

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

**ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E
CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE UMA LECTINA DE
SEMENTES DE *ANDIRA SURINAMENSIS* (BONDT.)
SPLITZ EX PULLE**

Fernanda Nunes Guimarães Vieira

Fortaleza

2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

**ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E
CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE UMA LECTINA DE
SEMENTES DE *ANDIRA SURINAMENSIS* (BONDT.)
SPLITZ EX PULLE**

Fernanda Nunes Guimarães Vieira

Tese apresentada à coordenação do
Curso de Pós-Graduação em
Bioquímica, como requisito parcial
para obtenção do grau de Doutor em
Bioquímica.

Fortaleza

2003

Vieira, Fernanda Nunes Guimarães

Isolamento, Purificação e Caracterização Parcial de uma lectina de sementes de *Andira surinamensis* (Bondt.) SPLITZ ex PULLE – Fortaleza, 2003.

68 f.: il.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Ceará. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.

1. Lectinas vegetais. 2. *Andira surinamensis*. 3. *Andira retusa*. 4. Isolamento. 5. Caracterização.

I. Título

CDD ...

ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE UMA LECTINA DE SEMENTES DE

Andira surinamensis (Bondt.) Splitz ex Pulle

Fernanda Nunes Guimarães Vicira

Aprovada em 11/12/2003

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada
UFC - Orientador

Prof. Dr. Alexandre Holanda Sampaio
UFC - Conselheiro

Profa. Dra. Ana Maria Assreuy
UECE/CE - Conselheira

Prof. Dr. Marcos Toyama
UNESP/S. Vicente - Conselheiro

Profa. Dra. Cláudia Ferreira Santos
UECE - Conselheira

Ao meu marido, amigo e companheiro RONALDO,
A minha querida mãezinha que sempre me amou, MARIA ALICE,
e a toda minha família que sempre acreditou em mim.

Grandes acontecimentos não têm pequenos presságios. Quando um grande mal ocorre, um grande bem o sucederá. Como a pior calúnia já predomina em todo o país, a Lei Suprema se propagará sem falta.

O que qualquer um dos senhores tem a reclamar?

Dai-aku Dai-zen Gosho

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada por essa energia que é marca registrada da sua pessoa, que o faz ser assim muito especial pra mim. Tenho orgulho de ter feito parte dessa equipe, do **BioMol-Lab**.

A todos os integrantes do Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, pelo incentivo, em especial aos professores e amigos Dr. Alexandre Holanda Sampaio, Dr. Márcio Viana Ramos, Prof. José Aurí Pinheiro e ao Prof. Edson Paula Nunes que contribuíram de forma valiosa para a conclusão deste trabalho.

Agradeço de forma muito especial aos professores Doutores Marcos Toyama, Cláudia Ferreira Santos e Ana Maria Assreuy pela dedicação e paciência com que examinarão esta Tese.

Ao Dr. Juan Calvete pelas sugestões dadas para a realização desta Tese.

Aos amigos e companheiros de trabalho Silvana Braga, Iza Marineves, Kátia Bonfim, Rolando Rivas, Edson Holanda, Tatiani Santi, Carlos Alberto, Pepeu, Emmanuel, Nívea e Kiria os meus sinceros agradecimentos pelo apoio voluntário de todos.

Aos bolsistas de Iniciação Científica Ticiania, Daniel, Karol, Georg, Gustavo, Taiana, Cecília, Helio pela amizade e carinho.

Aos demais professores, bolsistas e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular pela colaboração.

Especialmente a todos os meus amigos pessoais, que estiveram sempre presentes nas horas mais complicadas dessa etapa de vida que considero concluída.

Gostaria de agradecer de forma muito especial a uma pessoa que esteve, de forma incansável, ao meu lado nos momentos realmente mais complicados da minha vida. A minha amiga BEATRIZ TUPINAMBÁ FREITAS, meu muito obrigado.

A toda minha família, tias, primos, primas, afilhada e a uma pessoa que tem sempre uma solução para todos os meus problemas e que será sempre o meu modelo de dignidade e virtude, minha mãe Maria Alice.

É um muito obrigado especial a uma pessoa cujo incentivo e as palavras de amor e esperança me fizeram acreditar no amor e na vida. A quem eu dedico todos os méritos deste trabalho, o meu amado marido e companheiro Ronaldo.

Este trabalho foi realizado graças a auxílios das seguintes instituições:

Fundação Cearense de Amparo à Pesquisa (FUNCAP) e do Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) graças a convênios com o Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e por auxílios de pesquisa ao **BioMol-Lab** (Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, do Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PADCT), do Banco do Nordeste (BNB).

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo convênio com o Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e por auxílios de pesquisa ao **BioMol-Lab** (Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Relações filogenéticas entre as tribos da sub-família Papilionoideae. As tribos contendo lectinas que apresentam processamento pós-tradução e fragmentos endógenos estão sublinhadas (CALVETE et al., 1998).2
- Figura 2 – Hábito de *Andira surinamensis*.4
- Figura 3 - Representação esquemática de Mero, Holo, Quimero e Superlectinas, de acordo com VAN DAMME et al., 1998.5
- Figura 4 - Rota para o processamento da lectina (VML) de sementes de *Vatairea macrocarpa*. Esquema proposto por CALVETE e colaboradores (1998).....13
- Figura 5 - Esquema de fracionamento do extrato protéico das sementes de *Andira surinamensis*. Todas as centrifugações feitas anteriormente foram a 4 °C, durante 20 minutos e a 9000 g23
- Figura 6 - Esquema de isolamento e purificação da lectina de sementes de *Andira surinamensis*.27
- Figura 7 - Cromatografia de afinidade em coluna Sepharose-manose do extrato total de farinha de sementes de *A.surinamensis*.39
- Figura 8 – Cromatografia de troca iônica em coluna DEAE-Sephacel equilibrada com solução de tampão PBS 0,002M em pH 7 e eluída com um gradiente 0-2M de NaCl do pico retido na cromatografia de afinidade em coluna Sepharose-manose do extrato total de farinha de sementes de *A.surinamensis*.40
- Figura 9 - Eletroforese da lectina de sementes de *Andira surinamensis*. No poço A estão os marcadores moleculares albumina sérica bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), Gliceraldeído-3-P-Desidrogenase (36kDa), anidrase carbônica de eritrócito bovino (29 kDa), Tripsinogênio de Pâncreas bovino (24kDa), Inibidor de Tripsina (20kDa) e Lactoalbumina de leite bovino (14,2 kDa). No poço B foi aplicado o extrato total das sementes de *A.surinamensis* e no poço C o PII da cromatografia de DEAE-Sephacel.41

| | |
|---|----|
| Figura 10 - Espectro de absorção da solução a 1 mg/mL da lectina de <i>A.surinamensis</i> dissolvida em NaCl 0,15 M..... | 42 |
| Figura 11 - Espectro de massa do pico II da cromatografia DEAE-Sephacel..... | 43 |
| Figura 12 - Efeito antibacteriano induzido por lectina de sementes de <i>A.surinamensis</i> em <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>Passiflorae</i> | 47 |
| Figura 13 - A. Controle de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>Passiflorae</i> (MEV); B. Controle de <i>X.axonopodis</i> pv. <i>Passiflorae</i> (MET); C. <i>X.axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i> incubada 1h à 37°C com a lectina <i>Andira surinamensis</i> (ARL)(MEV); D. <i>X.axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i> após 1h de incubação à 37°C com <i>A.surinamensis</i> | 48 |
| Figura 14 - A,B. <i>X.axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i> incubada por 1h à 37°C com a lectina <i>Andira surinamensis</i> marcada com fluoresceína nos aumentos de 20x e 100x respectivamente | 49 |
| Figura 15 - Sequências N-terminal minoritária e majoritária da lectina de <i>Andira surinamensis</i> | 50 |
| Figura 16 - Alinhamento das seqüências N-terminais majoritária e minoritária na lectina de sementes de <i>Andira surinamensis</i> com a seqüência de aminoácidos da lectina de <i>Vatairea macrocarpa</i> | 51 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Composição mínima das sementes de <i>Andira surinamensis</i> | 32 |
| Tabela 2 - Extração de proteínas em diferentes soluções das farinhas de sementes de <i>A. surinamensis</i> | 33 |
| Tabela 3 - Atividade Hemaglutinante Específica (U.H.mg.P ⁻¹) nos extratos da farinha de sementes de <i>Andira surinamensis</i> | 34 |
| Tabela 4 - Atividade Hemaglutinante Específica (U.H.mg.P ⁻¹) nas diferentes frações protéicas de sementes de <i>A. surinamensis</i> | 36 |
| Tabela 5 - Inibição da atividade hemaglutinante da lectina de sementes de <i>A. surinamensis</i> por açúcares..... | 37 |
| Tabela 6 - Massa molecular da cadeia α , fragmentos β e γ das lectinas de semente de <i>A. surinamensis</i> determinadas por espectrometria de massa..... | 44 |
| Tabela 7 - Comparação entre a composição de aminoácidos de lectinas de sementes de <i>A. surinamensis</i> e lectinas de sementes de <i>Vaitarea macrocarpa</i> | 47 |

LISTA DE SIGLAS E DEFINIÇÕES

RIP – proteínas inativadoras de ribossomos

UH – Unidade de hemaglutinação (inverso da maior diluição da amostra que ainda apresenta aglutinação visível)

Tris – Tris-hidroximetil-aminometano

HPLC – High pressure liquid chromatography

SDS – dodecil sulfato de sódio

ESI – Electro Spray Ionization

MALDI – Matrix Assisted Laser Desorption Ionization

Gal – galactose

Man – manose

Glc – glicose

GlcNAc – N-acetil-glicosamina

NANA – ácido N-acetil-neuramínico

GalNAc – N-acetil-galactosamina

ConA – lectina de sementes de *Canavalia ensiformis*

ConBr – lectina de sementes de *Canavalia brasiliensis*

PSL – lectina de sementes de *Pisum sativum*

MET – Microscopia eletrônica de transmissão

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

PNA – lectina de sementes de *Arachis hypogea*

EcoiL – lectina de sementes de *Erythrina corallodendron*

SBA – lectina de sementes de *Glycyne max*

PHA-L – lectina de sementes de *Phaseolus vulgaris* específica para leucócitos

DGL – lectina de sementes de *Dioclea grandiflora*

CON – ConA complexada com cádmio substituindo o manganês

CJP – ConA complexada com 4-metillumberilferil- α -2-D-glicopiranosídeo

BXH – ConA complexada com metil α (1 \rightarrow 2) manobiosídeo

m – minutos

Da - Dalton

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| RESUMO | I |
| ABSTRACT | II |
| 1- INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 Classificação Botânica | 1 |
| 1.2 Lectinas | 3 |
| 1.2.1 Ocorrência das lectinas..... | 6 |
| 1.2.2 Estrutura Molecular | 9 |
| 1.2.3 Processamento pós-traducional | 11 |
| 1.2.4 Subdivisão das Lectinas..... | 12 |
| 1.2.5 Localização das Lectinas em Plantas Superiores | 14 |
| 1.2.6 Detecção, Isolamento e Purificação de Lectinas Vegetais | 15 |
| 1.2.7 Propriedades Biológicas | 16 |
| 2- OBJETIVOS | 18 |
| 3- MATERIAIS E MÉTODOS | 19 |
| 3.1 Materiais | 19 |
| 3.1.1 Material Vegetal..... | 19 |
| 3.1.2 Eritrócitos | 19 |

| | | |
|-------|--|-----------|
| 3.1.3 | Reagentes..... | 19 |
| 4- | MÉTODOS..... | 20 |
| 4.1 | Preparação da farinha de sementes de <i>A.surinamensis</i> | 20 |
| 4.2 | Análise Elementar..... | 20 |
| 4.2.1 | Determinação de Umidade..... | 20 |
| 4.2.2 | Determinação de Nitrogênio Total..... | 20 |
| | Determinação de Cinzas..... | 21 |
| 4.2.4 | Determinação de Lipídeos Totais..... | 21 |
| 4.3 | Extração de Proteínas da Farinha de sementes de <i>A.surinamensis</i> com diferentes soluções..... | 21 |
| 4.4 | Fracionamento do Extrato Protéico das sementes de <i>A.surinamensis</i> | 22 |
| 4.5 | Dosagem de proteínas dos diferentes extratos e das frações protéicas..... | 24 |
| 4.6 | Determinação de Atividade Hemaglutinante..... | 24 |
| 4.7 | Ensaio de Inibição da Atividade Hemaglutinante..... | 25 |
| 4.8 | Cromatografia de Afinidade em Coluna de Sepharose-Manose..... | 25 |
| 4.9 | Cromatografia de Troca iônica em Coluna de DEAE-Sephacel..... | 25 |
| 4.10 | Espectro de Absorção da Lectina de <i>A.surinamensis</i> | 26 |
| 4.11 | Análise eletroforética das Lectinas..... | 26 |
| 4.12 | Espectrometria de massa das lectinas..... | 28 |
| 4.13 | Análise de Aminoácidos..... | 28 |
| 4.14 | Determinação da seqüência N-terminal e busca de seqüências homólogas..... | 28 |
| 4.15 | Marcação da lectina de sementes de <i>A.surinamensis</i> com fluoresceína..... | 29 |
| 4.16 | Atividade Antimicrobiana..... | 29 |
| 4.17 | Estudo Morfológico por microscopia eletrônica..... | 29 |

| | |
|--|----|
| 5- RESULTADOS | 31 |
| 5.1 Análise Elementar..... | 31 |
| 5.2 Extração de Proteínas da Farinha de sementes de <i>A.surinamensis</i> com diferentes soluções..... | 31 |
| 5.3 Determinação da Atividade Hemaglutinante Específica nos diversos Extratos Protéicos Totais..... | 31 |
| 5.4 Fracionamento Protéico..... | 31 |
| 5.5 Inibição da atividade Hemaglutinante de lectina de <i>A.surinamensis</i> | 35 |
| 5.6 Cromatografia de Afinidade em Coluna Sepharose-Manose..... | 35 |
| 5.7 Cromatografia de Troca iônica em Coluna de DEAE-Sephacel..... | 35 |
| 5.8 Eletroforese..... | 38 |
| 5.9 Espectro de absorção da lectina de <i>A.surinamensis</i> | 38 |
| 5.10 Espectrometria de massa das lectinas..... | 38 |
| 5.11 Análise de aminoácidos da lectina de sementes de <i>A.surinamensis</i> | 38 |
| 5.12 Inibição bacteriana através da lectina de sementes de <i>Andira surinamensis</i> | 46 |
| 6. DISCUSSÃO | 52 |
| 7. CONCLUSÕES | 55 |
| 8. REFERÊNCIAS | 56 |

RESUMO

Dentro do Reino vegetal, indiscutivelmente a sub-família das papilionoídeas, família das Leguminosae tem sido o grupo mais estudado quanto à purificação e caracterização de lectinas. Apesar disto, novas lectinas com propriedades diferentes e interessantes têm sido descobertas neste grupo de plantas. O presente trabalho relata a purificação e a caracterização parcial de uma lectina manose específica de sementes de *Andira surinamensis* (família, Leguminosae; sub-família, Papilionoideae; tribo, Dalbergieae), lectina esta denominada de ASL. Por PAGE-SDS, o perfil eletroforético da ASL mostrou-se composto por diferentes bandas protéicas como ocorre com a lectina galactose-específica de sementes de *Vatairea macrocarpa* (VML) e com a lectina N-acetil-glicosamina específica de sementes de *Lonchocarpus sericeus*, ambas da mesma tribo Dalbergieae. Quanto à composição em aminoácidos, a ASL se mostrou semelhante a VML, rica em Asparagina/Ácido Aspártico, Alanina, Serina e Treonina. No entanto, a ASL apresentou um coeficiente de extinção [$E_{(1\text{ cm}, 1\%)}$] = 20,04] diferente daquele apresentado pela VML [$E_{(1\text{ cm}, 1\%)}$] = 5,60], indicando que a posição dos aminoácidos aromáticos (apesar de uma composição semelhantes em ambas as lectinas) deve ser bastante diferenciada entre as mesmas. A análise da porção N-terminal da ARL apresentou duas seqüências, uma majoritária e outra minoritária e ambas com excelente grau de similaridade com a lectina VML. Estes resultados, juntamente com aqueles obtidos por PAGE-SDS, corroboram com a idéia de que a ASL, a exemplo do que já foi demonstrado para VML, apresenta-se com uma mistura de isolectinas compostas de cadeias intactas e fragmentadas. A presença de lectinas com fragmentos endógenos e ativos que surgem após modificação pós-tradução era encontrado apenas em lectinas da sub-tribo Diocleinae. Entretanto, interessantemente a ASL assim como a VML, mesmo pertencendo a tribo Dalbergeae que é menos evoluída e filogeneticamente distante da Diocleinae, também apresentam o mesmo padrão. Do ponto de vista de atividade biológica, a lectina ASL se mostrou bactericida para a bactéria gram negativa *Xanthomonas axonopodis* pv. *Passiflorae*, uma bactéria patogênica de espécies vegetais do gênero *Passiflora* (Maracujá).

ABSTRACT

In the plant kingdom, Papilionoideae, a Leguminosae sub-family is without a question the most studied group of lectins as purification and characterization. Despite of that, news lectins with different and interesting properties have been discovered in this group of plants. This work shows purification and partial characterization of a mannose-binding lectin from *Andira surinamensis* seeds (Leguminosae, Papilionoideae, Dalbergieae) it was denominated ASL. Eletrophoretic profile by PAGE-SDS shows different protein bands as in galactose-binding lectin from *Vaitarea macrocarpa* (VML) seeds and N-acetyl-glucosamine-binding lectin from *Lonchocarpus sericeus* seeds, both from Dalbergieae tribe. ASL has amino acid composition like VML, rich in Asparagine/Aspartic acid, Alanine, Serine and Threonine. By the way, ASL has a extinction coefficient [$E_{(1\text{ cm}, 1\%)}$ = 20,04] different from VML [$E_{(1\text{ cm}, 1\%)}$ = 5,60], showing that the position of aromatic amino acids (despite of a similar composition in both lectins) must be hardily different between them. N-terminal analysis give two sequences, a major one and a minor one, both with great similarity with VML sequence. Those results, as much those obtained by PAGE-SDS, indicate that ASL, as showed before by VML, has a isolectin mixture with intact and fragmented chains. The presence of lectins with endogenous and actives fragments that arises after pos-traditional modification was found only in lectins from Diocleinae tribe. Most over, ASL as much as VML even belonging to Dalbergieae tribe what is less evoluted and filogeneticly far from Diocleinae, also shows the same pattern. In biological point of view, ASL shows bactericide activity to gram-negative bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv. *Passiflorae*, a pathogenic bacteria of Passiflora plants (flower-passion).

1- INTRODUÇÃO

1.1 *Classificação Botânica*

As leguminosas são dicotiledôneas com caracteres básicos inconfundíveis, mas que apresentam muitas exceções, devido ao grande número de gêneros e espécies, o que levou à sua divisão em três subfamílias: mimosóideas, cesalpinoídeas e faboídeas.

As mimosóideas possuem flores em denso grupamento esférico (glomérulo) ou alongado (espiga), muito pequenas, de simetria radial, prefloração valvar, em que cada pétala cobre a vizinha e é, ao mesmo tempo, recoberta por aquela, além de inúmeros estames livres. Encerram quarenta gêneros, com cerca de 2 mil espécies.

As cesalpinoídeas possuem flores em cacho, bem visíveis, de simetria lateral, com uma pétala maior mediana superior (vexilo), duas laterais (asas) e duas medianas inferiores (carenas), de prefloração carenal, em que as carenas recobrem as demais pétalas, e ainda dez estames livres de tamanhos diferentes. Encerram 150 gêneros com cerca de 2200 espécies.

As faboídeas (designação moderna das papilionoídeas) têm flores em cacho, vistosas, de simetria lateral com organização semelhante à das cesalpinoídeas, prefloração vexilar, em que o vexilo recobre as demais pétalas, e dez estames, sendo um livre e nove soldados entre si, lateralmente. Encerram 500 gêneros com cerca de 12 mil espécies (HEYWOOD, 1971). A divisão original das faboídeas em 11 tribos por BENTHAM (1865) ainda hoje é seguida embora com muitas modificações e alterações da seqüência como as introduzidas por PHOLLIL *et al.* (1981) redistribuindo esta subfamília em 32 tribos (Figura 1).

Entre os gêneros principais das faboídeas estão os dos jacarandás (*Machaerium*, *Dalbergia* e *Swartzia*), árvores originárias da América do Sul cuja madeira é das mais procuradas para marcenaria, por sua beleza e durabilidade.

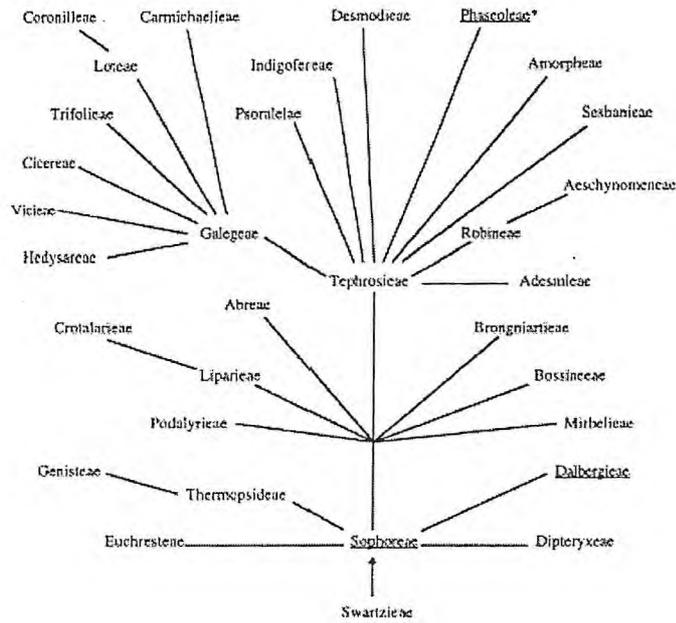


Figura 1 - Relações filogenéticas entre as tribos da sub-família Papilionoideae. As tribos contendo lectinas que apresentam processamento pós-tradução e fragmentos endógenos estão sublinhadas (CALVETE et al., 1998).

Pertencente ao gênero *Dalbergia*, a *Andira surinamensis* (Bondt.) Splitz ex Pulle, objeto deste estudo, que era anteriormente denominada de *Andira retusa* (Poiret) Kunth, *Andira retusa* (Poiret) Kunth Var. *oblonga* Benth., *Geoffroea retusa* Poiret e *Geoffroea surinamensis* Bondt e é conhecida pelos nomes usuais de Angelim, manga-brava, visgueiro, sucupira da várzea, mangarana, morcegueira (MATOS & OLIVEIRA, 1979), entre vários outros nomes. É uma árvore perene com folhas imparipinadas, compostas de 9 a 11 folíolos oblongos, obtusos, retusos, coriáceos, glabros e luzidios. Possui flores roxas que exalam suave perfume de flor de laranjeira (Figura). A casca da árvore tem efeito vermífugo graças ao alcalóide “andirina”. É encontrada em toda a região do Caribe e América do Sul (LEWIS, 1987).

1.2 Lectinas

O termo lectina (do latim “*legere*”) significa escolher e foi aplicado devido a propriedade destas proteínas aglutinarem seletivamente eritrócitos humanos de um grupo específico. PEUMANS & VAN DAMME (1995) definem lectinas como proteínas vegetais que possuem pelo menos um domínio não catalítico capaz de se ligar reversivelmente a mono ou oligossacarídeos específicos. No entanto, muitas lectinas são capazes de se ligar a diferentes eritrócitos sem apresentar especificidade e, sendo assim, a denominação aglutinina, que é usada como sinônimo, seria mais apropriada. Existem várias proteínas que possuem homologia estrutural com as lectinas que apresentam propriedade de hemaglutinação além de capacidade de ligação a carboidratos, mas que são incapazes de promover a aglutinação de células por possuírem apenas um sítio de ligação a carboidratos.

Com base no que se conhece atualmente sobre as lectinas, Peumans e Van Damme, (1995^b), definiram lectinas vegetais como todas as proteínas vegetais que possuem no mínimo um domínio não-catalítico, que se ligam reversivelmente a um específico mono ou oligossacarídeo e classificaram-nas em três tipos possíveis, de acordo com suas características estruturais: mero-, holo- e quimerolectinas (Figura 3).



ANDIRA RETUSA

Figura 2 – Hábito de *Andira surinamensis*.

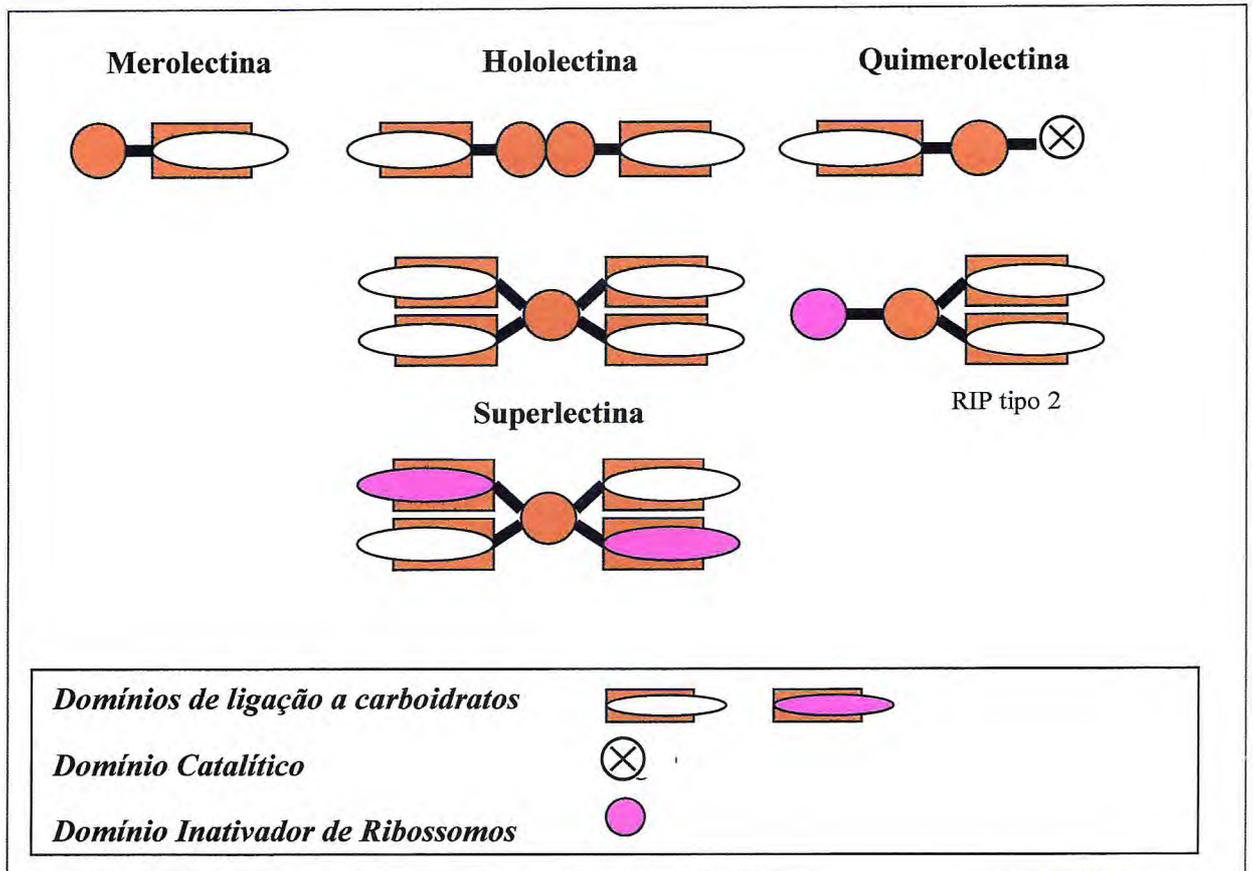


Figura 3 - Representação esquemática de Mero, Holo, Quimero e Superlectinas. Classificação de acordo com VAN DAMME *et al.*, 1998.

Merolectinas são constituídas por um único domínio que se liga a carboidrato e como são monovalentes, não podem aglutinar células e/ou precipitar glicoconjugados.

Hololectinas são formadas exclusivamente por, no mínimo, dois domínios idênticos que se ligam a carboidratos e que devem se ligar ao mesmo açúcar ou a açúcares estruturalmente similares. Como são multivalentes, geralmente aglutinam e/ou precipitam glicoconjugados.

Quimerolectinas são proteínas que têm um ou mais domínios que se ligam a carboidratos, além de um outro domínio, não relacionado com o anterior. Este pode ter uma atividade enzimática bem definida ou qualquer outra atividade biológica, contanto que atue independente do(s) domínio(s) de ligação a carboidratos. Dependendo do número de domínios de ligação a carboidratos, as quimerolectinas podem atuar como holo ou merolectinas, ou seja, ter atividade aglutinante ou não. Além destas, existem as *superlectinas* que são constituídas por dois ou mais domínios que se ligam a carboidratos que, no entanto, são açúcares estruturalmente diferentes (VAN DAMME *et al.*, 1998).

1.2.1 Ocorrência das lectinas

Apesar de terem sido encontradas originalmente em plantas, as lectinas ocorrem em todas as classes e famílias de seres vivos, desde bactérias e vírus até mamíferos (LIENER *et al.*, 1986). Em invertebrados, estão presentes em praticamente todas as classes examinadas como caranguejos (UMETSU *et al.*, 1991), larvas de insetos (GRUBHOFFER & MATHA, 1991), carrapatos (SHARON & LIS, 1989^a), ouriço do mar (YAMADA & AKETA, 1982) e insetos (YU & KANOS, 2000), onde estão presentes principalmente na hemolinfa e órgãos sexuais (SHARON & LIS, 1989^a). A lectina de *Helix pomatia*, uma espécie de lesma, é a mais conhecida entre as de invertebrados, aglutinando especificamente hemácias humanas do tipo A e sendo inibida por N-acetilgalactosamina (HAMMARSTROM, 1972).

Em vertebrados, as lectinas se apresentam de duas maneiras: solúveis ou ligadas a membranas. Uma grande variedade tem sido encontrada em diferentes tecidos de mamíferos, aves e répteis, algumas semelhantes, outras bastante diferentes em sua estrutura molecular e especificidade por carboidratos. Lectinas de membranas têm sido encontradas em fígado de

vários animais (rato, coelho e galinha), em hepatócitos e em células de Kupffer, associadas com a membrana plasmática e com as membranas intracelulares (SHARON & LIS, 1989^a). Foi também identificada a presença de lectinas em membranas de linfócitos de porco, o que levou BEZOUKA *et al.* (1990) a sugerir a possibilidade destas proteínas funcionarem como receptores de células NK (“natural killer cells”). Em répteis foram encontradas lectinas com propriedades físico-químicas semelhantes nos venenos das cobras *Agkistrodon contortrix*, *Ancistrodum piscivarus* e *Crotalus atrox* (GARTNER & OGILVIE, 1984). No soro de enguia foi encontrada uma potente hemaglutinina de hemácias humanas do tipo O (DESAI & SPRINGER, 1972).

Numerosas bactérias produzem lectinas de superfície comumente fazendo parte das fímbrias. As várias lectinas de bactérias parecem funcionar nas etapas iniciais das infecções, por exemplo, quando ocorre a aderência das bactérias a células epiteliais dos tratos urinário e gastrointestinal. As lectinas de bactérias também podem agir como moléculas de reconhecimento na fagocitose de bactérias, em ausência de opsoninas, por macrófagos de camundongos, de ratos, macrófagos peritoneais, linfócitos e polimorfonucleares humanos (SHARON, 1987). Muitas enterobactérias, como *Escherichia coli* e *Salmonellae spp.*, possuem lectinas na sua superfície, fazendo parte das fímbrias. Em alguns casos, como em *Pseudomonas aeruginosa*, a lectina é intracelular, não estando presente na superfície celular (SHARON & LIS, 1989^b). Uma lectina foi também encontrada em *Agrobacterium tumefaciens*, uma bactéria fitopatogênica, tendo sido isolada por cromatografia de afinidade e cuja atividade hemaglutinante foi inibida por polissacarídeos isolados das folhas de choupo, *Populus nigra* (DEPIERREUX *et al.*, 1991).

Em protozoários, a lectina de *Entamoeba histolytica* parece desempenhar importante papel na citotoxicidade em células epiteliais do cólon, atuando na etapa de aderência à célula hospedeira, possuindo ainda, um papel na citotoxicidade celular, distinto da função de aderência (SAFFER & PETRI, 1991). A seqüência de aminoácidos desta lectina, determinada na sua totalidade, apresentou um total de 1209 aminoácidos, possuindo 16 sítios de glicosilação e uma região hidrofóbica de 28 aminoácidos (MANN *et al.*, 1991).

Em vírus, a lectina parece estar envolvida no processo de adesão à célula hospedeira. A infecção pelo vírus da influenza é iniciada pelo evento de adesão, mediada por

uma hemaglutinina da capa do vírion, que reconhece e se liga a resíduos de ácido siálico da superfície celular (GLICK *et al.*, 1991).

Lectinas ocorrem também em fungos (*Rhizoctonia solani*, KELLENS & PEUMANS, 1991; *Pholiota aurivella*, KAWAGISHI *et al.*, 1991; *Agaricus bisporus*, PEASANT & KORNFIELD, 1972).

Em algas marinhas, o número de trabalhos envolvendo lectinas é ainda pequeno porém tem crescido bastante nos últimos anos. A primeira lectina de alga marinha isolada foi a da alga vermelha *Ptilota plumosa* (ROGERS *et al.*, 1977). As algas vermelhas são as que apresentam o maior número de espécies com atividade hemaglutinante e também o maior número de lectinas isoladas (15), seguidas das algas pardas e verdes, que possuem apenas 1 e 4 lectinas isoladas, respectivamente (SAMPAIO, 1992; *idem*, 1997). Em geral as lectinas de algas marinhas apresentam valores mais baixos de pesos moleculares, variando de 4,2 kDa para as isolectinas de *Hypnea japonica* (HORI *et al.*, 1986) até 64,5 kDa para a lectina de *Ptilota serrata* (ROGERS *et al.*, 1990). De uma maneira geral, a atividade hemaglutinante das lectinas de algas marinhas não são dependentes da adição de cátions bivalentes e não são inibidas pela presença de açúcares simples. As lectinas de algas marinhas apresentam, geralmente, alto teor de aminoácidos ácidos, baixas concentrações de aminoácidos básicos e ausência de aminoácidos sulfurados (SAMPAIO, 1992; *idem*, 1997).

As lectinas de plantas superiores têm sido as mais estudadas, tanto pela importância econômica de suas espécies como pela facilidade de isolamento. Nas angiospermas, a família *Gramineae* (VAN DAMME *et al.*, 1988) possui o maior número de lectinas isoladas e caracterizadas entre as monocotiledôneas. Dentre as dicotiledôneas, a classe das *Magnoliatae* tem sido amplamente estudada com lectinas isoladas de suas sementes e de tecidos vegetativos (PEUMANS *et al.*, 1986; LIENER *et al.*, 1986). Já foram isoladas lectinas nas famílias *Cactaceae* (*Machaerocerus eruca*; ZENTENO & CORBODA, 1982), *Carprifoliaceae* (*Sambucus nigra*; BROEKAERT *et al.*, 1984), *Papaveraceae* (*Chelidonium majus*; PEUMANS *et al.*, 1985^a) *Umbeliferae* (*Daucus carrota* e *Apium sp.*, YI *et al.*, 1991 e *Aegopodium podagraria*; PEUMANS *et al.*, 1985^b), *Rosaceae* (*Malus sp.*; POGORELAYA *et al.*, 1991), *Cruciferae* (*Brassica sp.*; UNE, 1991), *Euphobiaceae* (*Tetracarpidium conophorum*; TOGUN *et al.*, 1988), *Curcubitaceae* (*Sechium edule*; VOZARI-HAMPE *et al.*, 1992); *Ranunculaceae* (*Erathis hyemalis*; CAMMUE *et al.*, 1985^b); *Moraceae* (*Artocarpus integrifolia* e *Artocarpus incisa*, MOREIRA & OLIVEIRA, 1983^a;

MOREIRA & OLIVEIRA, 1983^b; MOREIRA & AINOZ, 1981), *Solanaceae* (*Datura stramonium* e *Solanum tuberosum*; BROEKART *et al.*, 1987; ALLEN & NEUBERGER, 1973 família *Leguminosae* é a que possui o maior número de lectinas isoladas. Mais de setenta lectinas de espécies distribuídas em diferentes sub-famílias e tribos desta família já foram purificadas (SHARON & LIS, 1990). A sub-família *Papilionoideae* tem sido a mais estudada, onde já foram isoladas lectinas de diferentes tribos. Por exemplo, na tribo *Phaseoleae*, sub-tribo *Diocleinae*, as sementes de *Canavalia ensiformis* (BITTIGER & SCHNEBLI, 1976), *Dioclea grandiflora* (MOREIRA *et al.*, 1983^c), *Canavalia brasiliensis* (MOREIRA & CAVADA, 1984), *Dioclea lehmanni* (PEREZ, *et al.*, 1990), *Dioclea rostrata* (GRANGEIRO *et al.*, 1990^a; CAVADA *et al.*, 1996^a), *Cratylia floribunda* (OLIVEIRA *et al.*, 1991; CAVADA *et al.*, 1999), *Dioclea guianensis* (VASCONCELOS *et al.*, 1991), *Canavalia bonariensis* (MOREIRA *et al.*, 1991^a); CAVADA *et al.*, 1996^a) já foram isoladas e caracterizadas. Em sementes da tribo *Viceae*, da mesma sub-família, já foram isoladas lectinas de *Lens culinaris* (LIENER *et al.*, 1986), *Pisum sativum* (VAN DRIESSCHE *et al.*, 1982), *Lathyrus ochrus* (ROUGÉ & CAVADA, 1984; ROUGÉ *et al.*, 1986; ROUGÉ *et al.*, 1987^b; YARWOOD *et al.*, 1985) e *Lathyrus cicera* (CAVADA & ROUGÉ, 1985), *Vicia cracca* (BAUMOUM *et al.*, 1979), *Vicia gramínea* (PRIGENT & BOURRILLON, 1975).

A sub-família *Mimosoideae* teve poucas lectinas isoladas, como as de sementes de *Mimosa invisa* (CHANDRIKA & SHAILA, 1987), de sementes de *Parkia javanica* (UTARABHAN *et al.*, 1995), de sementes de *Parkia platycephala* (CAVADA *et al.*, 1997) e, mais recentemente, de sementes de *Parkia discolor* (CAVADA *et al.*, 2000), espécie nativa da Amazônia.

A tribo *Dalbergieae* tem a lectina de sementes de *Vaitarea macrocarpa* (CALVETE *et al.*, 1998^a; CALVETE *et al.*, 1998^b; CAVADA *et al.*, 1998^a), entre outras, já isolada.

Na sub-família *Caesalpinoideae*, as lectinas de três espécies já foram estudadas: *Bauhinia purpurea*, *Griffonia simplicifolia* (SHARON & LIS, 1990) e *Bauhinia variegata* (PINTO, 2000)

1.2.2 Estrutura Molecular

As lectinas de leguminosas são constituídas de produtos de processamento de transcrito primário de mRNA de cerca de 30 kDa chamados de monômeros. Quando são

formadas por uma única cadeia, de cerca de 250 resíduos, são conhecidas como lectinas de leguminosas *a uma cadeia*. Algumas vezes este transcrito pode ser clivado em dois peptídeos menores que podem ser ou não similares no tamanho – são as lectinas de leguminosas *a duas cadeias*. Mais de 50 destes monômeros, pertencentes a várias espécies de leguminosas, já foram seqüenciados e guardam uma homologia de mais de 35% entre si (LORIS *et al.*, 1998). A arquitetura deste monômero é usualmente descrita como constituída de duas folhas- β pregueadas. No entanto, BANERJEE *et al.* (1996) mostraram que a correta descrição envolve três folhas- β pregueadas: um conjunto posterior de 6 segmentos, um anterior de 7 segmentos e uma folha menor de 5 segmentos que tem o papel de manter as duas primeiras unidas. Um núcleo hidrofóbico está localizado entre as folhas frontal e posterior. Não existem regiões de α hélice e 50% dos resíduos estão nas regiões de loops. Um desses loops se curva sobre a folha anterior resultando na formação de um segundo núcleo hidrofóbico entre eles.

O domínio de ligação a carboidratos das lectinas de leguminosas é uma depressão rasa sobre os loops associados com a face côncava da folha- β pregueada de 7 segmentos (SHARMA e SUROLIA, 1997). Dois resíduos altamente conservados, Asp e Asn, são cruciais para o reconhecimento dos carboidratos já que eles, juntamente com um NH da cadeia principal de um resíduo Gly ou Arg, participam em quatro ligações de hidrogênio-chaves com o monossacarídeo. Além disso, o açúcar é estabilizado por interações com resíduos hidrofóbicos como Phe, Tyr, Trp ou Leu (LAKHTIN, 1994). A disposição espacial idêntica destes resíduos conservados tem sido atribuída a impedimentos impostos pela coordenação com Ca^{2+} e outro metal de transição, normalmente o Mn^{2+} . A atividade carboidrato-ligante das lectinas de leguminosas depende da presença destes metais e seus sítios de ligação são extremamente conservados em todas as lectinas desta família. A conservação dos resíduos de aminoácidos nas lectinas de leguminosas que mostram especificidades diferentes frente a carboidratos, explicita a habilidade única destas proteínas de utilizarem uma seqüência comum de resíduos para ligação e ainda discriminar entre diferentes monossacarídeos.

Um exemplo bem claro disso fica por conta das lectinas ConA, Favina, PSL, LOL I e LenL, que têm especificidade para Glicose/Manose e PNA, EcorL e SBA, com especificidade para Galactose/N-acetil galactosamina. Embora reconheçam diferentes carboidratos, usam os mesmos pontos em sua estrutura para estabelecer ligações com estes. Os resíduos que são variáveis são utilizados para estabelecer a especificidade.

A maioria das lectinas de leguminosas tem suas cadeias glicosiladas, umas com um ponto e outras com dois pontos de glicosilação. Estas glicosilações podem ser complexas ou ricas em manose (cadeia oligossacarídea de lectina de soja [DORLAND *et al.*, 1981]). Ambas as formas podem estar presentes num mesmo monômero. As diferenças na glicosilação resultam na formação de glicofomas.

As lectinas de leguminosas em forma nativa são compostas por dois ou quatro monômeros mantidos juntos por interações não covalentes. Estes monômeros podem ser iguais entre si ou não, dando origem a heterotetrâmeros, como no caso das isolectinas de *Phaseolus vulgaris* (FELDSTED *et al.*, 1977).

1.2.3 Processamento pós-traducional

Lectinas de leguminosas são geralmente sintetizadas como um precursor no retículo endoplasmático, o qual, subseqüentemente (após uma remoção inicial de um peptídeo sinal da porção N-terminal) é processado pós-traducionalmente na proteína madura. Este processamento pode consistir de clivagem proteolítica da cadeia precursora (HIGGINS *et al.*, 1983), N-glicosilação, remoção de carboidrato covalentemente ligado (MIN *et al.*, 1992) e mesmo ligação dos originais C- e N-terminais (CARRINGTON *et al.*, 1985). Dependendo da lectina em questão os precursores podem ter ou não atividade hemaglutinante.

Um dos mais complexos e intrigantes tipos de processamento é a cadeia de eventos que levam a estrutura circularmente permutada da Concañavalina A (CARRINGTON *et al.*, 1985) e de várias espécies pertencentes à sub-tribo Diocleinae (compreendendo os gêneros Canavalia, Dioclea e Cratylia). Após a remoção de um peptídeo sinal seguida pela deglicosilação (HERMAN *et al.*, 1985), um segmento de loop é removido do meio da seqüência (BRENNAN & CLARKE, 1993). Cerca de dois terços das moléculas então têm seus originais N- e C-terminais reconectados, resultando em uma proteína circularmente permutada (CARRINGTON, 1985), enquanto o resto permanece como fragmentos β e γ .

Outro tipo de processamento conhecido é o que ocorre com as lectinas a duas cadeias da Tribo Viciae. Neste caso uma seqüência de 6 resíduos é cortada da pró-lectina, resultando numa proteína contendo uma pequena cadeia α C-terminal e uma longa cadeia β N-terminal (HIGGINS *et al.*, 1983).

A lectina de *Vatairea macrocarpa* (VML), uma Dalbergiaceae como a própria *Andira surinamensis*, sofre processamento pós-traducional seguindo rota proposta por CALVETE e colaboradores (1998). A hipótese é que a deglicosilação da Asparagina 111 seja uma etapa necessária para a clivagem da ligação ANS¹¹⁴-LYS¹¹⁵ da cadeia α . Uma subsequente deglicosilação da cadeia β da VML, juntamente com o processamento N- e C- terminais e a heterogeneidade na posição 117, geram as quatro isoformas da cadeia β (Figura 2).

Análises moleculares mostraram que a expressão de várias lectinas de leguminosas é controlada por um ou poucos genes. Porém, como várias leguminosas contêm duas ou mais lectinas em diferentes tecidos, e algumas lectinas são codificadas por genes diferentes, extensas famílias de genes de lectinas são comuns em leguminosas.

1.2.4 Subdivisão das Lectinas

Como as lectinas são um grupo de proteínas muito heterogêneas, várias tentativas já foram feitas para agrupá-las em subgrupos de acordo com suas características bioquímicas/biofísicas, estruturas moleculares, especificidade a carboidrato e propriedades biológicas.

De acordo com a sua especificidade por carboidratos sete grupos foram caracterizados: as Manose específicas, Manose/Glicose, Manose/Maltose, Galactose/N-acetil Galactosamina, N-acetil Glicosamina/N-acetil Glicosaminas, L-Fucose e Ácido Siálico específicas (GOLDSTEIN and PORETZ, 1986). Embora esta classificação seja útil para o uso de lectinas como ferramentas, não diz muito sobre suas correlações evolucionárias. A análise de seqüências de aminoácidos de várias lectinas distinguiu sete famílias de proteínas evolucionariamente relacionadas (VAN DAMME *et al.*, 1998). A família das volucionariamente

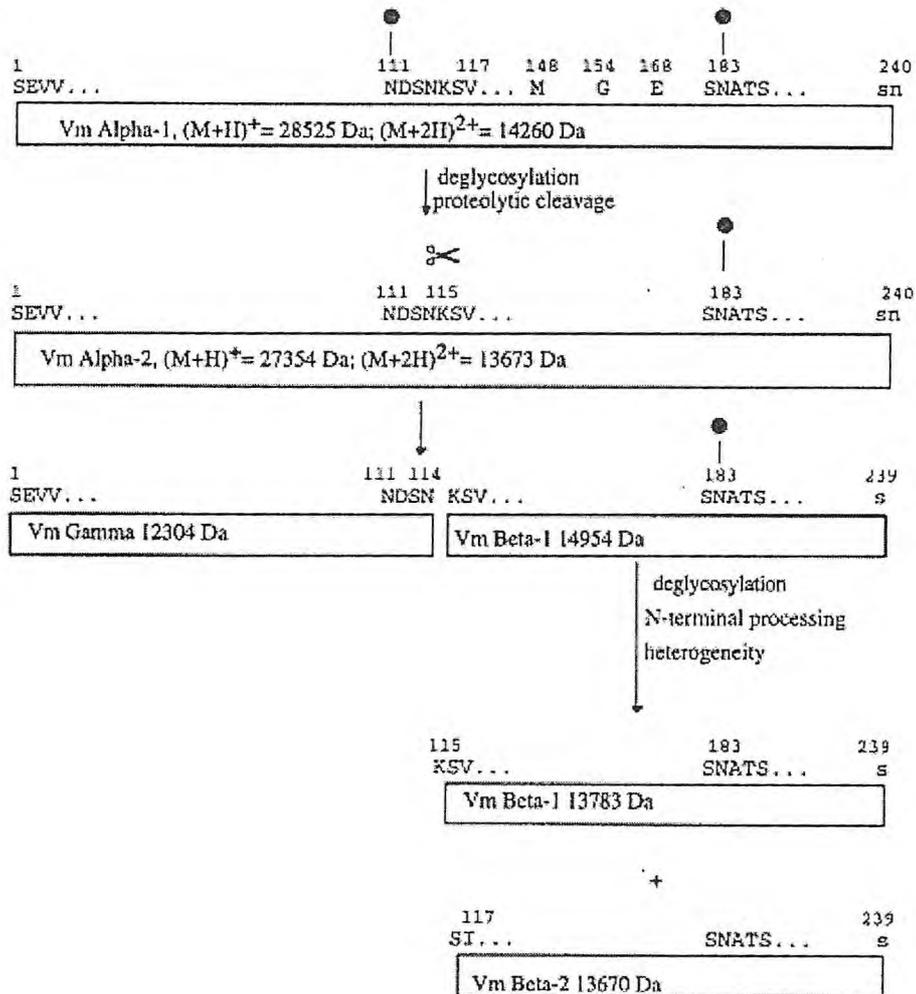


Figura 2 - Rota para o processamento da lectina (VML) de sementes de *Vatairea macrocarpa*. Esquema proposto por CALVETE e colaboradores (1998).

lectinas de Leguminosas, de Monocotiledôneas Manose-específicas, Quitina-ligantes compostas por domínios heveínicos e as RIPs tipo 2 têm vários membros. De outro lado, as tipo Jacalina, da família das Amarantinas e do floema de Cucurbitaceae são, até agora, bem pequenas.

1.2.5 Localização das Lectinas em Plantas Superiores

As sementes quiescentes são as principais fontes de lectinas, onde em alguns casos perfazem até 10 % das proteínas totais (SHARON & LIS, 1990). Entretanto, nos últimos anos tem crescido o número de lectinas isoladas de diferentes tecidos vegetativos de várias espécies de diferentes grupos taxonômicos (PEUMANS *et al.*, 1985^b). Lectinas foram encontradas em cascas (*Sambucus nigra*, BROEKAERT *et al.*, 1984; *Sophora japonica*, UENO *et al.*, 1991), em folhas (*Clivia miniata*, VAN DAMME *et al.*, 1991; *Listera ovata*, VAN DAMME *et al.*, 1987^b; triticales, ALEKSIDZE *et al.*, 1991), em bulbos (*Tulipa gesneriana*, ODA & MINAMI, 1986; *Galanthus nivalis*, VAN DAMME *et al.*, 1987^a), em rizomas (*Urtica dioica*, PEUMANS *et al.*, 1984; *Aegopodium pódagraria*, PEUMANS *et al.*, 1985^b), em tubérculos (*Colchicum autumnale*, PEUMANS *et al.*, 1986; *Solanum tuberosus*, ALLEN & NEUBERGER, 1973), em raízes (*Pisum sativum*, DIAZ *et al.*, 1984), em caules (*Dolichos biflorus*, TALBOT & ETZLER, 1978) e em gemas (*Mallus sp.*, POGORELAYA *et al.*, 1991). Em algumas espécies como *Galanthus nivalis* e *Narcissus cv. Carlton*, VAN DAMME & PEUMANS (1990) mostraram que lectinas ocorrem em quase todos os tecidos, sendo, em alguns órgãos, a proteína mais proeminente, enquanto que em plantas adultas de trigo (*Triticum vulgare*) a lectina ocorre em maior quantidade em regiões de crescimento intenso (MISHKIND *et al.*, 1980).

Em leguminosas as lectinas estão localizadas nos corpos protéicos do parênquima dos cotilédones (BOISSEAU *et al.*, 1984), enquanto que em gramíneas as lectinas se acumulam nos corpos protéicos de camadas específicas do embrião e raízes de plântulas (RAICKEL & LIENER, 1991). Lectinas foram encontradas nas frações albuminas, globulinas e glutelinas e de endosperma de grãos de milho e nas glutelinas do endosperma de grãos de arroz (NEWBURG & CONCON, 1985). Segundo BROEKART *et al.* (1987) a lectina de sementes de *Datura stramonium* está localizada nas regiões mais externas das sementes, como casca e epiderme e, ao contrário das lectinas de gramíneas, esta proteína é apoplástica.

1.2.6 Detecção, Isolamento e Purificação de Lectinas Vegetais

A maneira mais usada para se identificar a presença de lectinas em uma preparação protéica é através da atividade hemaglutinante, onde hemácias humanas e/ou de diferentes animais são utilizadas. Eritrócitos tratados com enzimas proteolíticas têm sido usados no sentido de aumentar a sensibilidade das hemácias à aglutinação, na medida em que, eventualmente, estes tratamentos expõem mais os receptores apropriados nas membranas das hemácias. AINOUZ & SAMPAIO (1991) observaram que extratos de diferentes algas marinhas aglutinavam de maneira diferenciada hemácias humanas dos sistemas ABO e de outros animais quando tratadas com tripsina. Em alguns casos, a aglutinação pode ser efetiva contra os eritrócitos tratados com enzimas proteolíticas (tripsina, papaína, subtilisina e bromelaína), mas não contra os eritrócitos não tratados (AINOUZ *et al.*, 1992).

Outros métodos como precipitação de glicoconjugados e polissacarídeos (LIENER *et al.*, 1986), ELISA (DIAZ *et al.*, 1984; VAN DAMME & PEUMANS, 1990) e radioimunoensaio (MISHKIND *et al.*, 1980) têm sido usados para detectar e/ou isolar lectinas nas diversas partes da planta e durante o ciclo vital da mesma.

No passado, lectinas eram isoladas por métodos tradicionais de fracionamento de proteínas como precipitação salina e cromatografia de troca iônica. Atualmente, a cromatografia de afinidade, que é baseada na habilidade das lectinas se ligarem reversivelmente a açúcares, é a metodologia mais usada. Conhecimentos prévios da especificidade por açúcar de uma lectina, que podem ser obtidos usando uma preparação bruta de lectinas como, por exemplo, os extratos protéicos totais, permitem a escolha do suporte cromatográfico adequado a ser utilizado na cromatografia de afinidade. A preparação bruta ou parcialmente purificada é, então, aplicada na coluna apropriada e, após a eluição de todo o material não retido (proteínas sem atividade lectínica), a lectina é eluída com uma solução de um açúcar inibidor ou por diminuição do pH (SHARON & LIS, 1989^a). Muitos suportes podem ser usados em cromatografias de afinidade, como Sephadex (MOREIRA & CAVADA, 1984; MOREIRA *et al.*, 1991^a; OLIVEIRA *et al.*, 1991; VASCONCELOS *et al.*, 1991; CAVADA *et al.*, 1996^a; *idem et al.*, 1996^b, *idem*, 1996^c), quitina (SHEN *et al.*, 1984), goma de guar (MORAES, 1996), Sepharose 4B (ATTA *et al.*, 1989), estroma de hemácias (ZENTENO *et al.*, 1991; PEUMANS *et al.*, 1985^a; MOREIRA *et al.*, 1983^a), Sepharose-manose (ODA & MINAMI,

1986), Sepharose-maltamil (UENO *et al.*, 1991), Sepharose-N-acetil-quitobiose (KONAMI *et al.*, 1991^a), Sepharose-galactose (KONAMI *et al.*, 1991^b), agarose-fetúina (BROEKAERT *et al.*, 1984), Sepharose-ovomucóide (FLEISCHMANN *et al.*, 1985), Sepharose-mucina (GRUBHOFFER & MATHA, 1991) e Sepharose-N-acetilgalactosamina (HANKINS *et al.*, 1988). A preparação obtida por afinidade é, geralmente, homogênea quando examinada por uma variedade de critérios e não requer purificações posteriores (SHARON & LIS, 1990). Pode ocorrer, entretanto, casos em que esta preparação necessite de etapas posteriores de purificação para se alcançar uma lectina com alto grau de pureza.

1.2.7 Propriedades Biológicas

Lectinas vegetais são amplamente utilizadas como ferramentas e como proteínas bioativas em pesquisas biológicas, biomédicas e biotecnológicas graças a sua atividade de ligação a carboidratos que pode ser usada com fins terapêuticos. No entanto, até o presente momento, não está completamente clara qual a sua função dentro dos organismos. Um número cada vez maior de evidências indica um papel de defesa das lectinas vegetais dentro das plantas já que a especificidade de muitas delas é contra glicoconjugados não-vegetais (PEUMANS e VAN DAMME, 1995a, b).

O reconhecimento celular é o primeiro passo para numerosos processos baseados nas interações (vegetais e animais) célula-célula tais como fertilização, embriogênese, migração celular, formação dos órgãos, defesa imune e infecção microbial. Além disso, muito provavelmente o reconhecimento de células anormais está por trás do crescimento descontrolado de células e sua motilidade que caracterizam a transformação neoplástica e a metástase. A natureza das moléculas envolvidas em tal reconhecimento ainda é desconhecida. Durante as últimas duas décadas muita atenção tem sido focalizada sobre a possibilidade de que tal reconhecimento seja mediado por carboidratos e lectinas. Já foram descobertas lectinas na superfície de vírus, bactérias, em células animais e vegetais, desde os protozoários e fungos até os animais superiores.

Quase todas as células têm, sobre suas superfícies, carboidratos na forma de glicoproteínas, glicolípídeos e polissacarídeos. O potencial dos açúcares como moléculas de informação é muito grande. Enquanto um peptídeo ou um oligonucleotídeo tem sua

informação baseada somente no número de unidades monoméricas e na sua seqüência, os açúcares a tem codificada na posição e configuração anomérica (α ou β) das unidades glicosídicas e na ocorrência de pontos de ramificação. Desta maneira, duas moléculas de um monossacarídeo (por exemplo, glicose), podem formar 11 diferentes dissacarídeos, no entanto, duas moléculas de um único aminoácido ou nucleotídeo só podem formar um único peptídeo ou um único dinucleotídeo (SHARON e LIS, 1989). Assim sendo, as lectinas seriam instrumentos poderosos para a decodificação dos glicocódigos utilizados na troca de informações entre as células (CALVETE *et al.*, 2003). Além disto, na medida em que as lectinas identificam estes glicocódigos nas superfícies celulares, elas, eventualmente, desencadeiam uma série de fenômenos biológicos que comumente são chamados de atividade biológicas das lectinas, quer sejam “*in vitro*” ou “*in vivo*”. Desta forma, tem sido mostrado que lectinas, além de causarem o fenômeno de aglutinação de células e glicoconjugados, são capazes de apresentar atividade pro- (ALENCAR *et al.*, 2002) e anti-inflamatória (ASSREUY, *et al.*, 1997), induzirem a produção e liberação de histamina (FERREIRA *et al.*, 1996), induzirem a produção de óxido nítrico (ANDRADE, 1999), induzirem o fenômeno de apoptose (BARBOSA *et al.*, 2001), entre outras atividades. Em função desta gama de propriedades biológicas e eventuais aplicações de lectinas, justifica-se plenamente a procura constante por novas lectinas que, em função de suas especificidades por mono-, oligo-, polissacarídeos, glicopeptídeos e glicoproteínas, possam apresentar novas atividades biológicas e aplicações de interesse nas diferentes áreas das ciências biomédicas, agrícolas e biotecnológicas.

2- OBJETIVOS

Isolar, purificar e caracterizar química e físico-quimicamente a lectina de sementes de *Andira surinamensis* Bondt.) Splitz ex Pulle. A partir da lectina purificada, determinar e caracterizar a especificidade de ligação a carboidratos.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Material Vegetal

Foram utilizadas sementes quiescentes de *Andira surinamensis* (Bondt) Pulle, pertencente à família Leguminosae, sub-família Papilionoideae, tribo Dalbergieae. As sementes foram coletadas no Campus do Pici da Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza - CE. Todo o material coletado foi devidamente identificado por especialistas do Herbário Prisco Bezerra do Departamento de Biologia da UFC.

3.1.2 Eritrócitos

Hemácias de coelho foram obtidas de animais adultos e saudáveis, mantidos no Biotério do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC.

Hemácias humanas do sistema ABO foram doadas pelo centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE).

3.1.3 Reagentes

Acrilamida, N,N-metilenobisacrilamida, Agarose, Coomassie Brilliant Blue R-250, tripsina TPCK, carboidratos simples, complexos e as glicoproteínas foram obtidos da Sigma Chemical Co., St. Louis, USA. Dodecil sulfato de sódio da Merck, Darmstadt, Alemanha, Sephadex G-50 da Pharmacia, Uppsala, Suécia. Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

4- MÉTODOS

4.1 *Preparação da farinha de sementes de A. surinamensis*

As sementes quiescentes de *A. surinamensis* foram trituradas em multiprocessador, peneiradas, maceradas em gral para obtenção da farinha fina que foi desidratada com acetona, seca ao ar livre e armazenada em frascos hermeticamente fechados e mantidos à temperatura ambiente até uso posterior.

4.2 *Análise Elementar*

4.2.1 *Determinação de Umidade*

Para a determinação de umidade, pesa-filtros previamente tarados, contendo amostras de 200 mg de farinha de sementes de *A. surinamensis* foram colocados em estufa a 110 °C por 24 horas. Após este tempo foram colocados em dessecador até atingirem a temperatura ambiente, sendo então pesados. As amostras foram novamente colocados em estufa a 110 °C por mais 12 horas e pesados. Este procedimento foi repetido sucessivamente até que os pesos permanecessem constantes. O teor de umidade foi calculado pela diferença entre os pesos inicial e final das amostras, e expresso em porcentagem.

4.2.2 *Determinação de Nitrogênio Total*

O teor de nitrogênio total da farinha de sementes de *A. surinamensis* foi determinado segundo o método descrito por BAETHGEN & ALLEN (1989).

A 20 mg de amostra foram adicionadas 1,1 g de catalisador (100 g de KH_2SO_4 , 10g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e 1 g de selênio) e 1,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. A mistura foi deixada em mineralizador por 30 minutos e diluída para 25,00 mL com água destilada. A 100 μL da amostra, já diluída, foram adicionados 0,9 mL de água destilada, 5,5 mL de tampão (NaHPO_4 0,1 M, tartarato de sódio e potássio a 5 % e NaOH 5,4 %), 4 mL de uma solução de salicilato de sódio (15 %), nitroprussiato de sódio (0,03 %) e 2 mL de hipoclorito de sódio (6

%). As amostras foram colocadas em banho-maria a 37 °C por 15 minutos e foram feitas as leituras das absorvâncias a 650 nm (espectrofotômetro Pharmacia LKB-novaspec II). O teor de nitrogênio total (N_T) foi determinado a partir de uma curva padrão obtida com sulfato de amônio e o teor de proteína bruta (P_b) calculado pela fórmula:

$$P_b = N_T \times 6,25$$

Determinação de Cinzas

Na determinação do teor de cinzas, cadinhos de porcelana previamente tarados contendo 1 g de amostra foram colocados em mufla a 650 °C até incineração completa do material orgânico. Em seguida o material foi mantido em dessecador contendo sílica-gel onde permaneceu até atingir a temperatura ambiente. Os cadinhos contendo as amostras incineradas foram pesados e o teor de cinzas, calculado pela relação entre o peso do resíduo e o peso inicial da amostra, sendo o resultado expresso em percentagem.

4.2.3 Determinação de Lipídeos Totais

A determinação de lipídeos totais de farinha de sementes de *A. surinamensis* foi feita segunda a técnica descrita por TRIEBOLD (1946), substituindo-se o éter por n-hexano.

Amostras de 5g de farinha foram submetidas à extração lipídica por lavagens sucessivas com hexano, por algumas horas, com agitações ocasionais. O extrato hexânico, resultante da reunião dos sobrenadantes das lavagens foi evaporado em evaporador rotatório, sob pressão reduzida, obtendo-se os extratos lipídicos.

O teor de lipídeos foi calculado pela relação entre o peso do lipídeo extraído e o peso inicial da amostra, sendo expresso em percentagem.

4.3 Extração de Proteínas da Farinha de sementes de *A. surinamensis* com diferentes soluções

Para se determinar as melhores condições de extração da atividade hemaglutinante nas farinhas de sementes de *A. surinamensis*, a farinha preparada como no item 4.1 foi

submetida a extrações protéicas na proporção 1:10 (m/v) com diferentes soluções (tampão Glicina 0,1 M, pH 2,6; tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,6; tampão Glicina 0,1 M, pH 9,0, todos contendo NaCl 0,15 M; NaCl 0,15 M e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 M) por 30 minutos, sob agitação constante, à temperatura ambiente. As suspensões obtidas foram centrifugadas a 8000 g durante 30 minutos a 4 °C. Os sobrenadantes obtidos foram filtrados em papel de filtro qualitativo e os extratos protéicos resultantes utilizados em ensaios de hemaglutinação e dosagem de proteínas.

4.4 Fracionamento do Extrato Protéico das sementes de *A. surinamensis*

Farinha de sementes de *A. surinamensis* foi mantida em 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 precipitado (GLOBULINAS) e sobrenadante (ALBUMINAS). As GLOBULINAS foram ressuspensas em solução de NaCl 0,5M, dialisadas exaustivamente contra água e liofilizadas. As ALBUMINAS foram submetidas à diálise exaustiva contra água e liofilizadas.

A partir do Precipitado I foram isoladas as PROLAMINAS obtidas através da extração com solução de etanol 70% e subsequente centrifugação e filtração. O Precipitado 2 da última centrifugação foi extraído com HCl 0,1M durante 1 hora, submetido à centrifugação e filtração, dando origem as GLUTELINAS ÁCIDAS, obtidas após diálise contra água destilada e liofilização do sobrenadante, e o Precipitado III.

As GLUTELINAS ÁCIDAS foram extraídas do Precipitado III com NaOH 0,1M durante 1 hora e subsequente centrifugação e filtração. O resíduo final produzido foi descartado.

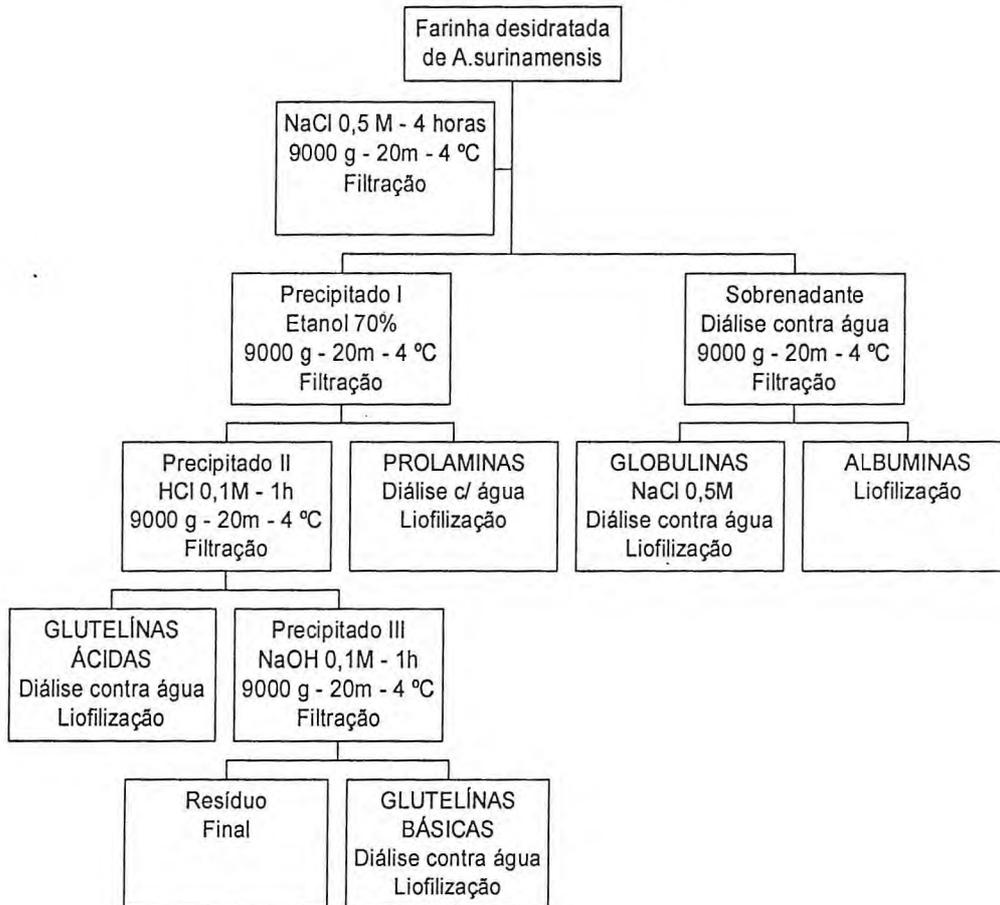


Figura 3 - Esquema de fracionamento do extrato protéico das sementes de *Andira surinamensis*. Todas as centrifugações foram feitas a 4 °C, durante 20 minutos a 9000 g.

Cada fração protéica obtida foi submetida à dosagem de proteínas e ao ensaio de atividade hemaglutinante.

4.5 Dosagem de proteínas dos diferentes extratos e das frações protéicas

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de BRADFORD (1976) usando-se albumina sérica bovina como padrão. A 100 µL de amostra foram adicionados 2,5 mL do reagente de Bradford e homogeneizado. Após 10 minutos de incubação foram feitas as leituras das absorbâncias a 595 nm em espectrofotômetro Novaspec II (Pharmacia LKB).

4.6 Determinação de Atividade Hemaglutinante

A atividade hemaglutinante das frações protéicas e eluatos de sementes de *A. surinamensis* foi determinada por diluições seriadas em tubos de ensaio seguindo-se a metodologia descrita por MOREIRA & PERRONE (1977). Em cada tubo foram adicionados 200 µL de NaCl 0,15M. No primeiro tubo foram adicionados 200 µL da amostra e uma série de diluições duplas foram feitas (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, etc.), homogeneizando-se completamente a mistura antes de cada transferência. A cada diluição foram adicionados 200 µL de uma suspensão de eritrócitos a 2% (v/v) e a mistura foi incubada por 30 minutos a 37 °C. O material foi deixado em repouso por 30 minutos à temperatura ambiente para, em seguida, ser centrifugado a 2.000 g por 30 segundos. Os resultados foram interpretados macroscopicamente e o título expresso em unidades de hemaglutinação (UH), definida como o inverso da maior diluição da amostra que apresentou aglutinação nítida.

Hemácias de coelho e humanas do sistema ABO foram utilizadas no estado normal e tratadas com enzimas proteolíticas (bromelaína, papaína, tripsina e subtilisina). As amostras de sangue foram tratadas enzimaticamente suspendendo-se as hemácias, lavadas exaustivamente com NaCl 0,15 M, à concentração de 2 % em solução contendo a enzima proteolítica (0,1 mg de enzima por 10 mL de NaCl 0,15M). A suspensão foi incubada a 20 °C por 1 hora, com agitações ocasionais e, a seguir, lavada sete vezes com solução salina (NaCl

0,15M) gelada. Após centrifugação (3000 g), as células foram ressuspensas em NaCl 0,15 M para uma concentração final de 2 %.

4.7 Ensaio de Inibição da Atividade Hemaglutinante

Os ensaios de inibição da atividade hemaglutinante por açúcares simples foram feitos em placas de microtitulação, segundo metodologia descrita por RAMOS (1998).

Inicialmente foram preparadas diluições seriadas de cada açúcar a partir de soluções estoques de 0,1 M em NaCl. Em seguida, foi adicionada a cada poço 25 μ L de solução de lectina contendo 4 U.H. As placas foram incubadas em estufa por 30 minutos a 37 °C e deixadas em repouso por 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados em todos os poços 25 μ L de uma suspensão a 2 % de hemácias de coelho tripsinizadas. As placas foram novamente incubadas nas mesmas condições anteriores e a determinação dos títulos de hemaglutinação foi feita macroscopicamente, utilizando-se como padrão a atividade hemaglutinante da mesma solução de lectina na ausência do inibidor. A inibição foi determinada como sendo a menor concentração de açúcar e/ou glicoproteína capaz de inibir uma solução de lectina contendo 4 U.H.

4.8 Cromatografia de Afinidade em Coluna de Sepharose-Manose

A lectina de sementes de *A. surinamensis* foi isolada aplicando-se o sobrenadante resultante da centrifugação da extração com solução de sulfato de amônia 1 M em coluna de Sepharose-Manose ($V = 5$ mL) equilibrada com a mesma solução e deixado em refluxo por 2 horas. Após remoção dos materiais não-retidos, a lectina foi eluída com solução de glicina 0,1M com NaCl 0,15M e a pH 2,6. O pico obtido foi dialisado exaustivamente contra água. A amostra foi liofilizada e estocada a 5 ° C. A absorbância a 280 nm foi utilizada para determinação do teor de proteínas no eluato da coluna cromatográfica.

4.9 Cromatografia de Troca iônica em Coluna de DEAE-Sephacel

A lectina de sementes de *A. surinamensis* foi purificada aplicando-se 200 mg da lectina isolada como descrito anteriormente dissolvida em 10 mL da solução de equilíbrio em coluna de DEAE-Sephacel ($V = 45$ mL). A coluna foi equilibrada com solução de Tris-HCl,

0,1 M em pH 7. Após remoção dos materiais não-retidos através de lavagem com o tampão de equilíbrio, a lectina foi eluída com o tampão de equilíbrio contendo NaCl em um gradiente linear de 0 a 1M. A absorbância a 280 nm e atividade hemaglutinante foram determinadas como descritas anteriormente. O pico obtido foi dialisado contra água exaustivamente. As amostras foram liofilizadas e estocadas a 5 ° C.

4.10 Espectro de Absorção da Lectina de *A. surinamensis*

O espectro de absorção da lectina foi determinado em espectrofotômetro GENESYS-5 (Spectronic), com cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. A lectina de *A. surinamensis*, a uma concentração de 1 mg/mL, foi preparada em NaCl 0,15 M e a absorbância determinada na faixa da luz ultravioleta.

4.11 Análise eletroforética das Lectinas

Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS das frações protéicas, picos cromatográficos e da lectina de sementes de *A. surinamensis* foi realizada seguindo-se a técnica descrita por LAEMMLI (1970), adaptada para o uso em géis de separação em placas. O gel de aplicação (encerrando 3,5% de poliacrilamida) continha tampão Tris-HCl 25mM, pH 6,8 e SDS 0,1%. O gel de separação (gradiente de 5 a 20% de poliacrilamida) continha tampão Tris-HCl 375mM, pH 8,8 e SDS 0,1%.

As amostras foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 625mM, pH 8,3, contendo SDS 1% e aquecidas a 100°C por 10 minutos. Azul de Bromofenol 0,02% e cristais de sacarose foram adicionados às amostras antes das mesmas serem aplicadas ao gel. A corrida eletroforética foi feita em posição vertical e corrente constante (15 mA) por um período de 4 horas. Após o término da corrida, o gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue R-250 a 0,05% em metanol, ácido acético e água (1 : 3,5 : 8, v/v/v) e o excesso retirado com a mesma solução na ausência do corante, permitindo a visualização das bandas protéicas a olho nu.

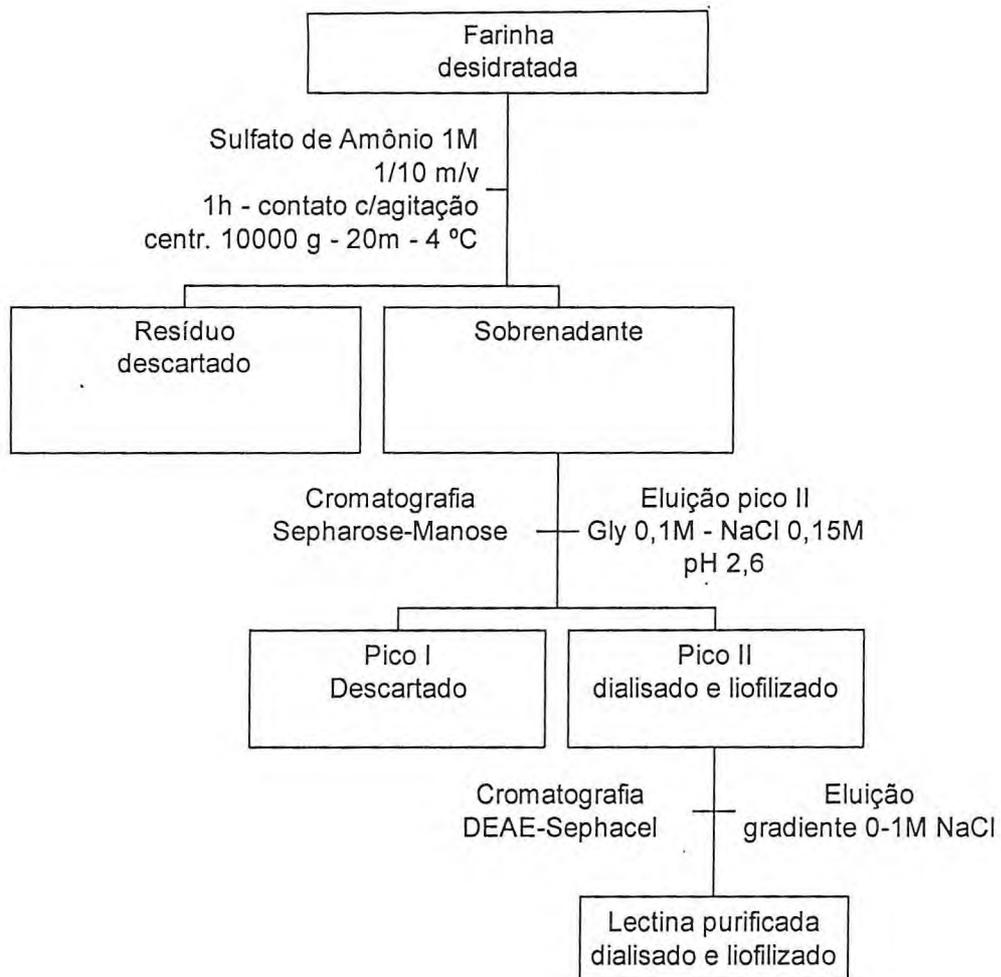


Figura 6 - Esquema de isolamento e purificação da lectina de sementes de *Andira surinamensis*.

4.12 Espectrometria de massa das lectinas

A massa molecular real da proteína purificada foi determinada em um espectrômetro de massa MALDI-TOF-MS (Matrix assisted Laser Desorption Time-Of-Flight Mass Spectrometry) PE Biosystems Voyager DE-STR operando a 20 kV em modo linear. As matrizes utilizadas para ionização da amostra foram o ácido alfa-4-dimetoxicianâmico e o ácido tran-4-hidroxi-3-metoxicinâmico. Utilizando como padrão a mistura de calibração² da Perseptive Biosystems.

4.13 Análise de Aminoácidos

A composição de aminoácidos da lectina de *A. surinamensis* foi determinada em analisador automático de aminoácidos Pharmacia Alpha Plus após hidrólise das amostras com HCl 6 N a 110 °C por aproximadamente 15 horas em ampolas seladas e a vácuo. A lectina de *A. surinamensis* foi também submetida a diferentes tempos de hidrólise para uma determinação precisa da composição de aminoácidos.

4.14 Determinação da seqüência N-terminal e busca de seqüências homólogas

A estrutura primária parcial da lectina de sementes de *A. surinamensis* 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 (ALTSCHUL *et al.*, 1997) no endereço eletrônico <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

4.15 Marcação da lectina de sementes de *A. surinamensis* com fluoresceína

Alíquotas contendo 1 mg de lectina acrescida do monossacarídeo inibidor (1M) foram dissolvidas em 2mL de solução de conjugação (1,5 mL de tampão carbonato/bicarbonato de sódio 0,2 M; pH 9,3, contendo 0,5 mL de etilenoglicol). Após rápida agitação em vortex, 500 µL de uma solução de FITC (0,05mg, em etilenoglicol) foram adicionados e a mistura submetida a agitação por 5h a 4 °C e ao abrigo da luz. Após incubação, a fração contendo lectina/FITC foi separada da FITC não conjugada por meio de cromatografia de exclusão molecular em coluna PD 10 (Pharmacia LKB – 9,0 mL), previamente equilibrada com água Milli Q saturada com N-butanol 5 % e com fluxo contínuo mantido por força da gravidade. Imediatamente antes da cromatografia, 450 µL da solução de equilíbrio foram adicionados à amostra e, em seguida, aplicados na coluna. O pico I, que correspondia a fração lectina/FITC foi retirado com 3,5 mL de solução N-butanol 5 %, enquanto que a FITC não conjugada foi eluída no Pico II com 10 mL da mesma solução.

4.16 Atividade Antimicrobiana

Com o objetivo de evidenciar se a lectina de sementes de *A. surinamensis* apresentava atividade antibacteriana, amostras de cultura em ágar da bactéria *Xanthomonas axonopodis passiflorae* foram colhidas e suspensas em água bidestilada ($A_{650nm}=0,3/cc10^{-8}$ CFU/mL). Alíquotas desta suspensão foram diluídas com 10^{-5} CFU/mL e incubadas com a lectina de sementes de *Andira surinamensis* (250 µg/ml) ou com uma mistura da solução de lectina em presença de manose 0,1M, por 1 hora, na temperatura de 37°C. As células sobreviventes foram fixadas e analisadas em pratos nutritivos (Difco)(n=5).

4.17 Estudo Morfológico por microscopia eletrônica

Para a análise morfológica, amostras de *Xanthomonas axonopodis passiflorae*, tratadas com a lectina de sementes de *Andira surinamensis* associadas ou não à fluoresceína, foram retiradas para visualização por microscopia eletrônica, após a 1ª. hora de incubação do ensaio da atividade antimicrobiana. Este material foi centrifugado e alíquotas foram fixadas a uma temperatura de 4 °C no tampão de cacodilato (0,1M; pH 7,4) contendo 2,5 % (v/v) de

glutaraldeído por 12 horas e encaminhado para o ensaio de microscopia eletrônica. As amostras fixadas foram então filtradas (Milipore 1 μm) e, a seguir, lavadas com tampão de cacodilato (0,1 M) contendo sacarose (7 %), desidratadas em concentrações crescentes de etanol e colocadas em contato com hexametildisilazano ($\text{C}_6\text{H}_{19}\text{NSi}_2$) antes da secagem.

As amostras foram então coradas com ouro, a vácuo, usando corante E5200 Autosputter, Micrografias eletrônicas foram obtidas usando microscópio eletrônico modelo Cambridge Stereoscan S 240.

5- RESULTADOS

5.1 Análise Elementar

Os resultados obtidos na determinação dos teores de proteínas, umidade e cinzas da farinha de sementes de *A.surinamensis* são apresentados na Tabela 1.

5.2 Extração de Proteínas da Farinha de sementes de *A.surinamensis* com diferentes soluções

A Tabela 2 mostra a eficiência de soluções a diferentes valores de pH na extração das proteínas revelando que, para a extração de proteínas das sementes de *A.surinamensis*, a solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,1 M foi a melhor.

5.3 Determinação da Atividade Hemaglutinante Específica nos diversos Extratos Protéicos Totais

A Tabela 3 mostra a ocorrência da atividade hemaglutinante específica nos extratos obtidos a partir de diferentes soluções da farinha de sementes de *A.surinamensis* frente a hemácias de coelho e humanas do sistema ABO, nativas ou tratadas com enzimas proteolíticas (tripsina, papaína, bromelaína e subtilisina).

Os extratos apresentaram atividade hemaglutinante somente contra hemácias de coelho e quando estas tinham sido tratadas com enzimas proteolíticas.

5.4 Fracionamento Protéico

O extrato total obtido com NaCl 0,5 M foi fracionado em PROLAMINAS, GLOBULINAS, ALBUMINAS, GLUTEÍNAS ÁCIDAS e GLUTEÍNAS BÁSICAS. A fração protéica GLUTELINAS BÁSICAS não apresentou atividade hemaglutinante e sua concentração protéica foi menor que a detectada pelo ensaio utilizado.

Tabela 1 - Composição mínima das sementes de *Andira surinamensis*.

| | |
|----------------------------------|------|
| Umidade ¹ | 8,8 |
| Cinzas | 2,1 |
| Proteína Bruta ² | 12,6 |
| Lípídeos Totais | 8,5 |
| Carboidratos Totais ³ | 67,7 |

1 – valores determinados com base no peso seco e expressos em porcentagem;

2 – nitrogênio total x 6,25

3 – obtido por diferença dos outros componentes.

Tabela 2 - Extração de proteínas em diferentes soluções das farinhas de sementes de *A. surinamensis*.

| Soluções utilizadas | mg P/g F |
|--|----------|
| Tampão Glicina 0,1 M, pH 2,9 c/ NaCl 0,15 M | 20,1 |
| Tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,6 c/ NaCl 0,15 M | 23,2 |
| Tampão Glicina 0,1 M, pH 9,0 c/ NaCl 0,15 M | 25,6 |
| Solução NaCl 0,15 M | 57,14 |
| Solução $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,1 M | 95,52 |

Tabela 3 - Atividade Hemaglutinante Específica (U.H.mg.P⁻¹) nos extratos da farinha de sementes de *Andira surinamensis*.

| Sol. de extração | Tratamento enzimático | Hemácias Humanas | | | Hemácias de Coelho |
|---|-----------------------|------------------|---|---|--------------------|
| | | A | B | O | |
| Tampão Glicina 0,1 M, pH 2,9 c/ NaCl 0,15 M | Sem tratamento | - | - | - | - |
| | Bromelaína | - | - | - | 17,0 |
| | Papaína | - | - | - | 17,0 |
| | Subtilisina | - | - | - | 36,0 |
| | Tripsina | - | - | - | 34,0 |
| Tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,6 c/ NaCl 0,15 M | Sem tratamento | - | - | - | - |
| | Bromelaína | - | - | - | 3,31 |
| | Papaína | - | - | - | 2,34 |
| | Subtilisina | - | - | - | 1,65 |
| | Tripsina | - | - | - | 9,35 |
| Tampão Glicina 0,1 M, pH 9,0 c/ NaCl 0,15 M | Sem tratamento | - | - | - | - |
| | Bromelaína | - | - | - | 3,35 |
| | Papaína | - | - | - | 8,08 |
| | Subtilisina | - | - | - | 6,69 |
| | Tripsina | - | - | - | 8,08 |
| Solução NaCl 0,15 M | Sem tratamento | - | - | - | - |
| | Tripsina | - | - | - | 57,14 |
| Solução (NH ₄) ₂ SO ₄ 0,1 M | Sem tratamento | - | - | - | - |
| | Tripsina | - | - | - | 95,52 |

A atividade hemaglutinante se distribuiu entre as demais frações protéicas havendo uma concentração protéica pouco maior nas frações GLOBULINAS e GLUTELINAS ÁCIDAS como pode ser visto na Tabela 4.

5.5 Inibição da atividade Hemaglutinante de lectina de *A. surinamensis*

Os resultados dos estudos de inibição da atividade hemaglutinante por açúcares simples estão apresentados na Tabela 5. O açúcar manose foi o mais potente inibidor (12,5 mM), seguido por glicose (50 mM). A galactose não foi capaz de inibir a atividade hemaglutinante da lectina de sementes de *A. surinamensis*.

5.6 Cromatografia de Afinidade em Coluna Sepharose-Manose

Ensaio prévios indicaram o açúcar manose como inibidor da atividade hemaglutinante do extrato total de farinha de sementes de *A. surinamensis*. Desta forma o extrato foi submetido à cromatografia de afinidade em coluna Sepharose-Manose previamente equilibrada com solução de sulfato de amônio 1 M.

A cromatografia apresentou um pico não retido (PI) (Figura), eluído logo após o volume de exclusão da coluna, que representava as proteínas de pesos moleculares elevados e que não possuíam atividade hemaglutinante. A seguir a coluna foi eluída com solução de glicina 0,1M com NaCl 0,15M e a pH 2,6 e um único pico foi eluído, PII, onde se concentrava toda a atividade hemaglutinante.

5.7 Cromatografia de Troca iônica em Coluna de DEAE-Sephacel

Quando a lectina (PII) foi submetida à cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sephacel, previamente equilibrada com solução tampão PBS 0,002 M em pH 7, um único pico retido e ativo foi eluído com um gradiente 0-2M de NaCl (Figura).

Tabela 4 - Atividade Hemaglutinante Específica (U.H.mg.P⁻¹) nas diferentes frações protéicas de sementes de *A. surinamensis*.

| Frações | Proteína Extraída mgP/gF | Atividade Hemaglutinante UH/mgP |
|--------------------|--------------------------|---------------------------------|
| Globulinas | 0,4031 | 2540,31 |
| Glutelinas ácidas | 0,2207 | 2319,9 |
| Glutaminas básicas | - | - |
| Prolaminas | 0,1498 | 1708,94 |
| Albuminas | 0,3527 | 1451,67 |

Tabela 5 - Inibição da atividade hemaglutinante da lectina de sementes de *A.surinamensis* por açúcares.

| Açúcar | Concentração Mínima MM* |
|-----------|----------------------------|
| Glicose | 50,0 |
| Manose | 12,5 |
| Galactose | NI |

* - Concentração mínima de açúcar para a inibição de 1 U.H.
NI – não inibiu até a concentração inicial de 0,1 M.

5.8 Eletroforese

A lectina de sementes de *A. surinamensis*, quando submetida à eletroforese em gel de poliácridamida com SDS, apresentou 3 bandas principais com massas moleculares aparentes de 25, 14 e 12 kDa (Figura 9) que correspondiam respectivamente a cadeia intacta (α) e a produtos de processamento proteolítico, fragmento β (resíduos 1-118) e fragmento γ (resíduos 119-237), a exemplo do que ocorre com outras lectinas (*D. grandiflora*, *C. ensiformis* e *C. floribunda*).

5.9 Espectro de absorção da lectina de *A. surinamensis*

O espectro de absorção da lectina purificada de *A. surinamensis* dissolvida em NaCl 0,15 M (1 mg/mL) é apresentado na Figura . O coeficiente de extinção determinado a 280 nm apresentou valor igual a 20,04.

5.10 Espectrometria de massa das lectinas

A análise do pico obtido pela cromatografia de troca iônica por espectrometria de massa revelou íons correspondentes a cadeia α (25492 Da) e os fragmentos β e γ (12205 Da e 13305 Da, respectivamente) (Tabela 6).

5.11 Análise de aminoácidos da lectina de sementes de *A. surinamensis*

A análise de aminoácido da lectina é particularmente rica nos resíduos de aminoácidos glicina e ácido aspártico/asparagina. A lectina não apresentou resíduos de cisteína, tirosina e arginina. (Tabela 7).

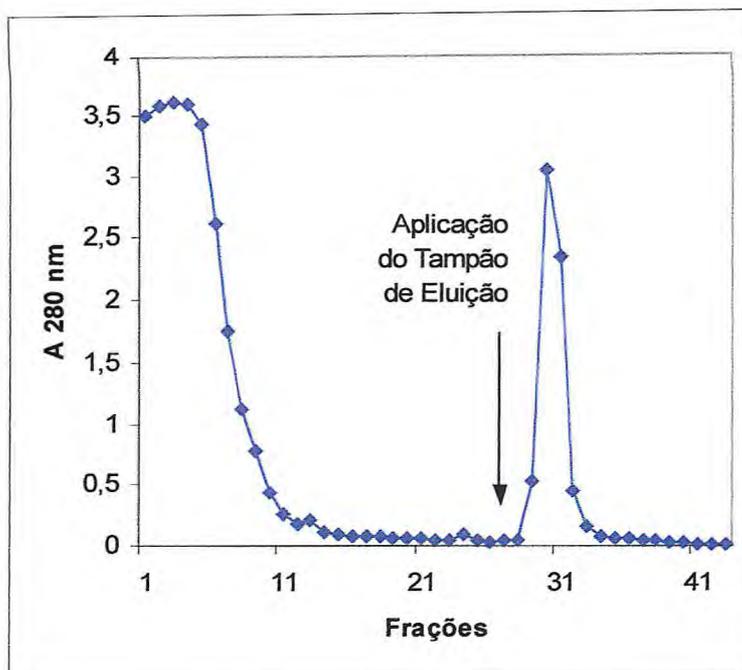


Figura 7 - Cromatografia de afinidade em coluna Sepharose-manose do extrato total de farinha de sementes de *A. surinamensis*.

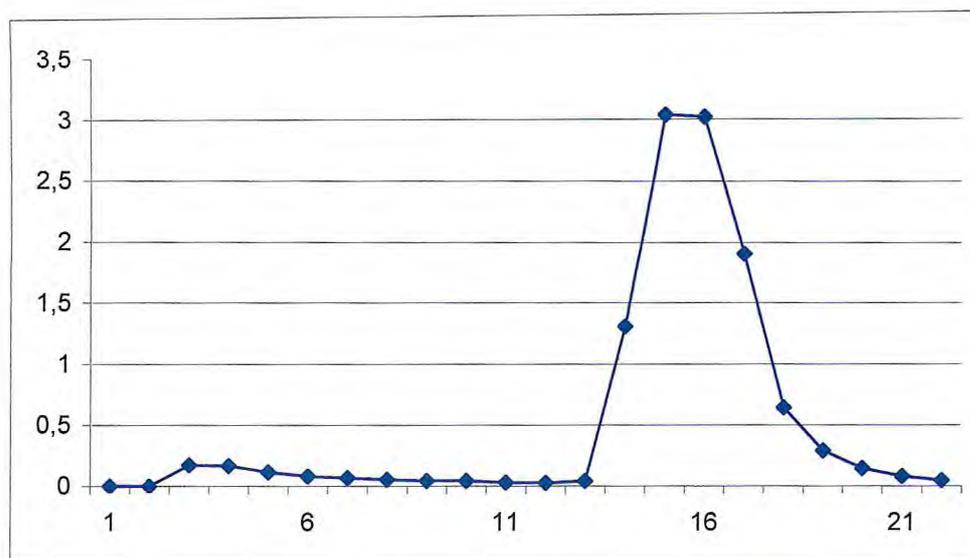


Figura 8 – Cromatografia de troca iônica em coluna DEAE-Sephacel. A coluna foi equilibrada com solução de tampão PBS 0,002M em pH 7 e eluída com um gradiente 0-2M de NaCl do pico retido na cromatografia de afinidade em coluna Sepharose-manose do extrato total de farinha de sementes de *A. surinamensis*.

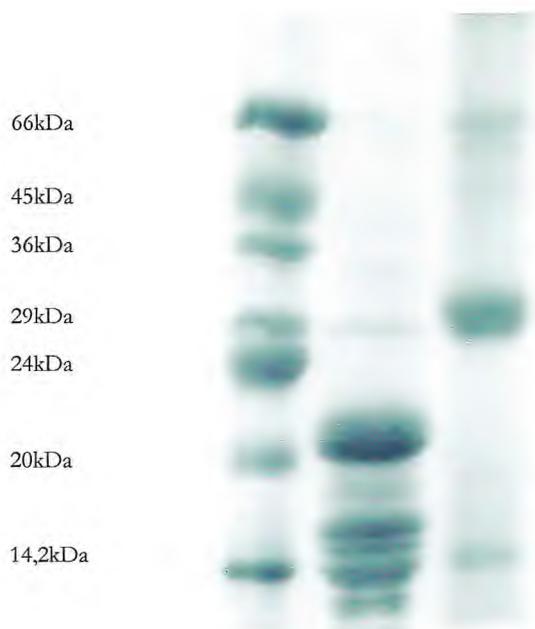


Figura 9 - Eletroforese da lectina de sementes de *Andira surinamensis*. No poço A estão os marcadores moleculares albumina sérica bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), Gliceraldeído-3-P-Desidrogenase (36kDa), anidrase carbônica de eritrócito bovino (29 kDa), Tripsinogênio de Pâncreas bovino (24kDa), Inibidor de Tripsina (20kDa) e Lactoalbumina de leite bovino (14,2 kDa). No poço B foi aplicado o extrato total das sementes de *A. surinamensis* e no poço C o PII da cromatografia de DEAE-Sephacel.

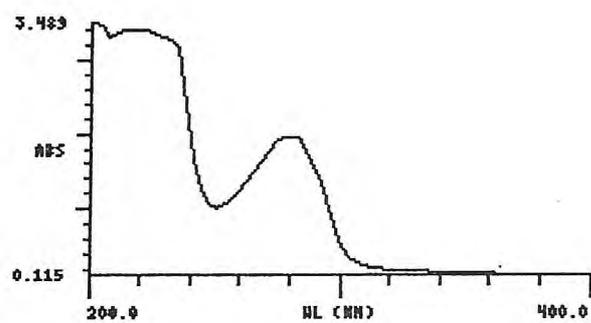


Figura 10 - Espectro de absorção da solução a 1 mg/mL da lectina de *A. surinamensis* dissolvida em NaCl 0,15 M.

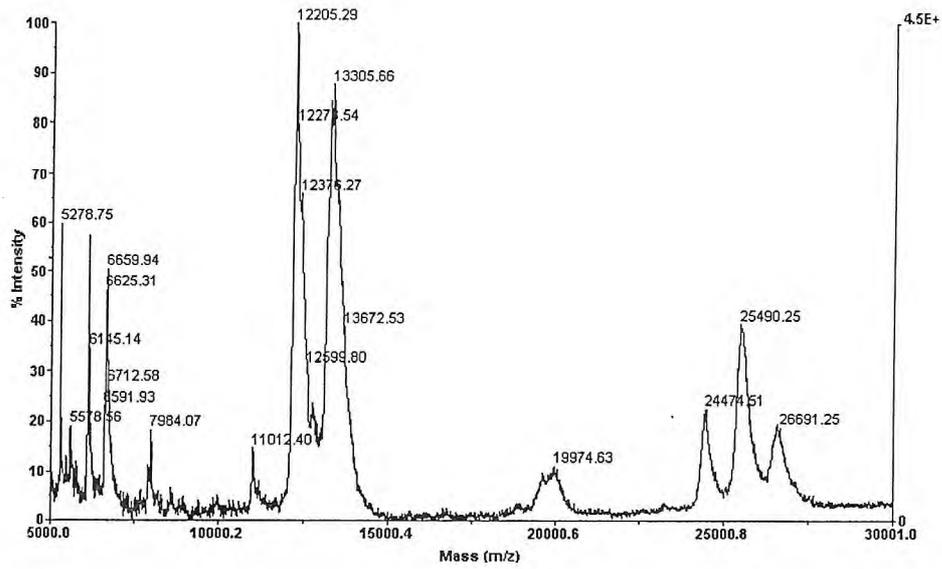


Figura 11 - Espectro de massa do pico II da cromatografia DEAE-Sephacel

Tabela 6 - Massa molecular da cadeia α , fragmentos β e γ das lectinas de semente de *A.surinamensis* determinadas por espectrometria de massa.

| Subunidades | <i>A.surinamensis</i> (Da) |
|--------------------|-------------------------------|
| Cadeia α | 25.492 \pm 1 |
| Fragmento β | 13.350 \pm 1 |
| Fragmento γ | 12.205 \pm 1 |

Tabela 7 - Comparação entre a composição de aminoácidos de *Andira surinamensis* e *Vaitarea macrocarpa*.

| Aminoácido | ASL | VML* |
|------------|--------|--------|
| | nmol % | nmol % |
| Lys | 4.1 | 6.3 |
| His | 1.2 | 2.1 |
| Arg | - | 2.1 |
| Asx | 15.7 | 13.0 |
| Thr | 8.1 | 8.0 |
| Ser | 17.9 | 12.2 |
| Glx | 6.9 | 6.3 |
| Pro | 4.5 | 5.0 |
| Gly | 7.4 | 5.5 |
| Ala | 8.5 | 8.4 |
| Val | 6.4 | 8.4 |
| Met | 0.6 | 0.4 |
| Ile | 5.3 | 4.6 |
| Leu | 8.5 | 6.7 |
| Tyr | - | 2.5 |
| Phe | 4.9 | 5.9 |
| Trp | ND | 2.5 |
| Cys | - | - |

*- Deduzida da seqüência da lectina (CALVETE *et al.*, 1998)

5.12 Inibição bacteriana através da lectina de sementes de *Andira surinamensis*

A lectina manose-específica de sementes de *Andira surinamensis* foi capaz de inibir em 70 % a viabilidade de colônias de *Xanthomonas axonopodis* pv. *Passiflorae* (Figura 12), efeito este não observado quando a mesma lectina foi pré incubada com seu açúcar inibidor específico.

Pontos de desestabilização de membrana bacteriana são vistos por microscopia eletrônica o que é confirmado na microscopia de transmissão onde se observa perda de material citoplasmático (Figura 13). A ligação da lectina na membrana citoplasmática é confirmada nos estudos de microscopia de fluorescência (Figura 14), onde claramente notamos forte fluorescência nas membranas das bactérias mostrando um reconhecimento lectínico.

5.13 Seqüenciamento do N-terminal

O seqüenciamento do N-terminal da lectina de *A. surinamensis* mostrou dois picos, um pico majoritário e um minoritário de seqüência similar (Figura 15).

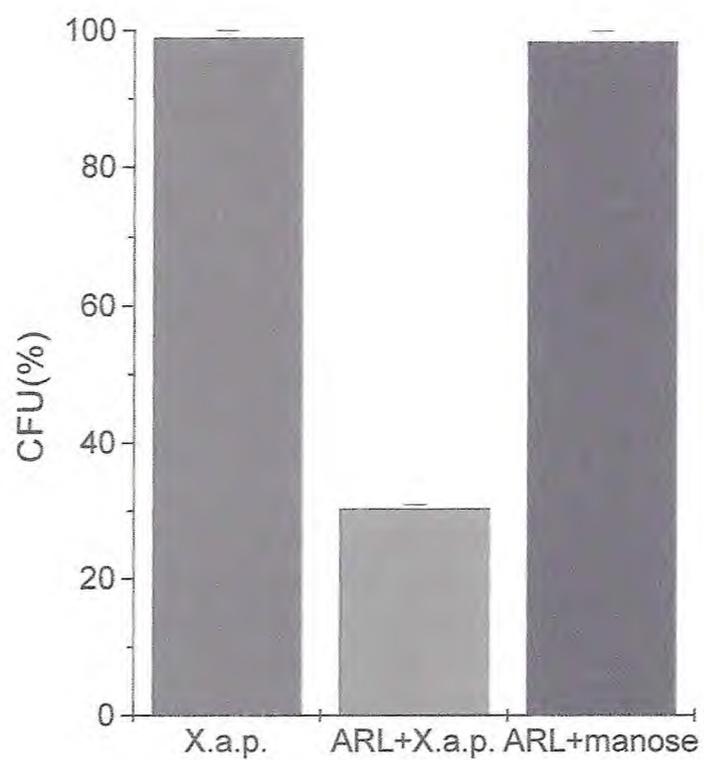


Figura 12 - Efeito antibacteriano induzido por lectina de sementes de *A. surinamensis* em *Xanthomonas axonopodis* pv. *Passiflorae*.

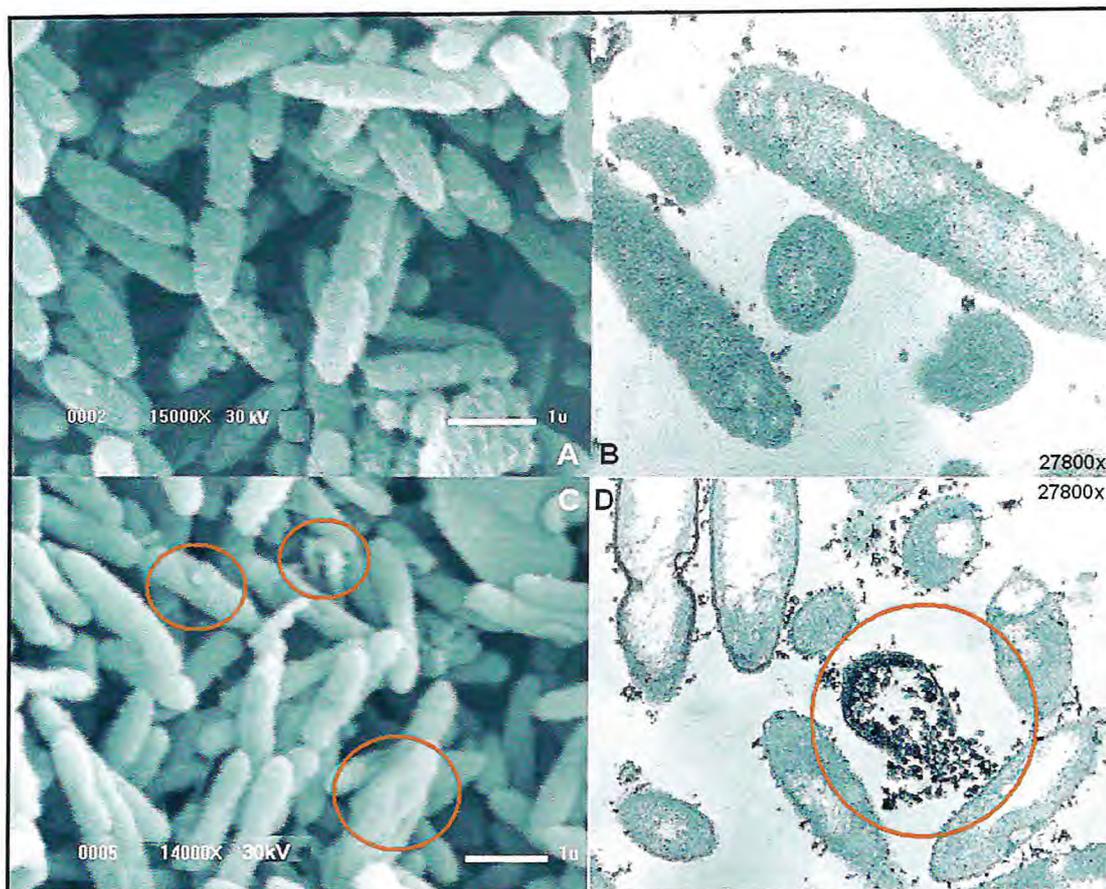


Figura 13 – Microscopia eletrônica de varredura e de transmissão. **A.** Controle de *Xanthomonas axonopodis* pv. *Passiflorae* (MEV); **B.** Controle de *X.axonopodis* pv. *Passiflorae* (MET); **C.** *X.axonopodis* pv. *passiflorae* incubada 1h à 37°C com a lectina *Andira surinamensis* (ASL)(MEV); **D.** *X.axonopodis* pv. *passiflorae* após 1h de incubação à 37°C com *A. surinamensis* (MET).

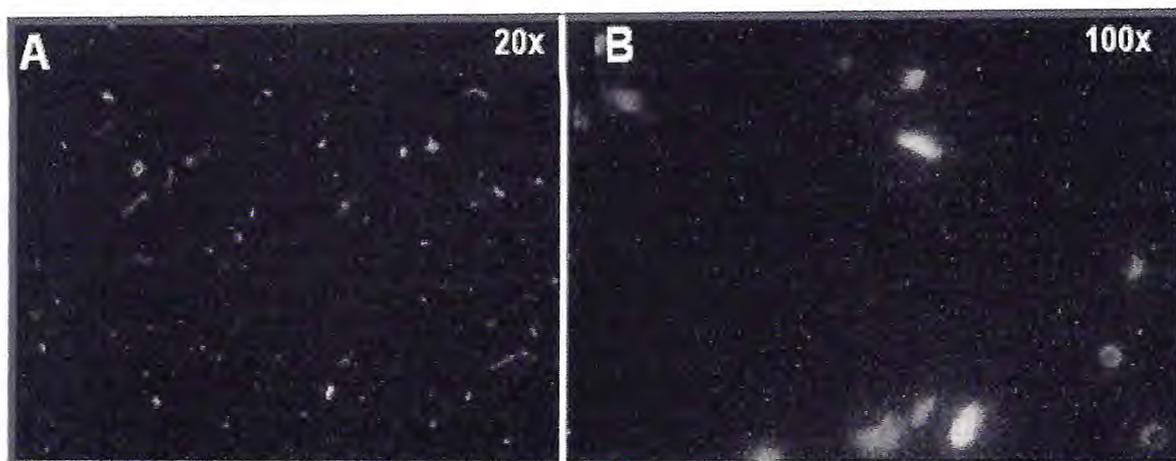


Figura 14 - A, B. *X.axonopodis* pv. *passiflorae* incubada por 1h à 37°C com a lectina *Andira surinamensis* marcada com fluoresceína nos aumentos de 20x e 100x respectivamente

| | |
|------------------------------|-------------------------------------|
| Seqüência Minoritária | ATQDSFTAEEFDY PNTNKGD PYY |
| Seqüência Majoritária | ATSDSFAAEEFDY PNTNKGD PYYHKGDVNSIRS |

Figura 15 - Seqüências N-terminal minoritária e majoritária da lectina de *Andira surinamensis*.

```

A.surinamensis (SM) ATQDSFTAEEFDYTPN-----TNKG-----DP-----YY-
----- 24
V.macrocarpa
SEVVSFSFTKFNPNPKDIIILQGDALVTSKGKQLTKVKDGKPVDSLGRALYAAPIHIWD 60
      :  ** :  *:. *:          *.**          .*          *

A.surinamensis (SM) -----
-----
V.macrocarpa
DSTDRVASFATSFSFVVEAPDESKTADGIAFFLAPPDTQPQKGGFLGLFNDSNKSIQTV 120

A.surinamensis (SM) -----
-----
V.macrocarpa
AVEFDTFSTWDP SARHIGINVNSIESMKYVKWGWENGVANVYISYEASTKTLTASLTY 180

A.surinamensis (SM) -----
-----
V.macrocarpa
PSNATSYIVSANVDLKSALPEWVRVGFSAATSGLSRDHVETHDVLDSFTSTLQAPSDDSN 240

A.surinamensis (SP) ATSDSFAAEEFDYTPN--TNKGDYYPH-KGK-DVNSIRS-----
----- 35
V.macrocarpa
SEVVSFSFTKFNPNPKDIIILQGDALVTSKGKQLTKVKDGKPVDSLGRALYAAPIHIWD 60
      :  ** :  *:. *:          :**.   *** :.:.:.

A.surinamensis (SP) -----
-----
V.macrocarpa
DSTDRVASFATSFSFVVEAPDESKTADGIAFFLAPPDTQPQKGGFLGLFNDSNKSIQTV 120

A.surinamensis (SP) -----
-----
V.macrocarpa
AVEFDTFSTWDP SARHIGINVNSIESMKYVKWGWENGVANVYISYEASTKTLTASLTY 180

A.surinamensis (SP) -----
-----
V.macrocarpa
PSNATSYIVSANVDLKSALPEWVRVGFSAATSGLSRDHVETHDVLDSFTSTLQAPSDDSN 240

```

Figura 16 - Alinhamento das seqüências N-terminais majoritária e minoritária na lectina de sementes de *Andira surinamensis* com a seqüência de aminoácidos da lectina de *Vatairea macrocarpa*.

6. DISCUSSÃO

O isolamento da lectina de sementes de *Andira surinamensis* foi realizado por cromatografia de afinidade em coluna de Agarose-manose, conforme mostrado na Figura . As lectinas de sementes de *Vatairea macrocarpa* (CAVADA *et al.*, 1998; CALVETE *et al.*, 1998) e de *Lonchocarpus sericeus* (dados não publicados), embora pertencentes à mesma tribo Dalbergieae que *Andira surinamensis*, apresentam especificidade por galactose e N-acetil-glicosamina, respectivamente, o que já torna esta tribo extremamente interessante. De fato, é extremamente raro uma tribo do reino vegetal, reunindo espécies extremamente relacionadas, apresentar lectinas com especificidades completamente diferentes como neste caso. Por outro lado, casos como o da espécie de *Vicia cracca* (Leguminosae, Papilionoideae, Viceae), que apresenta lectinas na semente e nas raízes com especificidade completamente diferentes, já têm sido relatados (BAUMANN *et al.*, 1979), mas situações de espécies extremamente próximas, como as da tribo Dalbergieae, apresentarem lectinas com especificidades completamente diferentes, merecem estudos estruturais mais detalhados. É importante ressaltar que o perfil eletroforético da lectina de sementes de *Andira surinamensis*, apresentando diferentes bandas protéicas (Figura 9), parece ser típico das lectinas da tribo Dalbergieae, uma vez que padrões semelhantes foram observados para as lectinas de sementes de *Vatairea macrocarpa* (CAVADA *et al.*, 1996; CALVETE *et al.*, 1998) e de *Vatairea guianensis* (ISIDRO, 2002). No caso da lectina de sementes de *Vatairea macrocarpa*, o seu sequenciamento mostrou que, de fato, esta lectina sofre um processamento pós-tradução fazendo com que a lectina nativa seja composta de uma mistura de cadeia alfa intacta com dois pontos de glicosilação, cadeia alfa intacta com um ponto de glicosilação e fragmentos desta cadeia alfa, todos fazendo parte efetivamente da lectina biologicamente ativa (Figura 2). Por outro lado, até o estabelecimento da estrutura

primária da lectina de sementes de *Vatairea macrocarpa*, mostrando a presença de processamento pós-tradução e de fragmentos biologicamente ativos, se acreditava que, entre as leguminosas, isto só ocorresse com lectinas de espécies da tribo Phaseoleae (Figura), como anteriormente mostrado para as lectinas de sementes de *Canavalia ensiformis* (AGRAWAL *et al.*, 1967), de *Canavalia brasiliensis* (SANZ-APARICIO *et al.*, 1997), de *Cratylia floribunda* (CAVADA *et al.*, 1998) e de *Dioclea guianensis* (WAH *et al.*, 2001). Efetivamente, saber se todas as bandas protéicas que aparecem em PAGE-SDS da lectina de sementes de *Andira surinamensis* fazem parte efetivamente da proteína biologicamente ativa, somente o estabelecimento da estrutura tridimensional da mesma permitirá responder. Além disto, o conjunto de resultados obtidos até agora com a lectina de sementes de *Andira surinamensis* não são ainda suficientes para se afirmar se esta lectina sofre ou não processamento pós-tradução. Entretanto, se após o estabelecimento da estrutura primária desta lectina, isto ficar demonstrado, aumenta o interesse pelas lectinas desta tribo como uma família de proteínas extremamente interessante a ser analisada.

O coeficiente de extinção para a lectina de sementes de *Andira surinamensis* foi de $E_{(1\text{ cm}, 1\%)}$ = 20,04 sugerindo que a lectina possui um teor elevado de aminoácidos aromáticos. Este coeficiente é significativamente superior aquele determinado [$E_{(1\text{ cm}, 1\%)}$ = 5,6, (CAVADA *et al.*, 1998)] para a lectina da mesma tribo Dalbergieae purificada de sementes de *Vatairea macrocarpa*. Apesar de ambas as lectinas apresentarem composições de aminoácidos semelhantes, e serem ricas em asparagina/ácido aspártico, alanina, serina e treonina, a posição dos aminoácidos aromáticos deve ser diferenciada entre as mesmas para ocasionar um baixo coeficiente de extinção molar na lectina de sementes de *Vatairea macrocarpa* e um alto coeficiente de extinção molar na lectina de sementes de *Andira surinamensis*

Do ponto de vista de estrutura primária, ao se comparar tanto a seqüência majoritária N-terminal (SP) como a seqüência minoritária N-terminal (SM) da lectina de sementes de *A. surinamensis* com a cadeia α principal da lectina de sementes de *Vaitarea macrocarpa*, obtêm-se um alto grau de similaridade, além, obviamente, do fato de que a presença de duas seqüências N-terminais altamente similares indica a existência de isolectinas como já demonstrado para a lectina de sementes de *V. macrocarpa* (CALVETE *et al.*, 1998).

Algumas aplicações em modelos biológicos tem sido descritas na literatura para lectinas das mais variadas especificidades (ASSREUY *et al.*, 1997, ANDRADE *et al.*, 1999, BARBOSA *et al.*, 2001, ALENCAR *et al.*, 2002) sendo uma área da pesquisa com excelentes perspectivas. A lectinas de sementes de *A. surinamensis* foi capaz de inibir o crescimento de uma bactéria gram negativa (*Xanthomonas axonopodis* pv. *Passiflorae*) possivelmente por se ligar a membrana bacteriana, o que pode ser constatado facilmente nos estudos de microscopia de fluorescência, e induzir modificações nessa que desestabilizam a estrutura bacteriana como a coagulação citoplasmática e a ruptura de membrana vista nos estudos de microscopia eletrônica de transmissão. Este efeito é lectínico, visto que o açúcar inibidor desta lectina, a manose, foi capaz de reverter significativamente esta atividade.

7. CONCLUSÃO

O presente trabalho relata a purificação e a caracterização química, físico-química e biológica parcial de uma nova lectina manose-específica de sementes de *Andira surinamensis* (família: Leguminosae; sub-família: Papilionoideae; tribo: Dalbergieae). Esta nova lectina, apesar de especificidade diferente aparenta ser semelhante a outras lectinas da mesma tribo, como a lectina de sementes de *Vatairea macrocarpa*, de *Vatairea guianensis* e de *Lonchocarpus sericeus*.

8. REFERÊNCIAS

- AINOUZ, I.L. & SAMPAIO, A.H. (1991). Screening of Brazilian Marine Algae for Hemagglutinins. **Botanica Marina**, **34**: 211-214.
- AINOUZ, I.L.; SAMPAIO, A.H.; BENEVIDES, N.M.B.; FREITAS, A.L.P.; COSTA, F.H.F.; CARVALHO, PINHEIRO-JOVENTINO, M.R. (1992). Agglutination of enzyme treated erythrocytes by brazilian marine algal extracts. **Botanica Marina**, **35**: 475-479.
- ALEKSIDZE, G.Y.; GAIDAMASHVILI, M.V. & SANADZE, G.A. (1991). Isolation and some properties of triticale leaf chloroplasts thylacoid lectin. **Soobshch. Akad. Nauk. Gruz.**, **142(1)**:133-136.
- ALLEN, A.K. & NEUBERGER, A. (1973). The purification and properties of the lectin from potato tubers, a hydroxiprolin-containing glycoprotein. **Biochem. J.**, **135**: 307-314.
- ALENCAR, VBM; MELO, SC; ALBUQUERQUE, KF; FIGUEIREDO, IST; TUPINAMBÁ, DD; FREITAS, BT; ALENCAR, NMN; SAMPAIO, AH; RIBEIRO, RA; AND CAVADA, BS. Pro-Inflammatory Effect Of Galactose Binding Lectin Isolated From *Caesalpinia Echinata* Lam Seeds. The Electronic Lectin Journal, Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry. Contents of Volume 16, 2002
- ANDRADE, J.L.; ARRUDA, S.; BARBOSA, T.; PAIM, L; RAMOS, M.V., CAVADA, B.S., BARRAL-NETTO, M. Lectins-induced Nitric oxide production. Cellular Immunology, v. 194, p. 98-102, (1999)
- ASSREUY, A.M.S., SHIBUYA, M.D., MARTINS, G.J., DE SOUZA, M.L.P., CAVADA, B.S., MOREIRA, R.A., OLIVEIRA, J.T.A., RIBEIRO, R.A., FLORES, C.A. Anti-inflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from Brazilian beans. *Mediators of Inflammation*, **6**: 201-210. 1997.
- ATTA, A.M.; BARRAL-NETTO, M.; PEIXINHO, S. & SOUSA-ATTA, M.L.B. (1989), Isolation and functional characterization of a mitogenic lectin from the marine sponge. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, **22**: 379-385.

- BAETHGEN, W. E. & ALLEY, M. M. (1989) A manual colorimetric procedure for measuring ammonium nitrogen in soil and plant Kjeldahl digests. **Commun. In Soil Sci. Plant Anal**, **20** (9 e 10) 961-969.
- BARBOSA, T.; ARRUDA, S. CAVADA, B.S., GRANGEIRO, T.B., FREITAS, L.A.R., BARRAL-NETTO, M. In vivo lymphocyte activation and apoptosis by lectins of the Diocleinae subtribe. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Vol 96(5): 673-678. 2001.
- BAUMOUM, C., RUDIGER, H. & STROSBERG, A.D. (1979) A comparison of the two lectins from *Vicia cracca*. **FEBS LETT.**, **102**, 216-218.
- BENTHAM, G. **Genera Plantarum**. (1865) London: Bentham and J.D. Hooker, v.1.
- BEZOUSKA, K., TABOURSKY, O., DUBRYCHT, J., POSPUSIL, M. & KOCOUREK, J. (1990) Identification of porcine lymphocyte membrane lectins as possible NK cell receptors using new derivatives of N-linked glycoproteins. In: KOCOUREK, J. & FREED, D.L.J. Eds: **Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry**. Vol 7: 207-215.
- BRADFORD, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**: 248-254.
- BROEKAERT, W.F.; NSIMBA-LUBAKY, M.; PEETERS, B & PEUMANS, W.J. (1984). A lectin from elder (*Sambucus nigra* L.) bark. **Biochemistry J.**, **221**: 163-169.
- BROEKAERT, W.F.; ALLEN, A.K. & PEUMANS, W.J. (1987). Separation and partial characterization of isolectinas with different subunits compositions from *Datura stramonium* seeds. **FEBS Letters**, **220(1)**: 116-120.
- BOISSEAU, C.; CAUSSE, H.; MOISAND, A.; PERE, D.; CAVADA, B.S. & ROUGÉ, P. (1984). Localization and biosynthesis of *Lathyrus ochrus* seed lectin. In: ARNAUD, P.; BIENVEN, J. & LAURENT, P. Eds: **MARKERS PROTEINS IN INFLAMATION**, **2**: 651-654.

- CALVETE, J. J., SANTOS, C. F., MANN, K., GRANGEIRO, T. B., NIMTZ, M., CAVADA, B. S. Primary structure and posttranslational processing of *Vaitarea macrocarpa* seeds lectin. *J. Protein Chem.*, 17:545-547, 1998a.
- CALVETE, J. J., SANTOS, C. F., MANN, K., GRANGEIRO, T. B., NIMTZ, M., URBANK, C., CAVADA, B. S. Amino acid sequence, glycan structure, and proteolytic processing of the lectin of *Vaitarea macrocarpa* seeds. *FEBS Letters*, 425:286-292, 1998b.
- CAMMUE, B.P.; PEETERS, B. & PEUMANS, W.J. (1985^b). Isolation and partial characterization from winter-aconite (*Eranthis hyemalis*) roots tuber. **Biochem. J.**, 227: 949-955.
- CARRINGTON ET, D.M.; AUFFRET, A.; HANKE, D.E. Polypeptide ligation occurs during pos-translational modification of concanavalin A. *Nature*, 313: 64-67, 1985.
- CAVADA, B.S., ROUGE, P. (1985) Partial characterization of the two isolectins isolated from *Lathyrus cicera* L. seeds. **ARQUIVOS DE BIOLOGIA E TECNOLOGIA**, Brasil, 28(3), 421-430.
- CAVADA, B.S.; GRANGEIRO, T.B.; RAMOS, M.V.; CORDEIRO, E.F.; OLIVEIRA, J.T.A. & MOREIRA, R.A. (1996^a). Isolation and partial characterization of a lectin from *Dioclea rostrata* Benth seeds. **Rev. Bras. De Fisiol. Veg.**, 8(1): 31-36.
- CAVADA, B.S.; RAMOS, M.V.; CORDEIRO, E.F.; GRANGEIRO, T.B.; OLIVEIRA, J.T.A.; CARVALHO, A.F.F.U. & MOREIRA, R.A. (1996^b). Purification and partial characterization of a lectin from *Dioclea virgata* Benth seeds. **Rev. Bras. de Fisiol. Veg.**, 8(1): 37-42.
- CAVADA, B.S.; MOREIRA-SILVA, L.I.M; GRANGEIRO, T.B.; SANTOS, C.F.; PINTO, V.P.T.; BARRAL-NETO, M.; ROQUE-BARREIRA, M.C.; GOMES, J.C.; MARTINS, J.L.; OLIVEIRA, J.T.A. & MOREIRA, R.A. (1996^c). Purification and biological properties of a lectin from *Canavalia bonariensis* Lind. seeds. In: Van Driessche, E., Fisher, J., Beeckmans, S. & Bog-Hansen, T.C. Eds: **Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry**. Vol 11, pp. 74-80. Textop, Denmark.

- CAVADA, B. S., SANTOS, C. F., GRANGEIRO, T. B., MOREIRA DA SILVA, L. I. M., CAMPOS, M. J. O, DE SOUSA, F. A. M. & CALVETE, J. J. (1997) Isolation and partial characterization of a lectin from *Parkia platycephala* Benth seeds. *Physiol. Mol. Biol. Plants*, 3: 109-115.
- CAVADA, B. S., SANTOS, C. F., GRANGEIRO, T. B., NUNES, E. P., SALES, P. V., RAMOS, R. L., DE SOUSA, F. A, CRISOSTOMO, C. V., CALVETE, J. J. Purification and characterization of a lectin from seeds of *Vaitarea macrocarpa* Duck. *Phytochemistry*, 49, 675-680, 1998a.
- CAVADA, B.S., NOGUEIRA, N.A.P., FARIAS, C.M.S.A., GRANGEIRO, T.B., RAMOS, M.V., THOLE, H.H., RAIDA, M., ROUGE, P., CALVETE, J.J. (1999) Primary structure and kinetic interaction with glycoprotein of the lectin from seeds of *Cratylia floribunda*. *Protein and Peptide Letters*, 6(1), 27-34.
- CAVADA, B. S., MADEIRA, S. V. F., CALVETE, J. J., SOUSA, L. A. G., BOMFIM, L. R., DANTAS, A. R., LOPES, M. C., GRANGEIRO, T. B., FREITAS, B. T., PINTO, V. P. T., LEITE, K. B. & RAMOS, M. V. (2000) Purification, chemical and immunochemical properties of a new lectin from Mimosoideae (*Parkia discolor*) prep. *Biochem. Biotech.*, 30:271-280.
- DEPIERREUX, C., KANG, H.C., GUERIN, B., MONSIGNY, M. & DELMOTTE, F. (1991). Characterization of an *Agrobacterium tumefaciens* lectin. **Glycobiology**, 1(6): 643-649.
- DESAI, P.R. & SPRINGER, G.F. (1972). Eal serum anti-human blood group H(O) protein. **Meth. Enzymol.**, 28: 383-388.
- DIAZ, C.L.; LEMS-VAN KAK, P.; CAN DER SCHAAL, I.A.M. & KIJNE, J.W.(1984). Determination of pea (*Pisum sativum*) root lectin .using an enzyme-linked immunoassay. **Planta**, 161: 302-307.
- DORLAND, L.; VAN HALBEEK, H.; VLIEGENTHART, F. G. Primary structure of the carbohydrate chain of soybean agglutinin. **J. Biol. Chem.** 256(15): 7707-7711, 1981.
- FERREIRA, R.R.; CAVADA, B.S.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, J.T.A.; GOMES, J.C. Characteristics of the histamine release from hamster cheek pouch mast cells

- stimulated by lectins from Brazilian beans and concanavalin A. **Inflamm. Res.** **45**:442-447, 1996.
- FLEISHMANN, G.; MAUDER, I.; ILLERT, W. & RUDIGER, H. (1985). A one-step procedure for isolation and resolution of the *Phaseolus vulgaris* isolectins by affinity chromatography. **Biol. Chem.**, **366**: 1029-1032.
- GARTNER, T.K. & OGILVIE, M.L. (1984). Isolation and characterization of three Ca²⁺ dependent beta-galactoside-specific lectins from snake venoms. **Biochem. J.**, **224**: 301-307.
- GLICK, G.D., TOOGOOD, P.L., WILEY, D.C., SKEHEL, J.J. & KNOWLES, J.R. (1991). Ligand recognition by influenza virus. The binding of bivalents sialosides. **The J. Biochem. Chem.**, **266**(35): 23660-23669.
- GOLDSTEIN, I.J.; PORETZ, R.D. Isolation, physicochemical characterisation, and carbohydrate-binding specificity of lectins. Em LINER, I. E.; SHARON, N. and GOLDSTEIN, I. J. eds **The Lectins: Properties, Function and Applications in Biology and medicine** 600pp. Academic Press, New York, 1986.
- GRANGEIRO, T.B., OLIVEIRA, J.T.A., MOREIRA, R.A. & CAVADA, B.S. (1990^a) Atividade hemaglutinante em sementes de *Dioclea rostrata* Benth. **Acta Bot. Brás.**, **4**(2), 61-68.
- GRUBHOFFER, L. & MATHA, V. (1991). Characteristics of a new L-fucose and N-acetyl-D-galactosamine specific lectin from the integument of *Galleria mellonella* larval. **Comp. Biochem, Physiol.**, **B: 100** b(1): 73-76.
- HAMMARSTROM, S. (1972). Snail (*Helix pomatia*) agglutinin. **Meth. Enzymol.**, **28**: 368-383.
- HANKINS, C.; KINDINGER, J.I. & SHANNON, L.M. (1988). The lectins of *Sophora japonica*. II. Purification, properties and N-terminal amino acid sequences of five lectins from bark. **Plant Physiol.** **86**: 67-70.
- HERMAN, E.M.; SHANNON, L.M.; CHRISPEELS, M.J. Concanavalin A is synthesized as glycoprotein precursor. **Planta**, **165**:23-29, 1985.

- HEYWOOD, V.H. (1971) The Leguminosae – a systematic preview. InÇ J.B. Harbone, D. Boulter and B.L. Turner, eds. **Chemotaxonomy of the Leguminosae**. London; Academic Press, P. 1-29.
- HIGGINS, T.J.V.; CHANDLER, P.M.; ZURAWSKI, G.; BUTTON, S.C.; SPENCER, D. The biosynthesis and primary structure of pea seed lectin. **J. Biol. Chem.**, **258(15)**:9544-9549, 1983.
- HORI, K.; MIYAZAWA, K.; FUSETANI, N.; HASHIMOTO, K. & ITO, K. (1986). Hypnins low-molecular weight peptidic agglutinins isolated from a marine red alga, *Hypnea japonica*. **Biochimica et Biophysica Acta**, **873**: 228-236.
- ISIDRO, R. Purificação, caracterização bioquímica e biológica e especificidade fina da lectina galactose específica (VGL) de sementes de *Vatairea guianensis* Aublet. 2002. 120 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Universidade Federal do Ceará.
- KAWAGISHI, H.; ABE, Y.; NAGATA, T.; KIMURA, A. & CHIBA, S. (1991) A lectin from mushroom *Pholiota aurivella*. **Agric. Biol. Chem.**, **55(10)**: 2485-2489.
- KELLENS, J.T.C. PEUMANS, W.J. (1991) Biochemical and serological Comparison of lectins from different anastomosis groups of *Rhizoctonia solani*. **Mycol. Res.**, **95(10)**: 1235-1241.
- KONAMI, Y.; YAMAMOTO, K. & OSAWA, T. (1991^a) Purification and characterization of two types of *Cystisus sessilifolius* Anti-H(O) lectins by affinity chromatography. **Biol. Chem.**, **372**: 103-111.
- KONAMI, Y.; YAMAMOTO, K. & OSAWA, T. (1991^b) Purification and characterization of a new type lactose-binding *Ulex europaeus* lectin by affinity chromatography. **Biol. Chem.**, **372**: 95-102.
- LAEMMILI, U. K. (1970) Cleavage of structural protein during the assembly of the bacteriophage t₄. *Nature*, **227**: 680-685.
- LAKHTIN, V. M., Molecular Organization of Lectins (A Review). *Molecular Biology*, **28(2)**:157-177, 1994.
- LEWIS, G.P., (1987) Royal Botanic Gardens, Kew 369 pp Legumes of Bahia.

- LIENER, I.E., SHARON, N & GOLDSTEIN, I.J. (1986) **The lectins: Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine**, 600 pp., Academic Press, New York.
- MANN, B.J., TORIAN, B.E., VEDVICK, T.S. & PETRI, W.A.J. (1991) Sequence of a cystein-rich galactose-specific lectin of *Entamoeba histolytica*. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, **88(8)**: 3248-3252.
- MATTOS, N.F. & OLIVEIRA, F., 1979. *Loefgrenia* 59:1-12 O gênero *Periandra* (Leg.).
- MISHKIND, M.; KEEGSTRA, K. & PALEVITZ, B.A. (1980) Distribution of wheat germ agglutinin in young wheat plants. **Plant Physiol.**, **66**: 950-955.
- MORAES, S.M.D.; CAVADA, B.S.; MOREIRA, R.A.; BARREIRA, C.R.; OLIVEIRA, R.S.; PINTO, V.P.T. AND OLIVEIRA, J.T.A. (1996). Purification and properties of a lectin from *Erythrina velutina* f. *aurantiaca* (Rild.) Krukoff. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, **29**: 77-985.
- MOREIRA, R.A. & CAVADA, B.S. (1984). Lectin from *Canavalia brasiliensis* (Mart.). Isolation, characterization and behaviour during germination. **Biologia Plantarum**, **26(2)**:113-120.
- MOREIRA, R.A. & OLIVEIRA, J.T.A. (1983^a). Comparative studies of seed proteins of the genus *Artocarpus* with respect to lectins. **Biologia Plantarum**, **25(5)**: 336-342.
- MOREIRA, R.A. & OLIVEIRA, J.T.A. (1983^b). Lectins from genus *Artocarpus*. **Biologia Plantarum**, **25(5)**: 343-348.
- MOREIRA, R. A. & PERRONE, J. C. (1977) Purification and partial characterization of a lectin from *Phaseolus vulgares*. **Plant Physiol.**, **59**: 783-787.
- MOREIRA, R.A. & AINOUZ, I.L. (1981) Lectins from seeds of jack fruit (*Artocarpus integrifolia* L.): Isolation and purification of two isolectinas from the albumin fraction. **Biologia Plantarum**, **23(3)**: 186-192.
- MOREIRA, R.A., BARROS, A.C.H., STEWART, J.C. & PUSZTAI, A. (1983^c) Isolation and characterization of a lectin from the seeds of *Dioclea grandiflora* (Mart), *Planta* (Heidelb.) v.158, p.63-69.

- MOREIRA, R.A., AINOZ, I.L.; OLIVEIRA, J.T.A.; CAVADA, B.S. (1991^a). Plant lectins, chemical and biological aspects. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **86(II)**: 211-218.
- NEWBURG, D.S. & CONCON, J.M. (1985). Lectins in rice and corn endosperm. **J. Agric. Food Chem.**, **33**: 685-687.
- ODA, Y. & MINAMI, K. (1986). Isolation and characterization of a lectin from tulip bulbs, *Tulipa gesneriana*. **Eur. J. Biochem.**, **159**: 239-245.
- OLIVEIRA, J.T.A.; CAVADA, B.S. & MOREIRA, R.A. (1991). Isolation and partial characterization of a lectin from *Cratylia floribunda* Mart. Seeds **Rev. Bras. Bot.**, **14**:61-66.
- PEASANT, C.A. & KORNFELD, S.J. (1972). **J. Biol. Chem.**, **247**: 6937-6945. Citado por LIENER *et al*, 1986.
- PEREZ, G., HERNÁNDEZ, M. & MORA, E. (1990) Isolation and characterization of a lectin from the sedes of *Dioclea lehmanni*. *Phytochemistry*, v.29, n.6, p.1745-1749.
- PEUMANS, W.J.; DE LEY, M. & BROEKAERT, W.F. (1984). An unusual lectin from stinging nettle (*Urtica dioica*) rhizomes. **FEBS Letters**, **177**: 99-103.
- PEUMANS, W.J.; DE LEY, m.; STINISSEN, H.M. & BROEKAERT, W.F. (1985^a). Isolation and partial characterization of a new lectin from seeds of the greater celandine (*Chelidonium majus*). **Plant Physiol.** **78**:379-383.
- PEUMANS, W.J.; NSIMBA-LUBAKI, M. PEETERS, B. & BROEKAERT, W.F. (1985^b). Isolation and partial characterization of a lectin from ground elder (*Aegopodium podagraria*) rizoms. **Planta**, **164**: 75-82.
- PEUMANS, W.J.; ALLEN, A.K. & CAMMUE, B.P.A. (1986) A new lectin from meadow saffron (*Colchicum autumnale*). **Plant Physiol.**, **82**: 1036-1039.
- PEUMANS, W.J., VAN DAMME, E.J.M (1995^a) Lectins as plants defense proteins. **Plant Physiol.**, **109**, 347-352.
- PEUMANS, W.J. and VAN DAMME, E.J.M. (1995^b) The role of lectins in plant defense. **Histochem. J.**, v.27, p.253-271.

- PHOLLIL, R.M., RAVEN, P.H., STIRTON, C.H. (1981) Evolution and sistematic of the Leguminosae. InÇ Phollil & Raven Eds. **Advances in legume sistematics**. Richmond: part I, 425 p.
- POGORELAYA, N.F.; KAPLYA, A.V.; BRAION, A.V. & KINDRUK, N.L. (1991). Lectin activity of protein-containing extracts from apple tree buds in winter. **Fiziol. Biokhim. Kul't. Rast.**, **23(6)**: 594-597.
- PRIGENT, M.J. & BOURRILLON, R. (1981) Purification and characterization of *Vicia graminea* lectin. Interaction of labeled lectin with native and enzyme-modified human M and N erythrocytes. In BOG-HANSEN, T.C. Eds. **LECTINS, BIOLOGY, BIOCHEMISTRY, CLINICAL BIOCHEMISTRY, 1** , 101-109.
- RAIKHEL, N.V. & LIENER, D.R. (1991). Expression and regulation of lectin genes in cereals and rice. **Developmental Genetics**, **12**: 255-260.
- RAMOS, M. V.; MOTA, D. M.; TEIXEIRA, C. R.; CAVADA, B. S.; MOREIRA, R. A. (1998) Isolation and partial characterization of highly toxic from *Abrus pulchellus* seeds. **Toxicon**, **36(3)**: 477-484, (1998).
- ROGERS, D.J.; BLUNDEN, G. & EVANS, P.R. (1977). *Ptilota plumose*, A new source of a blood group B specific lectin. **Medic Laboratory Sciences**, **34**: 193-200.
- ROGERS, D.J.; FISH, B. & BARWELL, C.J. (1990). Isolation and properties of lectins from two red marine algae: *Plumaria elegans* and *Ptilota serrata*. In: KOCOUREK, J. & FREED, D.L.J. Eds: **Lectins, Biology, Biochemistru, Clinical Biochemistry**, Vol. **7**: 49-52.
- ROUGE, P. & CAVADA, B.S. (1984) Isolation and partial characterization of two isolectins from *Lathyrus ochrus* (L.) DC. Seeds. **Plant Science Letters**, **37**, 21-27.
- ROUGE, P., RICHARDSON, M., RANFAING, P., YARWOOD, A. & CAVADA, B.S. (1987^b) Single- and two-chain legume lectins as phylogenetic markers of speciation. **Biochemical Systematics and Ecology**, **15(3)** 341-348.

- SAFFER, L.D. & PETRY, W.A.J. (1991) Role of the galactose lectin *Entamoeba histolytica* in adherence-dependent killing of mammalian cells. **Infect. Immun.**, v.59, n.12, p.4681-4683.
- SAMPAIO, A.H. (1997). Lectins from *Ptilota* and *Ulva* species. 198pp. Tese de Doutorado apresentada a Universidade de Portsmouth, Inglaterra. (1997).
- SAMPAIO, A.H. (1992). Hemaglutininas de algas marinhas do nordeste brasileiro e isolamento da hemaglutinina de *Hypnea musciformis* (WULFEN) LAMOUREUX. Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, 74pp., Fortaleza.
- SHARON, N. (1987) Bacterial Lectins, Cell-Cell Recognition and Infections Disease. **FEBS Lett.** **217 (2)**: 145-157.
- SHARON, N. and LIS, H. (1989). Lectin as Cell Recognition Molecules. **Science**, v.246, n. 4927, p.227-234.
- SHARON, N. and LIS, H. (1989^a). LECTINS, 126 pp. Chapman and Hall. London.
- SHARON, N. & LIS, H. (1989^b). A century of lectin research (1888-1988). **TIBS**, **12**: 488-491.
- SHARON, N. & LIS, H. (1990). Legume lecins – a large family of homologous proteins. **FASEB J.**, **4**:3198-3208.
- SHEN, Z.W.; SUN, C.; ZHU, Z.; TANG, X. & SHEN, R. (1984). Purification and properties of rice germ lectin. **Can. J. Biochem. Cell. Biol.**, **62(10)**: 1027-1032.
- TALBOT, C.F. & ETZLER, M.E. (1978). Isolation and characterization of a protein from leaves and stems of *Dolichos biflorus* that cross reacts with antibodies to the seed lectin. **Biochemistry**, **17(8)**: 1474-1478.
- TOGUN, R.A.; ANIMASHAUN, T.; BENZIE, C.R. & JOHN, E.K. (1988). Purification and characterization of a mitogenic lactose-binding lectin from *Tetracarpidium conophorum* seeds. In: BOG-HANSEN, T.C. & FREED, D.L.J. Eds. **Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry**, vol. **6**: 369-372.

- TRIEBOLD, H. O. (1946). Quantitative Analysis with applications to agricultural and food products. 331 pp., D. Van Nostrand Co., New York.
- UENO, M.; OGAWA, H.; MATSUMOTO, I. & SENO, N. (1991). A novel mannose-specific and sugar specifically aggretable lectin from the bark of the jaanese pagoda tree (*Sophora japonica*). **The J. Biol. Chem.**, **266(5)**: 3146-3153.
- UMETSU, K., YAMASHITA, K. & SUZUKI, T. (1991). Purification and carbohydrate binding specificities of a blood type B binding lectin from hemolymph of a crab (*charrybdis japonica*). **J. Biochem.**, **109(5)**: 718-721.
- UNE, S. Isolation and characterization of lectin from broccoli (1991). **Nippon Kasei Gakkaishi**, **42(7)**: 603-609.
- UTARABHAN, P. & AKKAYANONT, P. Purification af a llectin from *Parkia javanica* beans. *Phytochemistry*, **38(2)**:281-285, 1995.
- VAN DAMME, E.J.M. & PEUMANS, W.J. (1990). Isolectins in Narcissus: complexity, inter- and intraspecies differences and developmental control. **Physiologia Plantarum**, **79**:1-6.
- VAN DAMME, E.J.M.; ALLEN, A.K. & PEUMANS, W.J. (1987^a). Isolation and Characterization of a lectin with exclusive specificity towards mannose from snowdrop (*Galanthus nivalis*) bulbs. **FEBS Letters**, **215(1)**: 140-144.
- VAN DAMME, E.J.M.; ALLEN, A.K. & PEUMANS, W.J. (1987^b). Leaves or the orchid twayblade (*Listera ovata*) contain a mannose-specific lectin. **Plant Physiol.**, **85**: 566-569.
- VAN DAMME, E.J.M., ALLEN, A.K.; PEUMANS, W.J. (1988). Related mannose-specific lectins from different species of the family *Amaryllidaceae*. **Physiol. Plantarum**, **73**: 52-57.
- VAN DAMME, E.J.M.; GOLDSTEIN, I.J.; PEUMANS, W.J. (1991). A comparative study of mannose-binding lectins from the *Amaryllidaceae* and *Alliaceae*. **Phytochemistry**, **30(2)**: 509-514.

- VAN DAMME, E.J.M., PEUMANS, W.J., BARRE, A. and ROUGÉ, P. (1998). Plant Lectins: A Composite of Several Distinct Families of Structurally and Evolutionary Related proteins with Diverse Biological Roles. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.17, n.6, p.575-692.
- VAN DRIESSCHE, E., SMETS, G., DEJAEGERE, R. & KANAREK, L. (1982) The isolation, further characterization and localization of pea seed lectin (*Pisum sativum* L.). In BOG-HANSEN, T.C. Eds. **LECTINS, BIOLOGY, BIOCHEMISTRY, CLINICAL BIOCHEMISTRY**, 2, 729-741.
- VASCONCELOS, I.M.; CAVADA, B.S.; MOREIRA, R.A. & DE OLIVEIRA, J.T.A. (1991). Purification and partial characterization of a lectin from the seeds of *Dioclea guianensis*. **Journal of Food Biochemistry**, 15: 137-154.
- VOZARI-HAMPE, M.M.; VIEGAS, C.; SAUCEDO, C.; ROSSEDO, S.; MANICA, G.G. & HAMPE, O.G. (1992), A lectin from *Sechium edule* fruit exudates. **Phytochem.**, 11(5): 1477-1480.
- WAH, D A; ROMERO, A; SOL, F Gallego Del; CAVADA, B S; RAMOS, M V; GRANGEIRO, T B; SAMPAIO, A H; CALVETE, J J. Crystal structure of native and Cd/Cd-substituted *Dioclea guianensis* seed lectin. A novel manganese binding site and structural basis of dimer-tetramer association. *Journal of Molecular Biology*, USA, v. 310, n. 4, p. 885-894, 2001.
- YAMADA, Y. & AKETA, K. (1982). Purification and partial characterization of hemagglutinins in seminal plasma of the sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*. **Biochimica et Biophysica Acta**, 709: 220-226.
- YARWOOD, A., RICHARDSON, M., SOUSA-CAVADA, B., ROUGE, P. (1985) The complete amino acid sequences of the beta-1 and beta-2 subunits of the isolectins LoL I and LoL II from seeds of *Lathyrus ochrus* (L.) DC. **FEBS Letters**, 184(1), 104-109.
- YI, L.; WANG, J. & CHEN, H. (1991) Lectin from wild carrot (*Daucus carota* L.) seed. **Shengwu Huaxue Zazhi**, 6: 679-685.

- YU, X.Q. & KANOS, M.R. (2000). Immulectin-2, a lipopolysaccharide-specific lectin from an insect, *Manduca Sexta* is induced in response to gram negative bacteria. **J. Biol. Chem.**, **275(48)**: 37373-37381.
- ZENTENO, E. & CORDOBA, F. (1982). Isolation of two lectins from the cactus *Machaerocereus eruca*. In: BOG-HANSEN, T.C. Eds. **Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry**, vol. 2: 721-728.
- ZENTENO, E.; OCHOA, J.L.; MONTANO, L.F.; DEBRAY, H. & MONTREUIL, J. (1991). *Machaerocereus eruca* cactus isolectins. Purification and characterization. **Plant Science**, **77**: 11-19.
- CAVADA, B S; SANTOS, C F; GRANGEIRO, T B; NUNES, E. P.; SALES, P V P; RAMOS, R L; SOUSA, F. A. M.; CRISOSTOMO, C V; CALVETE, J J. Purification and characterization of a lectin from seeds of *Vaitarea macrocarpa* Duke. *Phytochemistry*, Inglaterra, v. 49, n. 3, p. 675-680, 1998.
- CALVETE, J J; SANTOS, C F; MANN, K; GRANGEIRO, T B; NIMTNZ, N; CAVADA, B S. Primary structure and posttranslational processing of *Vatairea macrocarpa* seed lectin. *Journal of Protein Chemistry*, USA, v. 17, n. 6, p. 545-547, 1998.
- CAVADA, B S; NOGUEIRA, N A P; CAMPOS, M J O; GRANGEIRO, T B; RAMOS, M V; THOLE, H H; RAIDA, M; ROUGÉ, P; CALVETE, J J. Primary structure and kinetic interaction with glycoprotein of the lectin from seeds of *Cratylia floribunda*. *Protein and Peptide Letters*, USA, v. 6, n. 1, p. 27-34, 1999.
- Agrawal BB, Goldstein IJ. Physical and chemical characterization of concanavalin A, the hemagglutinin from jack bean (*Canavalia ensiformis*). *Biochim Biophys Acta*. 1967 Feb 21;133(2):376-9.
- Baumann C, Rudiger H, Strosberg AD. A comparison of the two lectins from *Vicia cracca*. *FEBS Lett*. 1979 Jun 15;102(2):216-8.