e colágeno (Andrews & col., 2003). Sob condições de estresse de fluxo nos vasos sanguíneos, a interação entre von Willebrand e GPIb é crítico para adesão plaquetária à matriz extracelular (Rugger, 1997). Este processo ocorre através de uma interação de pouca afinidade, que sob condições de fluxo, resultam em rolagem das plaquetas e subsequente a interação das integrinas (lectinas) com seus ligantes nos vasos, causando adesão irreversível (Savage & col., 1996). A agretina, lectina extraída do veneno de *Calloselasma rhodostoma* ativa plaqueta por ligação aos receptores plaquetários alfa-2-beta-1 e glicoproteína-1b, ativação da fosfolipase C e consequente aumento de cálcio intracelular (Chung & col., 2001). A alboagregina, uma proteína dimérica de 50KDa semelhante as lectinas extraída do veneno de *Trimeresurus albolabris*, ativa as plaquetas por sinalização intracelular (fosfolipase C) e concomitante a sua ligação ao complexo GP Ib-IX-V (Andrews & col., 1996). Entretanto, outra lectina, a lebecetina, uma nova lectina tipo-C do veneno da *Macrovipera lebetina*, causou inativação da ativação plaquetária induzido por trombina, sendo revertido por anti-glicoproteína-1b (Sarray & col., 2003). Fica claro então que a AfGlu pode estar agindo sobre esse mecanismo de ativação da agregação plaquetária, que pelo menos para as lectinas, se limita a sua ligação à glicoproteína plaquetária e o fator von Willebrand, ocasionando o início da cascata de ativação.

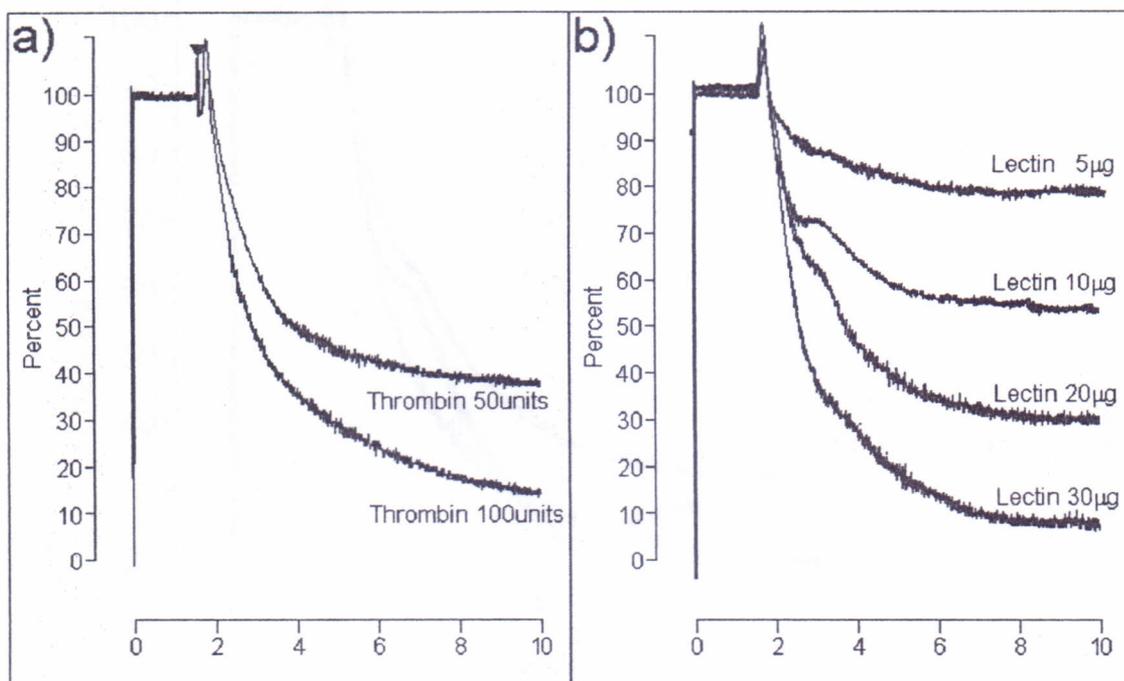


Figura 13 - Atividade de agregação plaquetária da lectina da fração das Glutelinas Ácidas da farinha de *Acacia farnesiana*. Apresenta medidas da agregação plaquetária da trombina e da lectina da fração glutelinas ácidas de *Acacia farnesiana* (AfGlu) em um tempo de 0-10 minutos feita em um agregômetro de plaquetas Chrono-log Lumiaggregometer (Chrono-Log Corp, Haverton, PA, USA). Podemos observar a agregação plaquetária da trombrina, usada como controle positivo da agregação plaquetária com concentrações de 50 e 100 unidades.

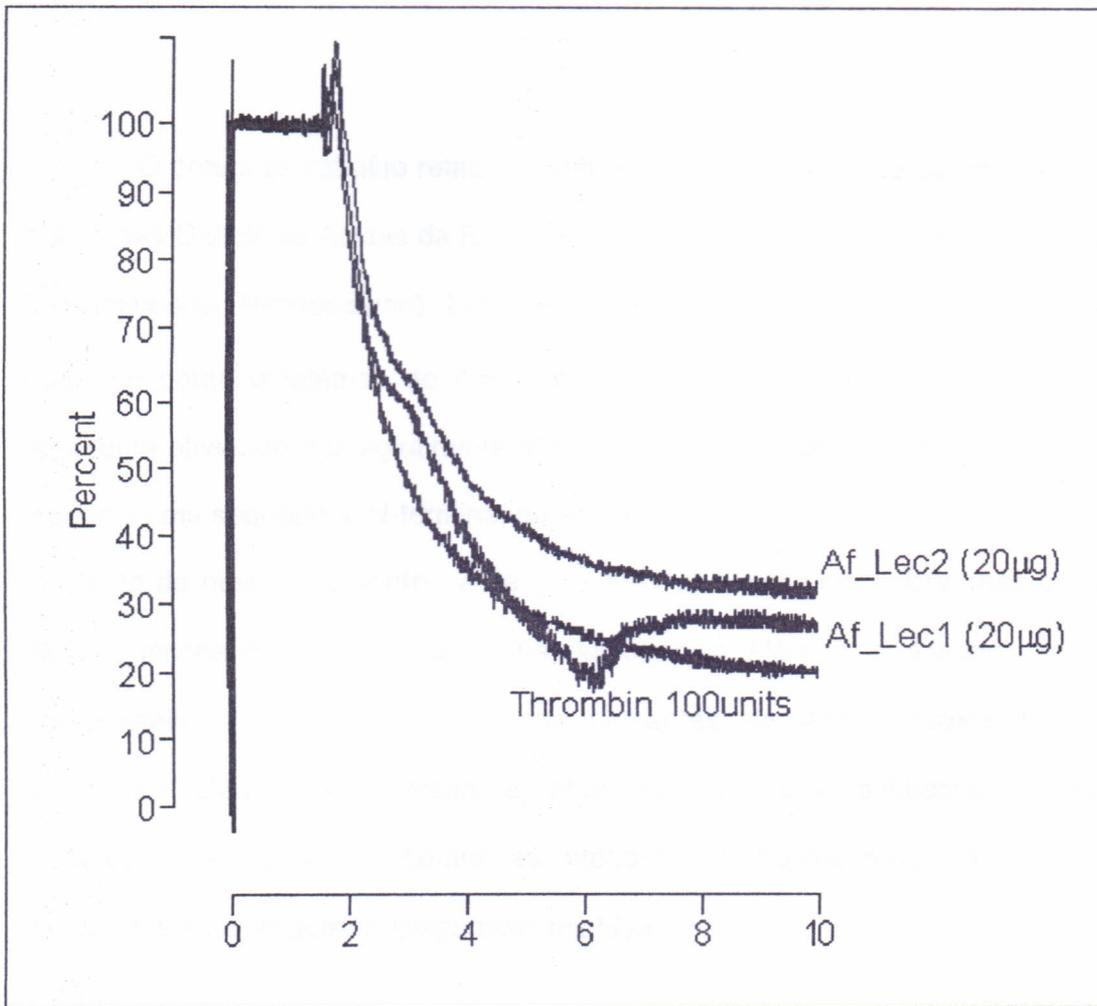


Figura 14. Efeito comparativo de agregação plaquetária da lectina da fração das Glutelinas Ácidas da farinha de *Acacia farnesiana* com a lectina da fração das Albuminas da mesma semente. Verificamos a agregação plaquetária causada pela trombina usada como controle em 100 unidades, lectina da fração das glutelinas ácidas de *A.farnesiana* (Af\_Lec1) e a lectina da fração albumina de *Acacia farnesiana* (Af\_Lec2) em uma concentração de 20 µg.

## 6. – CONCLUSÃO

O presente trabalho relata a purificação e caracterização de uma lectina da fração das Glutelinas Ácidas da farinha de sementes de *Acacia farnesiana* (L.) Willd (*Leguminosae*, *Mimosoideae*). Esta lectina apresenta uma massa molecular de 65 kDa, um ponto isoelétrico de 4,6, não sofre oligomerização tempo-dependente, apresenta atividade hemaglutinante tempo dependente contra hemácias de coelho e possui uma seqüência N-terminal de aminoácidos similar a das lectinas da fração albumina da mesma semente, a da sementes de *Acacia constricta*, mas diferente da PPL, lectina de sementes de *Parkia platycephala*. Além disto, a lectina da fração das Glutelinas Ácidas da farinha de sementes de *Acacia farnesiana* causa agregação plaquetária humana e apresenta atividade antibacteriana contra *Streptococcus mutans* e contra as fitobactérias *Xanthomonas axonoposi pv passiflorae* e *Clavibacter michiganensis michiganensis*.

## 7. - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM S.N. & MALAVIYA R. Mast cells in infection and immunity. *Infect Immun.* **65**(9):3501-8, 1997.

AHMED, K.H. & col., Constituents and molluscicidal activity of *Acacia saligna*, *Chrysanthemum parthenium*. In: *Bull.Nathi. Res. Cent.* **24**, nº.1, p. 13-25, 1999.

ALI, M.S. et al. Antimicrobial screening of Mimosaceus plants. In: *Pharmaceutical Biology*, **39**. nº. 1, p. 43-46, 2001.

ALLEN, P. G. & DAWIDOWICZ, E. A. Phagocytosis in *Acanthamoeba*: 1. A mannose receptor is responsible for the binding and phagocytosis of yeast. *J.Cell.Physiol.* **145**, 508-513, 1990.

ANDRADE, C. PEITZ, C. SILVA, C., MIGUEL, M.D., MIGUEL, O.G. KEBER, V.A. Gênero *Acacia* – Atividades Biológicas d Presença de Fenóis Derivados. *Visão Acadêmica* **4**, n. 1, p. 47 - 56, 2003

ANDREWS RK, KROLL MH, WARD CM, ROSE JW, SCARBOROUGH RM, SMITH AI, LOPEZ JA, BERNDT MC. Binding of a novel 50-kilodalton alboaggregin from *Trimeresurus albolabris* and related viper venom proteins to the platelet membrane glycoprotein Ib-IX-V complex. Effect on platelet aggregation and glycoprotein Ib-mediated platelet activation. *Biochemistry.* **35**(38):12629-12639, 1996.

ANDREWS R.K., GARDINER, E.E., SHEN, Y. & BERNDT, M.C. Structure-activity relationships of snake toxins targeting platelet receptors, glycoprotein Ib-IX-V and glycoprotein VI. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol. Agents.*, **1**(2): 143-149, 2003.

ANUMULA K.R & TAYLOR P.B. Rapid characterization of asparagine-linked oligosaccharides isolated from glycoproteins using a carbohydrate analyzer. **Eur J Biochem.** **195**(1):269-280,1991.

ANURAG, S., SHARMA, A.K & SAXENA. A. Allelopathic potential of *Acacia tortilis* in agroforestry systems of and regions. In: **Allelopathic Journal** **3**, n.1, p. 81-84, 1996.

ARATA, Y., HIRABAYASHI, J. & KASAI, K., The two lectin domains of the tandem-repeat 32-kDa galectin of the nematode *Caenorhabditis elegans* have different binding properties. Studies with recombinant protein. **J Biochem (Tokyo)**. **121**(6):1002-9,1997.

AYOUB, S. M. H.; YANKOV, L.K. Flavanol molluscicides from Sudan *Acacia*. In: **International Journal of Crude Drug Research**. **23**, n. 2, p. 87-90, 1985a

\_\_\_\_\_. On the molluscicidal activity of the plant phenolics. In: **Fitoterapia** **56**, n. 4, p. 225-226, 1985b

BABU, S.P.S. & col. Enhancement of membrane damage by saponins isolated from *Acacia auriculiformis*. In: **J. Visão Acadêmica**, **4**, n. 1, p. 47 – 56. 2003. **Pharmacol.**, **74**, n. 4, p. 451-454, 1997.

BARROSO, G.M. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Viçosa: Imprensa da Universidade Federal de Viçosa, v.2, p. 15-70, 1991.

BAR-SHAVIT Z. & GOLDMAN, R. Concanavalin A-mediated attachment and ingestion of yeast cells by macrophages. **Exp Cell Res** **99**(2):221-36. 1976

BAUMOUM, C., RUDIGER, H. & STROSBURG, A.D. A comparison of the two lectins from *Vicia cracca*. **FEBS Letters**, **102**:216-218, 1979.

BERNARD, D. Tratado de Microbiologia, 2ª ed. Salvat editores: 1151 pp.1993

BEZOUSKA, K., VLAHAS, G. & HORVATH, O. Rat natural killer cell antigen, NKR-P1, related to C-type animal lectins is a carbohydrate-binding protein. **J. Biol. Chem**, **269**, p.16945-16952, 1994.

BHASKAK, V; DASAPPA. *Ground flora in Eucalyptus plantations of different ages. Keraia Foresst Research Institute* p. 213-224, 1986.

BITTIGER, H. & SCHNEBLI, H.P. **Concanavalin A as a tool**. John Wiley & Sons, London, 639 p. 1976.

BRADFORD, M. M. A. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of dye binding. **Biochem. 72**: 248-254.

BURNET, F.M. Mucoproteins in relation to virus action. **Physiol. Ver.31**, p.131-150, 1951.

BUSHNELL, O.A; FUKUDA, M; TAKASHY, M. The antibacterial properties of some plants found in Hawaii. In: **Pacific Sc**, **4**, n. 3, p. 167-183, 1950.

CALVETE, J. J.; SAMPAIO, A. H. & GRANGEIRO, T. B. et al. Plant lectins: lessons from sequences and structures. In: **19th INTERLEC**, Fortaleza, 2001.

CASTELLON, R.E.R. Purificação e Caracterização parcial de uma nova proteína de sementes de *Parkia platycephala* (Benth) com potencial na defesa de plantas. Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação na Universidade Federal do Ceará. 121p, 2004.

CAVADA, B. S., MADEIRA, S. V. F., CALVETE, J. J., SOUSA, L. A. G., & col., Purification, chemical, and immunochemical properties of a new lectin from Mimosoideae (*Parkia discolor*). *Prep. Biochem. & Biotechnol.*, **30** (4): 271-280, 2000.

CAVADA, B. S., MOREIRA-SILVA, L. I. M., GRANGEIRO, T. B., & SANTOS, C. F., Purification and biological properties of a lectin from *Canavalia bonariensis* Lind. Seeds. In: *Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*. (Eds. Van Driessche, E., Fisher, J., Jeeckmans, S. & Bog-Hansen, T. C.) *Textop, Hellerup-Denmark*, **11**: 74-80, 1996.

CAVADA, B. S., SANTOS, S. F., GRANGEIRO, T. B., SILVA, L. I. M. M., CAMPOS, M. J. O., SOUSA, F. A. M., CALVETE, J. J. Isolation and Partial Characterization of a Lectin from *Parkia platycephala* Benth Seeds. *Physiol. Mol. Biol. Plants*. **3**: 109-115. 1997.

CAVADA, B.S., BARBOSA, T., ARRUDA, S., GRANGEIRO, T.B. and BARRALNETO, M. Revisiting Proteus: do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological use of the Diocleinae subtribe lectins. *Curr Prot Peptide Science*, 2001.

CAVADA, B.S. Lectinas de sementes de *Canavalia brasiliensis* Mart. Isolamento, Purificação e Comportamento ao longo da Germinação. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará. 109 p. 1980

CAVADA, B.S. & ROUGÉ, P. Partial characterization of the two isolectins isolated from *Lathyrus cicera* L. seeds. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, **28**(3): 421-430, 1985.

CHAKRABORTY, C; DAS, S.R. In vitro and in vivo effects of some natural products against experimental amoebiasis caused by *Entamoeba histolytica*. In: **Agricultural and Biological Res.**, v. 5, n. 1-2, p. 29-36, 1989.

CHANDEL, B.S; SHAN, N.M; TRIPATHI, R.M. In vitro antibacterial activity of *Acacia arabica* bark. In: **Indian Journal of Indigenous Medicines**, v. 9, n. 1-2, p. 77-79, 1993.

CHHABRA, S.C;UISO, F.C. A survey of medicine plants of eastern tanzânia for alkaloids, flavonoids, saponins and tannins. In: **Fitoterapia**, v. 4, p. 307-316, 1990.

CHOU, C.H. Allelopathic researches in the subtropical vegetation in Taiwan. In: **Comparative Physiology and ecology**, v. 5, n. 4, p. 222-234, 1980.

CHUNG, G.H., PENG, H.C. & HUANG, T.F. Aggretin a C-type lectin protein induces platelet aggregation via integrin  $\alpha(2)\beta(1)$  and GPIb in a phosphatidylinositol 3-kinase independent pathway. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **285(3)**: 689-695, 2001.

CLEMENT, B.A. Toxic amines and alkaloids from *Acacia belandieri*. In: **Phytochemistry**, v. 46, n. 2, p. 249-254, 1997.

CLEMENT, B; GOFF, C..M & FORBES, D. Toxic amines and alkaloids from *Acacia rigidula*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 5, p.1377-1380, 1998.

COLLINS B.E., YANG, L.J.S., MUKHOPADHYAY G., FILBIN, M.T., KISO, M., HASEGAWA, A., & SCHNAAR, R.L. **J. Biol. Chem.** **272**, p.1248-1255, 1997.

CORREA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e exógenas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, v. 1, p. 16-18 e 310, 1984.

CROCKER PR, HARTNELL A, MUNDAY J. & NATH D. The potential role of sialoadhesin as a macrophage recognition molecule in health and disease. **Glycoconj.J.**14(5):601-9,1997.

DAFALLASH, A. & MUSTAFA, Z. Investigation of anti-inflammatory activity of *Acacia nilotica* and *hibiscus sabdariffa*. In: **American J. of Chinese Medicine**, v. 24, n. 3-4, p. 263-269, 1996.

DRICKAMER, K. Increasing diversity of animal lectin structures. **Curr Opin Struct Biol.** 5(5):612-6,1995.

DRICKAMER,K. Two distinct classes of classes os carbohydrate-recognition domains in animal lectins. **J.Biol. Chem**, v. 239, p.9557-9560, 1988.

ELGAVISH, S. & SHAANA, B. Lectin-carbohydrate interactions: different folds, common recognition principles. **TIBS.**, v.22, p.462-467, 1997.

ELSHEIKH, S.H. & col. Toxicity of certain Sudanese plant extracts to cercariae and miracidia of *Schistosoma mansoni*. In: **International Jour. Of Crude Drug Res.**, v. 28, n. 4, p. 241-245, 1990.

EL-TAHIR, A; SATTI, G.M.H. & KHALID, S.A. Antiplasmodial activity of selected Sudanese medicinal plants with emphasis on *Acacia nilotica*. In: **Phytotherapy Res.**, v. 13, n. 6, p. 474-478, 1999.

FADL, EL M. A. Management of *prosopis juliflora* for use in agro forestry systems in the Sudan. In: **Tropical Forestry Reports**, n. 16, p. 107, 1997.

GABIUS, H.J. Animal Lectins. **EUR. J. Biochem.** 243, p.53-576, 1997.

GALLILY R, VRAY B, STAIN I. & SHARON N. Wheat germ agglutinin potentiates uptake of bacteria by murine peritoneal macrophages. **Immunology** 52(4):679-86. 1984

GALLEGO-DEL-SOL, F., NAGANO, C.S., CAVADA, B.S., SAMPAIO, A.H., SANZ, L. & CALVETE, J.J. Lectinas: proteínas traductoras de glicocódigos y herramientas bioquímicas. **Investigación y ciencia**, 2005 (in press).

GHOSH, N.K. & col. Cestocidal activity of *Acacia auriculiformis*. In: **J. of helminthology**, v. 70, n. 2, p. 171-172, 1996.

GHOSH, M. & col. Antifilarial effect of two terpenoids isolated from *Acacia auriculiformis*. In: **Indian J. of Experimental Biology**, v. 31, n. 7, p. 604-606, 1993.

GILES R. & HÉCTOR H. Identificación de lectinas en plantas medicinales y su actividad sobre los mecanismos de adhesión en los procesos infecciosos causados por *E. coli*, 1998.

GONZÁLES, L; SOUTO, X.C. & REIGOSA, M.J. Allelopathic effects of *Acacia melanoxylon* R. Br. *Phyllodes durina* their decomposition. In: **Forest Ecology**, v. 77, n. 1-3, p. 53-63, 1995.

GRAW, Mc. L. J. & col. Prostaglandin synthesis inhibitory activity in Zulu, Xhola and Sotho medicinal plants. In: **Phytoterapy Research**, v. 11, n.2, 1997.

GUREVICH, F.A. Action of phytocides on mollusks eggs. In: **Docklady. Acad. Nauk. SSSR**, v. 59, p. 813-815, 1948.

GUZMAN-PARTIDA, A.M., ROBLES-BURGUENO, M.R., ORTEGA-NIEBLAS, M. & VAZQUEZ-MORENO. Purification and characterization of complex carbohydrate

specific isolectins from wild legume seeds: *Acacia constricta* is (vinorama) highly homologous to *Phaseolus vulgaris* lectins. **Biochimie.** **86**(4-5):335-342, 2004.

HAGOS, M & SAMUELSSON, G. Quantitative determination of Quracol A, b and (+)-fisetinidol in bark and gum of *Acacia tortilis*. In: **Acta Pharm. Suec**, v. 25, n. 6, p. 321-324, 1988.

HAKOMORI, S., NUDELMAN E., LEVERY, S.B. & KANNAGI, R. Novel fucolipids accumulating in human adenocarcinoma. Glycolipids with di-or-trifucosylated type 2 chain. *J. Biol. Chem.*, 259(7):4672 – 4680, 1984.

HANASAKI K, POWELL LD, VARKI A. Binding of human plasma sialoglycoproteins by the B cell-specific lectin CD22. Selective recognition of immunoglobulin M and haptoglobin. **J Biol Chem.** **31**;270(13):7543-50. 1995

HARRISON, F.L. Soluble vertebrate lectins: ubiquitous but inscrutable proteins. **J.Cell Sci.**, **100**(1): 9-14, 1991.

HOFFMANN, J.J. & col., Potential activity of plants from the southwestern United States. In: **International Journal of Pharmacognosy**, v. 31, n. 2, p. 101-115, 1993.

HUGHES R.C. Mac-2: a versatile galactose-binding protein of mammalian tissues. *Glycobiology.***Feb**;**4**(1):5-12,1994.

HUSSEIN, G. & col. Inhibitory effects of Sudanese plant extracts on HIV-1 replication and HIV-1 protease. In: **Phytotherapy Res.**, v.13, n. 1, p. 31-36, 1999.

HYALIJ, M.J. Effect of mulluscicides and cercaricides on some freshwater snails and cercariae. In: **Goobios.**, v. 26, n. 4, p.211-213, 1999.

JACK, D.L., KLEIN, N.J. & TURNER, M.W. Mannose-binding lectin: targeting the microbial world for complement attack and opsonophagocytosis. **Immunol. Rev.**, **180**: 86, 2001.

JACOBSON R.L. & DOYLE R.J. Lectin-parasite interactions. **Parasitol Today** **12(2)**:55-61,1996.

JADHAV, B.B. & GAYNAR, D.G. Allelopathic effects of *Acacia auriculiformis* A. cunn. On germination of rice and cowpea. In: **Indian Journal of Plant Physiology**, v. 35, n. 1, p. 86-89, 1992.

JAYASEKHAR, P; MOHANAN, P.V. & RATHINAM, K. Hepatoprotective activity of ethyl acetate extract of *Acacia catechu*. In: **Indian J. of Pharmacol.**, v. 29, n. 6, p. 426-428, 1997.

JOHNSON, R.P., BOAG, L., ANDERSON, S., HOLTSLANDER, R., RAHN, K., CLARKE, R.C., RENWICK, S.A., ALVES, D., WILSON, J.B. & SPIKA, J. *Brucella abortus* serology in cattle infected with *E. coli* O157:H7. **Veterinary Record** **135**: 382, 1994.

JOLY, A.B. **Botânica: Introdução à Taxonomia Vegetal**. 12<sup>a</sup> ed. São Paulo: Nacional, 1998.

KAMBIZI, L. & AFOLAYAN, A.J. Na ethnobotanical study of plants for the treatment of sexually transmitted disease (njovera) in Guruve District, Zimbabwe. In: **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, p. 5-9, 2001.

KHAN, M.R. & col. Antimicrobial activity of Tanzanian chewing sticks against oral pathogenic microbes. In: **Pharmaceutical Biology**, v. 38, n. 3, p. 235-240, 2000.

KHAN, M.R. & col. Studies on African plants: 1-preliminary screening of medicinal plants for antibacterial activity. In: **Planta Medica**, Suppl., p. 91-7, 1980.

KITOU, M. Changes in the allelopathic potential in relation to incubation conditions of soil mixed with *Acacia pubescens* (Ventn) leaf powder. In: **Journal of Weed Science na Technology**, n. 16, p. 107, 1997.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. **Nature**, **227**: 680-685, 1970.

LORIS R, VAN OVERBERGE D, DAO-THI MH, POORTMANS F, MAENE N, WYNS L. Structural analysis of two crystal forms of lentil lectin at 1.8 Å resolution. **Protein.**,**20**(4):330-46.1994

LU, Q., NAVDAEV, A. CLEMETSON, J.M. & CLEMETSON, K.J. GPIb is involved platelet aggregation induced by mucetin, a snake C-type lectin protein from Chinese habu (*Trimeresurus mucrosquamatus*) venom. **Thromb Haemost.**, 91(6): 1168-1176, 2004.

LYNCH, N.J., ROSCHER, S., HARTUNG, T., MORATH, S., & col., L-Ficolin Specifically Binds to Lipoteichoic Acid a cell Wall Constituent of Gram-Positive Bacteria and Activates the Lectin Pathway of Complement. **The Journal of Immunology**, 172: 1198 – 1202, 2004.

MALAVIYA, R., ROSS, E., JAKSCHIK, B.A., ABRAHAM, S.N. Mast cell degranulation induced by type 1 fimbriated *Escherichia coli* in mice. **J Clin Invest.** **93**(4):1645-1653, 1994.

MITCHELL, B.S., BROOKS, S.A, LEATHEM, A.J.C. & col. Do HPA and PHA-L have the same binding pattern in metastasizing human breast and colon cancers? **Cancer Letters**, **123** (1): 113-119, 1998.

MOREIRA R. A., BARROS, A.C. H., STEWART, J. C. & PUSZTAI, A. Isolation and characterization of a lectin from the seeds of *Dioclea grandiflora* (Mart.) Planta 158(1). p.63 – 69, 1983.

MUSTAFA, N.K., TANIRA, M.O.M. & NSANZE, H. Antimicrobial activity of *Acacia nilótica* subsp. *Nilótica* fruit extracts. In: **Pharmacy and Pharmacology Communications**, v. 5, n° 9, p. 583-586, 1999.

NABI, A.B.D & col. Antimicrobial activity of *Acacia nilotica* (L) Willd ex Del var. *Nilotica* (Mimosaceae). In: **Journal of Ethnopharmacology**, v. 37, n°1, p. 77-79, 1992.

NAGANO, C S; MORENO, F B M B; BLOCH JR, C. & col. Characterization of a new lectin from the red marine alga *Hypnea musciformis*. In: The Twentieth International Lectin Meeting: **INTERLEC20**, 2002, Copenhagen. Communications and Abstracts of INTERLEC 20. Berlin: Walter de Gruyter, 2002. v. 1.

NAKAMURA, S., IKEGAMI, A., MIZUNO, M., YAGI, F. & NOMURA K. The expression profile of lectin differs from that of seed storage proteins in *Castanea crenata* trees. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, 68 (8): 1698-1705, 2004.

NASCIMENTO, K.S. Caracterização Bioquímica de Determinação Estrutural de uma Lectina presente na Alga Marinha Vermelha *Hypeneia cervicornis* J.Agardh. Dissertação apresentada ao curso de pós-Graduação na Universidade Federal do Ceará. 85p, 2005.

NASSAR, M. I. Apigonin-C-glycoside from de Leaves of *Acácia laeta* and their Anticancer Activity Evaluation. In: **Egypt J. Pharm. Sci.** v. 40, n° 1, p. 73-77, 1999.

NAZIF, N. M. ; SOLIMAN, A. M.; RADWAN, H. M. Bioassay guided isolation of molluscicides from certain medicinal plants. In: **Hamdard medicus**, v. 44, n° 2, p. 33-37, 2001.

NETH, O.D., JACK, D.L., DODDS, A.W., HOLZEL, H., KLEIN, N.J. & TURNER, M.W. Mannose-binding lectin bonds to a range of clinically relevant microorganisms and promotes complement deposition. *Infect. Immun.*, 68: 688, 2000.

NEWTON, S.E., MONTI, J.R., GREENHALGH, C.J., ASHMAN, K. & MEEUSEN E.N cDNA cloning of galectins from third stage larvae of the parasitic nematode *Teladorsagia circumcincta*. **Mol.Biochem.Parasitol.**86(2):143-53,1997.

NSOLOMO, V. R., MRECHA, M. S. & MAGHEMBE, J. A. Effect of *Acacia xanthopholea* leachates on seed germination of some agricultural and multipurpose tree crops. In: **Journal of Tropical Forestry Science**, v. 7, n°3, p. 398-404,1995.

OHMORI, T., YATOMI, Y. WU, T., OSADA, M., SATOH, K. & OZAKI, Y. **Biochemistry**, 40(43): 12992 – 13001, 2001.

OHNO, S. & col. A species selective allelopathic substance from germinating sunflower (*Heliantus annuus* L.) seeds. In: **Phytochemistry**, v. 56, p. 577-581, 2001.

OLIVEIRA, M.M. de & col. Antitumor activity of condensed flavonols. In: **An. Acad. Bras. Cien.**, v. 44, n° 1, p. 41-44,1972.

OSBORNE, T.B. **The vegetable proteins**. Longmans Green & Co., 2<sup>a</sup> ed. 1924.

PÉREZ-CORNELIO, M. Identificación de lectinas en frutas medicinales, su participación en la Hemaglutinación de la cepa E. coli enterohemorrágica 0157:H7. p. 11-15, 1999. (Tesis).

PETRI, W.A. JR., CHAPMAN, M.D., SNODGRASS, T., MANN, B.J. & BROMAN, J., and RAVDIN, J.I. Subunit structure of the galactose and N-acetyl-D-galactosamine-inhibitable adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. *J. Biol. Chem.* **264**, 3007-3012, 1989.

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

POLYA, G. M. & FOO, L. Y. Inhibition on eukaryote signal-regulated protein kinases by plant-derived catechin-related compounds. In: **Phytochemistry**, v. 35, n° 6., p. 1399-1405, 1994.

POPOCA, J. & col. Cytotoxic activity of selected oplants used an antitumorals in Mexican tradicional medicine. In: **Journal of Ethnopharmacology**, v. 59, n° 3, p. 173-177, 1998.

REIGOSA, M. J.; CASAL, J. R. & CARBALLEIRA, A. Allelopathic effect of *Acácia dealbata* Link during flowering. ***Stvalia Oecologica***. v. 3, n. 1/3, p. 135-150, 1984.

RINI, J.M. Lectin structure. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*,**24**: p.551-577, 1995.

ROQUE-BARREIRA, M.C. Lectinas em Imunologia: de ferramentas a protagonistas. Tese apresentada 'a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do título de livre-docente na Universidade de São Paulo, 313p. Ribeirao Preto, 1998.

ROUGÉ, P. & CAVADA, S.B. Isolation and partial characterization of the two isolectins from *Lathyrus ochrus* (L)Dc seeds. *Plant Sciences Letters*, 37: 21-27, 1984.

ROUGÉ, P., CAMBILLAU, C. & BOURNE, Y. the three-dimensional structure of legume lectins.p.143-160, 1986. In: KILPATRICK, D.C., VAN DRIESSCHE, E. and BOG-HANSEN, T.C. eds **Lectins Reviews**. vol. 1, 217p. Sigma Chemical Company, 1991.

RUDIGER, H. Purification and properties of blood-group-specific lectins from *Vicia cracca*.**Eur J. Biochem.** 72(2):317 – 322, 1977.

RUDIGER, H. Structure and function of plant lectin. In: **Glyco-sciences: status and perspective**. Edited by Gabius, H.J. & Gabius, S. Published by Chapman & Hall GmbH, Weinheim, Germany. p.415-438, 1997.

RUGGERI, Z.M. Mechanisms initiating platelet thrombus formation. **Tromb. Haemost.** 78: 611 – 616, 1997.

SAHAI, R.; AGARWAL, S. K.; RASTOGI, R. P. Auriculoside, a new flavan glycoside from *Acacia auriculiformis*. In: **Phytochemistry**, 19, p. 1560-1562, 1980.

SANTI-GADELHA, T. Isolamento, Purificação, Caracterização e atividade Biológica de lectina da fração das albuminas de sementes de *Acacia farnesiana* (L) Willd (Leguminosae, Mimosoidae). Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação na Universidade Federal do Ceará. 85p, 2005.

SANZ-APARICIO, J., HERMOSO, J., GRANGEIRO, T.B., CALVETE, J.J & CAVADA, B.S. The crystal structure of *Canavalia brasiliensis* lectin suggests a correlation between its quaternary conformation and its distinct biological properties for an Concanavalin A. **FEBS Lett**, v.405, p.114-118, 1997.

SARKAR, P.; SINHA, B. S. P.; SUKUL, N. C. Antofilarial effect of a combination of botanicals of *Acácia auriculiformis* and *Centella asiática* on *Canine dirofilariases*. In: **Pharmaceutical Biology**, v. 36, n° 2, p. 107-110, 1998.

SARRAY, S., SRAIRI, N., HATMI, M., LUIS, J., LOUZIR, H., REGAYA, I. SLEMA, H. & Col., Lebecetin a potent antipatelet C-type lectin from *Macrovipera lebetina* venos. **Biochim. Biophys Acta**. **1651**(1-2): 30 – 40, 2003.

SAVAGE, B., SALDIVAR, E. & RUGGERI, Z.M. Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willbrand factor. **Cell** **84**:289-297, 1996.

SEIGLER, D.S. Phytochemistry of *Acacia* – sensu lato. **Biochemical Systematics and Ecology** **31**: 845-873, 2003.

SEKINE, & col. Structure and synthesis of a new monoterpenoidal carboxiamide from the seeds of the Thaimedicinal plant *Acacia concinna*. In: **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 45, n° 1, p. 148-151, 1997.

SGROI, D., NOCKS, A. & STAMENKOVIC. A single N-linked glycosylation site is implicated in the regulation of ligand recognition by the I-type lectins CD22 and CD33. **J.Biol.Chem.****271**(31):18803-18809, 1996.

SHAM, J.S.K., CHIU, K.W. & PANG, P. K. T. Hipotensive action of *Acacia catechu*. **Planta Médica**. **50**, n° 2, p 177-180, 1984.

SHARON, N. & LIS, H. Lectin. 2ª ed. Kluwer Academic Publishers. 454p., 2003.

SHARON, N. & LIS, H. Carbohydrates in cell recognition, **Scientific American**, **268**: 74, 1993.

SHARON, N. & LIS, H. Lectins-proteins with a sweet toothÇ functions in cell recognition. **Essays in Biochemistry** 30: 59-75, 1995.

SHARON,N. & LIS, H. **Lectins**. 126p., Chapman and Hall. London, 1989.

SOTOHY, S. A., ISMAIL, A.A & MUELLER, W. Further studies on the antimicrobial properties of some plant materials in relation to their tannin content. In: **Proceedings of the Third Scientific Congress Egyptian Society for Cattle Diseases**, v. 1, n° 1-3, 1995.

SPRINGER, T.A. Cell adhesion. Sticky sugars for selectins. **Nature**, v.349,p.197-199, 1991.

SUVACHITTANONT, W. & PEUTPAIBOON, A. (1992). Lectin from *Parkia speciosa* seeds. **Phytochem.**, 31: 4065-4070.

SWAMINA, T.C., RAÍ, R.S.V. & SURESH, K. K. Alleopathic proclivities of Acácia nilótica (L) WILLD ex Del. In: **Journal of the Tropal Forest Science**, v. 2, n° 1, p. 56-60, 1989.

TAI, H., WEI, Q., JIN, Y., SU, M., SONG, J.X, ZHOU, X.D, & col., TMVA a snake C-type lectin-like protein from trimeresurus mucrosquamatus venom actives platelet via GPIb. **Toxicon**. 44(6):649 – 656, 2004.

TAYLOR, M.E., BRICKELL, P.M. & CRAIG, R.K. Structure and evolutionary origin of gene encoding e heman manose-binding protein. **Biochem. J.**, v.262, p.763-771, 1989.

TZEN, C. S. & col. Antioxidant activity of extracts from *Acacia confusa* bark and heartwood. In: **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n° 7, p. 3420-3424, 2001.

VAN DAMME, E.J.M., BRIKÉ, F., WINTER, H.C., VAN LEUVEN, F., GOLDSTEIN, I.J. & PEUMANS, W.J. Molecular cloning of two different manose-binding lectin from tulip bulbs. **Eur. J. Biochem.** v.236, p.419-427, 1996.

VAN DAMME, E.J.M., PEUMANS, W.J., BARRE, A. & ROUGÉ, P. Plant Lectin: A composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **Crit. Rev. Plant Sciences**, 17(6), p.575-692, 1998.

VAN PARIJIS, J., BROEKAERT, W.E. & GOLDSTEIN, J.I. Hevein na antifungal protein for na rubber-tree (*Hevein brasiliensis*) látex. **Plant**.183, p.258-262, 1991.

VASTA, G.R., AHMED, H., FINK, N.E., ELOLA, M.T., MARSH, A.G., SNOWDEN, A. & ODOM EW. Animal lectins as self/non-self recognition molecules. Biochemical and genetic approaches to understanding their biological roles and evolution. **Ann N Y Acad Sci**.15;712:55-73.1994.

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

WANG, H.J. & GAO, T.B. A new lectin with highly potent antihepatoma and antisarcoma activities from the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*. **Biochem Biophys**. 275, p.810-816, 2000b.

WARE, F.E., VASSILAKOS, A. & PETERSON, P.A. The molecular chaperone calnexin binds Glc1Man9GlcNac2 oligosaccharide as an initial step in recognizing unfolded glycoproteins. **J.Biol.Chem.**,**270**,p.4697-4704, 1995.

WASSEL, G. M. et al. Phytochemical examination and biological studies of Acacia nilotica L. Willd and Acácia farnesiana L. Willd Growing in Egypt. In: **Egyptian Journal of Pharmaceutica Sciences**, v. 33, n/ 1-2, p. 327-340,1992.

WEIS W.I, DRICKAMER K. & HENDRICKSON W.A..Structure of a C-type mannose-binding protein complexed with an oligosaccharide. **Nature 360**: 127-134: 1992.

WEIS, W.I. & DRICKAMER, K. Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. **Annu. Rev. Biochem.** v.65, p.441-473, 1996.

YAMAMOTO, K. Carbohydrate recognition system of legume lectins *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 37(11 suppl):1820 – 1829, 1992.