



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE MEDICINA DE SOBRAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**MAYRON ALVES DE VASCONCELOS**

***Atividade das lectinas de *Canavalia brasiliensis* e *Canavalia ensiformis* sobre o crescimento “in vitro” de *Rhizobium tropici****

**SOBRAL  
2010**

**MAYRON ALVES DE VASCONCELOS**

**Atividade das lectinas de *Canavalia brasiliensis* e *Canavalia ensiformis* sobre o crescimento “*in vitro*” de *Rhizobium tropici***

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal do Ceará, *campus* Sobral como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

**Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pires dos Santos**

**Co-orientador: Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira**

**SOBRAL  
2010**

---

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre em Biotecnologia.

Aprovada em 25 / 02 / 2010

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Ricardo Pires dos Santos (Orientador)  
Curso de Engenharia da Computação/Núcleo de Biotecnologia de Sobral (NUBIS)  
Campus de Sobral  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Marcos Luiz Pessatti  
Curso de Ciências Biológicas  
Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI)

---

Prof. Dr. Jorge Luiz Martins  
Laboratório de Química Ambiental (QuiAmb-Lab)  
Universidade Federal de Pelotas (UFPEL)

**Ao Senhor dos Senhores,  
Deus.**

---

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por ter concedido a conclusão deste trabalho e por todas as obras realizadas na minha vida;

Aos meus pais, Maria Artemiza Alves de Vasconcelos e Cristovão Markam Oliveira de Vasconcelos, por seus valorosos ensinamentos, por minha formação como pessoa, sem eles nada seria possível; e a minha irmã Samara por tornar a vida familiar sempre agradável;

A minha namorada Gleiciane, por sempre estar do meu lado nas horas mais difíceis, e por ser uma presença constante em minha vida;

Aos companheiros de residência Nara, Isabelle, Rafaela, Paulo, Vanessa e todos que contribuíram para termos um ambiente fraternal;

A Universidade Federal do Ceará, em particular a Faculdade de Medicina de Sobral, por fornecer condições acadêmicas que possibilitaram a conclusão deste estudo;

Ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, pelo empenho na formação científica de seus pós-graduandos;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ricardo Pires dos Santos, que apesar termos formações acadêmicas distintas sempre me orientou da melhor maneira possível, com paciência e fraternidade;

Ao meu co-orientador e amigo Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira por ser um exemplo a ser seguido, por ter participado diretamente do trabalho realizado, além de me conduzir para a pesquisa científica desde minha graduação;

---

Ao amigo e colaborador do projeto Victor Carneiro, pela ajuda incondicional sempre que solicitado, e pela amizade sempre prestada;

Ao amigo Vassiliepi pela participação efetiva no trabalho, e pelas edificantes discussões científicas;

A amiga Cinara pela amizade prestada, pelos momentos de descontração, conversas e por sua ajuda sempre que solicitada;

Ao amigo Luiz Gonzaga pela amizade prestada, por me acompanhar desde minha iniciação científica;

Ao Dr. Fabio Mercante, e ao amigo Cláudio Cunha além de toda a Embrapa Agropecuária Oeste, por generosamente ceder às estipes de rizóbios;

Ao Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas, em particular ao Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada, por sempre ceder generosamente as lectinas e dar subsídios para realizarmos nossas pesquisas;

Aos amigos do Laboratório de Imunologia e Bioquímica de Sobral - LIBS, Thays, Fábio, Fabiano, Togashi, Francisca, Thiago, Mauro, Rafaela, Érica, Elen, Flávio, Janaina e Pedro.

Aos colegas do Núcleo de Biotecnologia de Sobral: Prof. Rodrigo Maranguape, João Garcia, Ricardo Basto, Auxiliadora, Daniel, Jackson, Tatiane, Antonio, Francisco, Anderson, Gisvani, Cintia, Juliane, Monalisa, Marcos, Denise, Daiane e a todos os demais;

Aos colegas de turma: Ticiania, Sâmia, Cynara, Fabiano, Togashi, Fábio, Niedja, Isana e Luís Edmundo, por trilharmos essa longa caminhada da pós-graduação juntos;

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia: André, Benildo, Edson, Gerardo Cristino, Iriana, José Roberto, Ronaldo, Valder, Ricardo Pires.

---

**“Só é útil o conhecimento que nos faz melhores.”**

***Sócrates***

---

## RESUMO

Rizóbios são bactérias gram-negativas que vivem de maneira simbiótica nas raízes de leguminosas induzindo a formação de nódulos. Dentro dos nódulos, essas bactérias, na sua forma endossimbiótica, podem fixar o nitrogênio atmosférico e fornecê-lo para as células da planta hospedeira. Diversas condições ambientais são fatores limitantes para a fixação biológica de nitrogênio e o desenvolvimento do vegetal, como estresse hídrico, salinidade, pH e temperatura. *Rhizobium tropici* CIAT899 é uma estirpe de rizóbio que forma efetiva simbiose com *Phaseolus vulgaris*, esta estirpe mostra ser tolerante a diversos estresses ambientais, incluindo altas temperaturas, ambientes ácidos e de alta salinidade. Lectinas são (glico) proteínas de origem não imune que se ligam especificamente e reversivelmente a carboidratos, ou ainda a glicoconjugados. Devido essa capacidade de reconhecer especificamente carboidratos, lectinas mostram ser uma importante ferramenta de estudo que favorece a interação entre rizóbio e planta hospedeira. Nesse trabalho buscamos demonstrar a atividade das lectinas isoladas de sementes de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) e *Canavalia ensiformis* (ConA) sobre o crescimento “*in vitro*” de *Rhizobium tropici*. Os dados mostraram que a lectina ConBr foi capaz de estimular de maneira significativa o crescimento “*in vitro*” de *Rhizobium tropici*. O efeito encontrado foi revertido na presença do açúcar inibidor (manose), sugerindo uma efetiva atividade lectínica. No entanto a lectina ConA não demonstrou nenhuma atividade sobre o crescimento do microrganismo. A lectina ConBr associada com FITC, como já era esperado, demonstrou interação com a superfície bacteriana, esses resultados foram muito semelhantes aos obtidos com ConA, apesar dessa lectina não demonstrar qualquer atividade sobre o crescimento microbiano de *Rhizobium tropici*. A diferença na atividade biológica destas lectinas, apesar da alta similaridade, provavelmente é devido à diferença estrutural nos seus domínios de reconhecimento de carboidrato.

**Palavras-Chave:** Crescimento bacteriano, fluorescência, lectinas; nitrogênio, rizóbios, sítio de ligação.



---

## ABSTRACT

Rizobia are gram-negative bacteria that lives as symbiotic cells in roots of leguminous inducing the formation of nodules. Inside of these nodules, these bacteria in their endosymbiotic life style, fixate the atmospheric nitrogen and make it available for the cells from the host plant. Different environment conditions are limiting factors for the biological nitrogen fixation and for the plant development, like drought-stressed, salinity, pH and temperature. *Rhizobium tropici* CIAT899 is a rizobia's strain that has effective symbioses with *Phaseolus vulgaris*, this strain shows tolerance to many different environment stress, such as high temperatures, acid environment and high salinity. Lectins are (glico) proteins from non-immune origin that binds specific and reversible to carbohydrates or to glycoconjugates. Due to their capacity of recognizing specific carbohydrates, lectins shows to be an important tool that helps the interaction between rizobia and the host plant. In this work we tried to demonstrate the activity of the lectin isolated from *Canavalia brasiliensis* (ConBr) and *Canavalia ensiformis* seeds on the *in vitro* growth of *Rhizobium tropici*. The data demonstrate that the lectin ConBr was capable of stimulating, in a significant way, the *in vitro* growth of *Rhizobium tropici*. The effect that was found was reverted in the presence of the inhibitory sugar (mannose), suggesting an effective lectin activity. However the lectin ConA didn't show any activity on the growth of the microorganisms. The ConBr-FITC conjugates, as been expected, showed interaction between the bacteria surface, these results were similar with those from ConA, although this lectin doesn't show any activity in the microbial growth of *Rhizobium tropici*. The difference between the biological activities of these similar lectins, probably is due to their structure differences in the carbohydrate binding domain.

Keys-words: Bacterial growth, fluorescence, lectins, nitrogen, rizobia, binding domain.

---

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Representação esquemática do Ciclo do nitrogênio (TAIZ & ZEIGER, 2009).	18
<b>Figura 2</b>	Reação catalisada pelo complexo enzimático da nitrogenase (TAIZ & ZEIGER, 2009).	22
<b>Figura 3</b>	Estrutura geral dos fatores Nod produzidos por rizóbios (SPAINK 2000).	26
<b>Figura 4</b>	Modelo de Dazzo e Hubbell (1975), lectina de trevo promovendo a interação entre <i>Rhizobium trifolii</i> e a parede celular da raiz da planta hospedeira	27
<b>Figura 5</b>	Imagens de <i>Rhizobium trifolii</i> , em raiz de trevo por Microscopia eletrônica de varredura. a) e b) Bactérias ligadas aos pêlos radiculares; c) Superfície do pêlo radicular de trevo (DAZZO <i>et al.</i> , 1985).	28
<b>Figura 6</b>	Progressão do processo de simbiose entre <i>Rhizozium</i> e planta hospedeira (LUM e HIRSCH, 2003).	29
<b>Figura 7</b>	a) Nódulos radiculares de soja (TAIZ & ZEIGER, 2009); b) Corte realizado em nódulos de soja, presença da cor vermelha devido a leghemoglobina. (Retirado do Google imagens. <a href="http://www.plantiodireto.com.br/?body=cont_int&amp;id=713">www.plantiodireto.com.br/?body=cont_int&amp;id=713</a> , novembro de 2009).	30
<b>Figura 8</b>	Imagem de coloração de Gram da estirpe de <i>Rhizbium tropici</i> CIAT 899 utilizando microscopia óptica. (Foto registrada pelo autor)	32
<b>Figura 9</b>	Esquema de classificação de lectinas segundo Peumans e Van Damme (1995) e Van Damme <i>et al</i> (1998).	35
<b>Figura 10</b>	Estrutura tetramérica de ConBr lectina pertencente a subtribo Diocleinae. Resíduos de aminoácidos Gly 58 e Gly 70, na lectina ConA são substituídos por Asp e Ala respectivamente (SANZ-APARICIO <i>et al.</i> , 1997).	37
<b>Figura 11</b>	Sobreposição de ConBr (Cinza), ConA (Verde) no domínio de reconhecimento a carboidrato (CRD) mostrando diferenças no arranjo espacial dos resíduos de aminoácidos que compõem a CDR.	38
<b>Figura 12</b>	Representação esquemática dos sítios de ligação a metal na lectina de <i>Canavalia ensiformis</i> (LORIS <i>et al.</i> , 2004).	39
<b>Figura 13</b>	Região do sítio de ligação a íons metálicos, Ca <sup>2+</sup> e Mn <sup>2+</sup> , da lectina de <i>Phaseolus vulgaris</i> (LORIS <i>et al.</i> , 2004).	40
<b>Figura 14</b>	Representação esquemática da montagem da placa de 96 poços para o ensaio de atividade de crescimento microbiano.	46
<b>Figura 15</b>	Representação esquemática da montagem da placa de 96 poços para o ensaio de inibição atividade da lectina sobre o crescimento microbiano.	47

---

<b>Figura 16</b>	Atividade de BSA (albumina sérica bovina) sobre o crescimento microbiano de <i>Rhizobium tropici</i> CIAT899.	51
<b>Figura 17</b>	Atividade da lectina de <i>Canavalia ensiformis</i> (ConA) sobre o crescimento microbiano de <i>Rhizobium tropici</i> CIAT899.	53
<b>Figura 18</b>	Atividade da lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i> (ConBr) sobre o crescimento microbiano de <i>Rhizobium tropici</i> CIAT899.	54
<b>Figura 19</b>	Comparação entre o açúcar $\alpha$ -D-manose e o controle experimental NaCl 0,15M.	57
<b>Figura 20</b>	Atividade da lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i> (ConBr) complexada com Manose, sobre o crescimento microbiano de <i>Rhizobium tropici</i> CIAT899 e o controle experimental NaCl 0,15M.	48
<b>Figura 21</b>	Comparação entre a atividade da lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i> (ConBr) e lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i> (ConBr) complexada com 0,1M de Manose.	58
<b>Figura 22</b>	Imagem de hemácias de coelho utilizadas como controle experimental dos testes de atividade hemaglutinante analisado por microscopia óptica no aumento de 100x.	61
<b>Figura 23</b>	Imagem da atividade hemaglutinante da lectina ConA frente a hemácias de coelho analisado por microscopia óptica no aumento de 100x.	62
<b>Figura 24</b>	Imagem da atividade hemaglutinante da lectina ConA/FITC frente a hemácias de coelho analisado por microscopia óptica no aumento de 100x.	62
<b>Figura 25</b>	Imagem da atividade hemaglutinante da lectina ConBr frente a hemácias de coelho analisado por microscopia óptica no aumento de 100x.	63
<b>Figura 26</b>	Imagem da atividade hemaglutinante da lectina de ConBr/FITC frente a hemácias de coelho analisado por microscopia óptica no aumento de 100x.	63
<b>Figura 27</b>	Imagem da fluorescência natural emitida pela estirpe bacteriana <i>Rhizobium tropici</i> .	64
<b>Figura 28</b>	Imagem da interação entre FITC e a estirpe bacteriana <i>Rhizobium tropici</i> .	65
<b>Figura 29</b>	Imagem da interação entre BSA/FITC e superfície bacteriana de <i>Rhizobium tropici</i> .	66
<b>Figura 30</b>	Imagem da interação entre ConA/FITC e superfície bacteriana de <i>Rhizobium tropici</i> .	67
<b>Figura 31</b>	Imagem da interação entre ConA/FITC complexada a D-manose e superfície bacteriana de <i>Rhizobium tropici</i> .	68
<b>Figura 32</b>	Imagem da interação entre ConBr/FITC e superfície bacteriana de <i>Rhizobium tropici</i> .	69

---

**Figura 33** Imagem da interação entre ConBr/FITC complexada a D-manose e 70  
superfície bacteriana de *Rhizobium tropici*.

---

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Principais características da uréia	19
<b>Tabela 2</b>	Espécies do gênero <i>Rhizobium</i> (WILLEMS, 2006).	25
<b>Tabela 3</b>	Lectinas utilizadas nos experimentos com suas respectivas siglas, especificidades por carboidratos e referência.	45

---

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

<b>ABU</b>	Ácido $\alpha$ -aminobutírico
<b>ADP</b>	Adenosina difosfato
<b>Ala</b>	Alanina
<b>Ans</b>	Asparagina
<b>Arg</b>	Arginina
<b>Asp</b>	Aspartato
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>B</b>	Boro
<b>BSA</b>	Albumina Sérica Bovina
<b>C</b>	Carbono
<b>Ca</b>	Cálcio
<b>CDR</b>	Domínio de reconhecimento a carboidrato
<b>CIAT</b>	Centro Internacional de Agricultura Tropical
<b>Cl</b>	Cloro
<b>Co</b>	Cobalto
<b>ConA</b>	Concanavalia A (Lectina de <i>Canavalia ensiformis</i> )
<b>ConBr</b>	Lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i>
<b>ConM</b>	Lectina de <i>Canavalia marítima</i>
<b>Cu</b>	Cobre
<b>FBN</b>	Fixação biológica do nitrogênio
<b>Fe</b>	Ferro
<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína
<b>g</b>	Gramas
<b>Glu</b>	Ácido glutâmico
<b>Gly</b>	Glicina
<b>H</b>	Hidrogênio
<b>ha</b>	Hectare
<b>His</b>	Histidina
<b>HIV</b>	Vírus da Imunodeficiência Humana
<b>K</b>	Potássio
<b>KDa</b>	Quilodalton
<b>Kg</b>	Quilograma
<b>Leu</b>	Leucina
<b>M</b>	Molar
<b>MBL</b>	Manose-binding lectin
<b>Mg</b>	Magnésio
<b>mg</b>	Miligrama
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>Mn</b>	Manganês
<b>Mo</b>	Molibdênio
<b>N</b>	Nitrogênio
<b>N<sub>2</sub></b>	Gás nitrogênio
<b>nm</b>	Nanômetros
<b>Nod</b>	Gene de nodulação
<b>Nod</b>	Nodulação
<b>O</b>	Oxigênio

---

<b>O<sub>2</sub></b>	Gás oxigênio
<b>P</b>	Fósforo
<b>PBS</b>	Phosphate buffered saline
<b>pH</b>	Potencial de hidrogênio
<b>RIP</b>	Proteína inativadora de ribossomos
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>S</b>	Enxofre
<b>spp</b>	Espécie
<b>TRIS</b>	Tris(hidroximetil)aminometano
<b>TxLC-1</b>	First Tulipa hybrid lectin with complex specificity
<b>Tyr</b>	Tirosina
<b>UFC</b>	Unidade formadora de colônia
<b>YM</b>	Yeast-mannitol
<b>Zn</b>	Zinco
<b>µg</b>	Micrograma
<b>µL</b>	Microlitro

---

# SUMÁRIO

## LISTA DE FIGURAS

## LISTA DE TABELAS

## LISTA DE SÍMBOLOS ABREVIATURAS

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>17</b>
1.1 O nitrogênio	17
1.2 Fixação Biológica do Nitrogênio	20
1.3 Rizóbios: Bactérias Fixadoras de nitrogênio	24
1.4 Utilização de rizóbios na prática agrícola	30
1.5 Lectinas	32
1.5.1 Breve histórico	32
1.5.2 Definição e classificação	33
1.5.3 Estrutura das lectinas	35
1.5.4 Distribuição das lectinas	41
1.5.5 Atividades Biológicas	43
1.6 OBJETIVOS	44
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>45</b>
2.1 Isolamento e purificação das Lectinas	45
2.2 Bactéria	45
2.3 Ensaio de crescimento bacteriano em placa de microtitulação	45
2.4 Reversão da atividade de ConBr com açúcar inibidor	46
2.5 Estudo da interação lectina/ <i>Rhizobium tropici</i> por Microscopia de fluorescência	47
2.5.1 Marcação das lectinas e do BSA com (Isotiocianato de fluoresceína) (FITC)	47



---

2.5.2	Determinação da atividade hemaglutinante das lectinas associadas com FITC	48
2.5.3	Microscopia de Fluorescência	48
2.6	Análise estatística	49
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>		<b>51</b>
3.1	Ensaio de crescimento bacteriano em placa de microtitulação	51
3.1.1	Ensaio de crescimento microbiano utilizando albumina sérica bovina (BSA)	51
3.1.2	Ensaio de crescimento microbiano utilizando lectina isolada de <i>Canavalia ensiformis</i> (ConA)	52
3.1.3	Ensaio de crescimento microbiano utilizando lectina isolada de <i>Canavalia brasiliensis</i> (ConBr)	54
3.2	Reversão da atividade da lectina com açúcar inibidor	56
3.3	Estudo da interação lectina/ <i>Rhizobium tropici</i> por microscopia de fluorescência	61
3.3.1	Atividade hemaglutinante	61
3.3.2	Fluorescência natural de <i>Rhizobium tropici</i>	64
3.3.3	Interação entre FITC e <i>Rhizobium tropici</i>	64
3.3.4	Interação entre BSA e <i>Rhizobium tropici</i>	65
3.3.5	Interação entre ConA e <i>Rhizobium tropici</i>	66
3.3.6	Inibição da interação entre ConA e <i>Rhizobium tropici</i> utilizando açúcar inibidor	67
3.3.7	Interação entre ConBr e <i>Rhizobium tropici</i>	68
3.3.8	Inibição da interação entre ConA e <i>Rhizobium tropici</i> utilizando açúcar inibidor	69
<b>4. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS</b>		<b>72</b>
<b>5. COLABORADORES</b>		<b>73</b>
<b>6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>		<b>74</b>

---

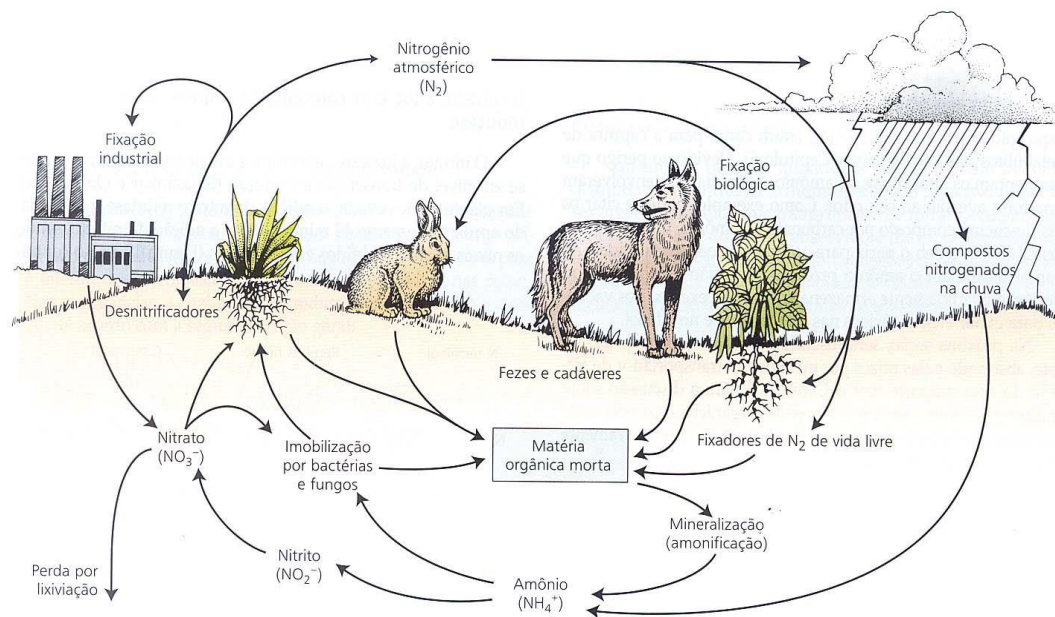
# 1. INTRODUÇÃO

## 1.10 NITROGÊNIO

O nitrogênio é considerado um dos nutrientes mais limitantes para o crescimento de plantas no seu ambiente natural (FRANCO & DÖBEREINER, 1994). Nos vegetais é o componente responsável por várias reações além de fazer parte da estrutura da clorofila, de enzimas e proteínas. Por ser elemento essencial, seu balanço afeta a formação de raízes, a fotossíntese, a produção e translocação de fotoassimilados e a taxa de crescimento entre folhas e raízes, sendo o crescimento foliar primeiramente afetado (TAIZ & ZIEGER, 2004). Sua ausência bloqueia a síntese de citocinina, hormônio responsável pelo crescimento das plantas, causando redução do seu tamanho e conseqüentemente redução da produção econômica das sementes (MENGEL e KIRKBY, 1987). Portanto é um nutriente requerido em grandes quantidades pelas culturas, sendo comum ocorrer deficiência na maioria dos sistemas agrícolas (SMITHSON & GILLER, 2002).

A atmosfera contém cerca de 80% de nitrogênio molecular ( $N_2$ ). Porém, apesar da abundância de nitrogênio na atmosfera, este elemento não está diretamente disponível para os organismos vivos, apenas a forma mais reduzida deste elemento pode ser assimilado. A maioria das plantas obtém o nitrogênio do solo sob a forma de íon nitrato ( $NO_3^-$ ) e íon nitrito ( $NO_2^-$ ) havendo algumas que o absorve sob a forma de íon amônio ( $NH_4^+$ ). A obtenção de nitrogênio da atmosfera requer a quebra de uma ligação tripla covalente de excepcional estabilidade, entre os dois átomos de nitrogênio, para produzir amônia ( $NH_3$ ) ou nitrato ( $NO_3^-$ ). Tais reações, conhecidas como fixação do nitrogênio, podem ser obtidas por processo industrial e por processo natural (TAIZ & ZEIGER, 2004). A vida das plantas depende da manutenção de uma concentração adequada de nitrogênio em seus tecidos, e a vida dos animais depende da vida das plantas, já que a utilizam como alimento (MALAVOLTA e MORAIS, 2006).

Segundo Schlesinger (1997), aproximadamente  $190 \times 10^{12}$  g de nitrogênio são fixados por ano através de processos naturais como relâmpagos, reações fotoquímicas e fixação biológica através de bactérias ou algas azuis (cianobactérias), estas últimos responsáveis por aproximadamente 90% da fixação biológica do nitrogênio.



**Figura 1.** Representação esquemática do Ciclo do nitrogênio (TAIZ & ZEIGER, 2009).

Entre as principais fontes de nitrogênio para a cultura de grãos, como o feijão e soja, destacam-se: o solo, através da decomposição da matéria orgânica, a aplicação de adubos nitrogenados e a fixação biológica do nitrogênio (HUNGRIA *et al.*, 1997; MERCANTE *et al.*, 1999).

O nitrogênio é o nutriente absorvido em maior quantidade pelas leguminosas (HAAG *et al.*, 1967). A disponibilidade de nitrogênio mineral para as plantas está na dependência direta da contínua decomposição da matéria orgânica (mineralização do N) e da adubação nitrogenada, sendo o processo de fixação biológica do nitrogênio atmosférico restrito a microrganismos que ocorrem livremente no solo ou em associação com espécies vegetais. A aplicação de nitrogênio mineral nos solos tropicais pode apresentar, às vezes, baixa frequência de resposta (FRANCO, 1977). O aproveitamento do nitrogênio do fertilizante é normalmente inferior a 50%, podendo, em determinadas situações, em solos arenosos, atingir entre 5 e 10% (DUQUE *et al.*, 1985).

Prevê-se que à medida que a agricultura se intensifica e as produtividades aumentam, o consumo de nitrogênio deverá aumentar como já acontece em algumas regiões do Brasil, e como consequência um valor relativamente alto (RAIJ, 1991; BELLAVER e FAGUNDES, 2009).

Segundo a FAO (Food and Agriculture Organization), cerca de 50% da responsabilidade pelo aumento de produtividade agrícola se deve aos fertilizantes, e

considerando o papel preponderante do N na agricultura, o adequado suprimento e uso dos fertilizantes nitrogenados se tornam primordial para que o país possa se tornar um grande produtor agrícola mundial (Fonte: Food and Agriculture Organization).

A uréia é o fertilizante mais produzido e mais utilizado no Brasil e no mundo, sendo justificado pelo custo de produção e alto teor de nitrogênio (MALAVOLTA e MORAIS, 2006). Em 2007 a produção mundial de uréia alcançou 134,7 milhões de toneladas de produto (Fonte: Food and Agriculture Organization).

**Tabela 1.** Principais características da uréia.

Item	Valor
Cor	Branco cristalino
Teor de N % (mínimo)	45
Ponto de fusão	132,7°C
Densidade	1,335
Solubilidade (g/100mL d'água) a 25°C	119
Ponto higroscópico (umidade crítica) a 30°C	72

O uso de adubos nitrogenados representa um alto valor econômico, além de possuir um grande custo ecológico, resultantes das grandes perdas, já que cerca de 50% do total de adubo aplicado no solo é perdido, principalmente pelo processo de lixiviação promovido pelas águas da chuva e irrigação (SIQUEIRA *et al.*, 1994; STRALIOTTO *et al.*, 2002). Desta forma, o manejo adequado da adubação nitrogenada representa uma das principais dificuldades para as culturas de grãos, uma vez que a aplicação de doses excessivas de nitrogênio, além de aumentar o custo econômico, representa sérios riscos ao ambiente, enquanto a utilização em quantidades insuficientes pode limitar a produção (SANTOS *et al.*, 2003).

Apesar de ser o nutriente mais abundante da atmosfera terrestre o nitrogênio não figura como constituinte de qualquer rocha terrestre. Talvez seja por este motivo que ele é o elemento mais caro dos fertilizantes, pois, para sua formação, é necessária diversas reações químicas, as quais necessitam de muita energia. Isso é justificado pelo fato da difícil síntese e alto custo energético da formação do  $\text{NH}_3$  (16800 Kcal/Kg contra 2100 Kcal/Kg do  $\text{K}_2\text{O}$ ). A difícil reação de síntese é ratificada, em parte, pela reação de transformação do gás  $\text{N}_2$ , um composto super estável. Essas moléculas contêm uma tríplice ligação covalente muito estável, sendo necessário  $2,2 \times 10^5$  Kcal/Kmol para quebrá-la. Além disso, a reação de formação da

amônia (NH<sub>3</sub>), composto mais importante para a produção de adubos nitrogenados, também requer um alto custo energético. A estimativa é de que sejam gastos seis barris de petróleo para cada tonelada de NH<sub>3</sub> sintetizada através do processo industrial de fixação de nitrogênio (HUNGRIA *et al.*, 2001).

A fixação do nitrogênio pela associação entre rizóbios e leguminosas fixa o nitrogênio atmosférico, fornecendo-o à planta na sua forma assimilável. É uma alternativa que pode substituir, ainda que parcialmente, a adubação nitrogenada, resultando em benefícios aos produtores (FERREIRA *et al.*, 2009). Vários estudos têm demonstrado que é possível otimizar o processo de fixação biológica de nitrogênio para a cultura de grãos em condições de campo (HUNGRIA *et al.*, 1997; PELEGRIN *et al.*, 2009). Segundo Moreira (2005) a fixação biológica de nitrogênio na soja é capaz de fornecer todo o nitrogênio que a cultura necessita: estima-se, que com esse efeito, tem-se uma economia no Brasil, em termos de adubo nitrogenado, da ordem de um bilhão de dólares.

Ferreira e colaboradores (2000) e Venturini e colaboradores (2002) compararam a utilização do *Rhizobium tropici* com a adubação química de nitrogênio e concluíram que a prática da inoculação pode possibilitar a não utilização de nitrogênio sem afetar os componentes de produção, obtendo médias de produtividade do feijoeiro entre 2.040 a 4.330 kg.ha<sup>-1</sup> (FERREIRA, *et al.* 2000 e VENTURINI, *et al.* 2002).

Straliotto (2002) destaca ainda que o feijoeiro quando inoculado com o rizóbio, pode chegar a gerar produtividade entre 1.500 e 2.000 kg.ha<sup>-1</sup>, e quando associado à suplementação com adubo nitrogenado ocorre um aumento no crescimento dos nódulos e maior fixação biológica, fazendo com que o patamar de produção supere os 3.000 kg.ha<sup>-1</sup> (STRALIOTTO, 2002).

## 1.2 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO

A fixação biológica do nitrogênio atmosférico (FBN) é um dos processos microbianos mais bem estudados e explorados tecnologicamente relacionados à agricultura. A inoculação de sementes de leguminosas com bactérias diazotróficas é prática comum em vários países.

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) consiste na conversão do nitrogênio atmosférico (N<sub>2</sub>) em amônia (NH<sub>3</sub>), forma disponível às plantas, por alguns procariotos (TAIZ & ZEIGER, 2009).

---

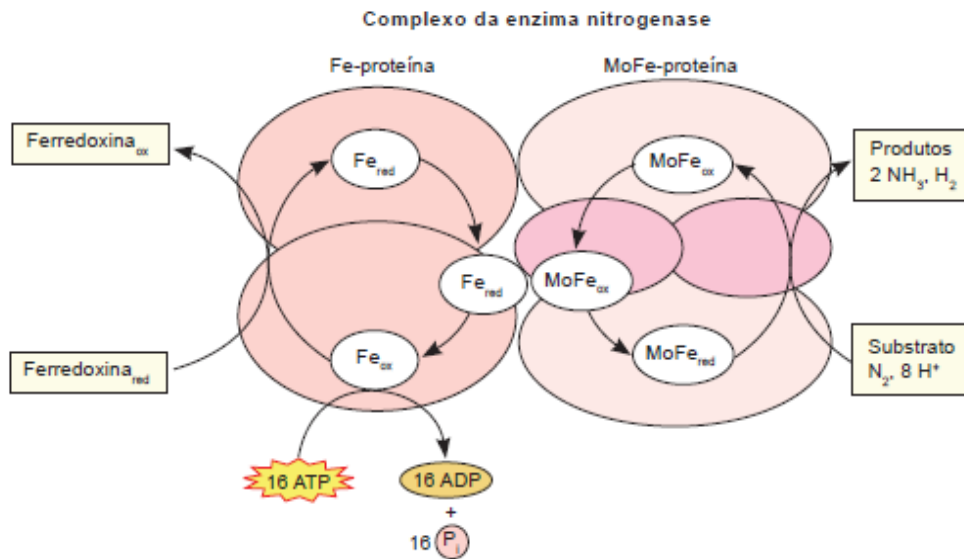
O processo de fixação biológica de nitrogênio é um processo semelhante à fixação industrial deste elemento, pois a partir do nitrogênio molecular acontece a produção de amônia, sendo a reação geral deste processo o seguinte:  $N_2 + 8 e^- + 8 H^+ + 16 ATP \rightarrow 2 NH_3 + H_2 + 16 ADP + 16 Pi$  (TAIZ & ZEIGER, 2009).

Evolutivamente, acredita-se que a fixação biológica do nitrogênio tenha se desenvolvido quando as reservas geoquímicas de nitrogênio fixado se tornaram escassas na biosfera. O esgotamento dos óxidos de nitrogênio (nitratos e nitritos) pelos organismos teria, provavelmente, limitado seu crescimento e ocasionado uma pressão seletiva que favoreceu o aparecimento da diazotrofia. A capacidade de fixar nitrogênio teria sido, portanto, um evento relativamente precoce na evolução dos procariontes e anterior ao surgimento da fotossíntese (e conseqüente aumento da concentração de oxigênio livre na atmosfera), uma vez que a nitrogenase é extremamente sensível à desnaturação por oxigênio (NEWTON, 2000). Na verdade, acredita-se que a grande homologia compartilhada pelas diferentes nitrogenases indicaria sua origem ancestral comum e o fato de que a diazotrofia tenha sido uma característica importante e não rara entre os procariontes (BURRIS & ROBERTS 1993). Ao longo do tempo, essa propriedade foi sendo perdida, e se manteve apenas em alguns organismos, as atuais bactérias diazotróficas.

Para que ocorra fixação de nitrogênio por parte de algumas espécies bacterianas, é necessária a participação de um complexo enzimático (complexo nitrogenase) responsável por catalisar esta reação. Motta em 2003 relata a estrutura deste complexo enzimático, que consiste de duas proteínas chamadas de dinitrogenase (Fe-proteína) e dinitrogenase-redutase (MoFe-proteína) (Figura 2).

A proteína dinitrogenase (Fe-proteína) é a menor dos dois componentes e apresenta duas subunidades idênticas de 30 a 72 KDa cada, dependendo do organismo. Cada subunidade contém um grupo ferro-enxofre ( $4 Fe$  e  $4 S_2^-$ ), que participa nas reações redox envolvidas na conversão de nitrogênio em amônia. A Fe-proteína é irreversivelmente inativada na presença de oxigênio com uma meia-vida característica de 30 a 45 segundos (DIXON e WHEELER, 1986, TAIZ & ZEIGER, 2009).

A proteína dinitrogenase-redutase (MoFe-proteína) apresenta quatro subunidades, com massa molecular total de 180 a 235 KDa, dependendo da espécie. Cada subunidade apresenta dois grupos Mo-Fe-S. A MoFe-proteína é também inativada pelo oxigênio, com a meia-vida de 10 minutos no ar (DIXON e WHEELER, 1986, TAIZ & ZEIGER, 2009).



**Figura 2.** Reação catalisada pelo complexo enzimático da nitrogenase (TAIZ & ZEIGER, 2009).

A fixação biológica de nitrogênio é a maior responsável pela entrada deste elemento no solo por uma ampla variedade de microrganismos de vida livre (clostrida, bacilos, várias algas e alguns líquens) (DELWICHE, 1965). A quantidade de nitrogênio fixada varia de 18-23 Kg ha<sup>-1</sup>, em regiões temperadas, até 100 Kg ha<sup>-1</sup> nas regiões tropicais (MALAVOLTA e MORAIS, 2006).

A fixação simbiótica acontece nos nódulos das raízes de leguminosas por bactérias do gênero *Rhizobium*, onde a planta hospedeira fornece carboidratos, fonte de energia, e o microrganismo, em troca, fixa o nitrogênio e o cede na forma de amônia. Nas gramíneas, a fixação de nitrogênio pode ocorrer na rizosfera do vegetal, onde microrganismos de vários gêneros, como do gênero *Azospirillum*, aproveitando o exsudado das raízes, fixam o nitrogênio em quantidades que variam de 10-80 Kg ha<sup>-1</sup> por ano. Existe ainda a fixação biológica na forma endofítica, que ocorre nos vasos da cana de açúcar e do arroz e ocorre devido a bactérias como *Acetobacter diazotrophicus* e *Methylobacterium spp* (MALAVOLTA e MORAIS, 2006).

A importância da utilização da prática de fixação biológica de nitrogênio por parte da inoculação de rizóbios, em detrimento da utilização de fertilizantes nitrogenados industriais, representa uma diminuição dos custos da produção vegetal, além do ganho ambiental na adoção desta tecnologia de inoculação (DOBEREINER *et al.*, 1997; POWSON *et al.*, 1993). A utilização de adubação nitrogenada representa um grande custo ecológico, isso acontece pela grande perda de adubo aplicado ao solo, ocorrendo principalmente pelo processo de lixiviação provocado pelas águas das chuvas e irrigação. O nitrogênio perdido

---

nesse processo é altamente poluente, e uma vez carregado pelas águas nos lençóis freáticos, contaminam aquíferos subterrâneos, rios e lagos, além disso, parte do nitrogênio é perdida na forma gasosa, como amônia, que retorna a atmosfera principalmente pelo processo de desnitrificação (SIQUEIRA *et al.*, 1994; STRALLIOTO *et al.*, 2002).

Segundo Costa Junior (1997) a fixação biológica de nitrogênio mostra-se de grande importância para a prática agrícola, segundo o autor, bactérias que tem capacidade de nodular e fixar o nitrogênio atmosférico em leguminosas, podem fornecer à planta de 60 a 100% de suas necessidades de nitrogênio (COSTA JUNIOR, 1997).

Considerando o baixo custo do inoculante e a aplicação de apenas uma dose por hectare, os custos de implantação de uma cultura poderiam diminuir em milhões de dólares, representando uma grande economia, que poderia ser direcionada para outros aspectos da melhoria da produtividade agrícola, como por exemplo, outros insumos importantes para a cultura de grãos (ARAÚJO, 1994).

O melhor exemplo das vantagens econômicas geradas pela fixação biológica do nitrogênio é a utilização deste processo na cultura da soja, onde a adubação química nitrogenada é totalmente substituída pela utilização de inoculantes contendo bactérias do gênero *Bradyrhizobium*. A utilização desta tecnologia representa uma economia para o país de cerca de US\$ 3 bilhões em fertilizantes nitrogenados (MERCANTE, 2007).

A simbiose feijão caupi/rizóbio é capaz de fornecer de 35 a 70% do nitrogênio que a planta precisa (BODDEY *et al.*, 1990), isto é, cerca de 50 a 120 Kg ha<sup>-1</sup> de nitrogênio (WANI *et al.*, 1995), fato que se apresenta como uma economia bastante significativa. Estima-se que a contribuição da fixação biológica nesta cultura é na ordem de US\$ 13 milhões, somente para a região Nordeste brasileiro (RUMJANEK *et al.*, 2005).

No caso de outras leguminosas como o feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), foram isoladas estirpes que são tolerantes à acidez e as altas temperaturas, podendo a inoculação com essas estirpes duplicar a média da produtividade nacional (HUNGRIA *et al.*, 1997).

Desta maneira, diversas vantagens são trazidas pelo processo de fixação biológica de nitrogênio que vão desde o aumento da produção vegetal até a contribuição para a sustentabilidade dos sistemas agrícolas, a recuperação de áreas degradadas, o incremento da fertilidade e da matéria orgânica do solo. Entretanto, sua principal vantagem em curto prazo está associada à economia no uso de fertilizantes nitrogenados industrializados (RUMJANEK *et al.*, 2005).



### 1.3 RIZÓBIOS: BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO

O primeiro relato de que bactérias são responsáveis pela fixação de nitrogênio atmosférico em vegetais foi descrito por Beijerinck em 1888, quando em seu trabalho realizou o isolamento de uma estirpe bacteriana a qual nomeou de *Bacillus radicicola*. Ele estabeleceu que o processo de fixação de nitrogênio fosse responsável por este microrganismo, e que este processo acontecia no interior dos nódulos das raízes (BEIJERINCK, 1888). No ano seguinte (1889) Frank mudou a nomenclatura e denominou este microrganismo de *Rhizobium*, considerando na época a existência de apenas uma espécie de bactéria que fixasse o nitrogênio, *Rhizobium leguminosarum* (FRANK, 1889).

No começo do século 20, extensivos testes de relacionados à nodulação em diversas leguminosas foram realizados, com a finalidade de estabelecer grupos destes microrganismos fixadores de nitrogênio através da técnica de inoculação em vegetais (FRED *et al.*, 1932). Os testes de inoculação também foram utilizados para o estudo da taxonomia de rizóbios, mas logo foram abandonados devido ser um marcador taxonômico irrealizável (GRAHAM, 1964; WILSON, 1944).

No começo dos anos 60, bacteriologistas começaram a utilizar em estudos taxonômicos uma série de características morfológicas, nutricionais e metabólicas destes microrganismos (GRAHAM, 1964; MOFFET e COLWELL, 1968; TMANNETJE, 1967).

Nos anos 80, com avanço de técnicas de biologia molecular e estudos de filogenia, foi possível constatar uma série de características genéticas distintas entre rizóbios contribuindo assim para o aumento gradual no número de gêneros e espécies desta classe de bactérias (WILLEMS, 2006).

Como resultado do nível elevado de informação proporcionado pelas análises de biologia molecular, tem-se que, até 1984, rizóbios eram classificados em apenas uma família, dois gêneros e seis espécies (JORDAN, 1984). Hoje, estão definidas quatro famílias (*Bradyrhizobiaceae*, *Hyphomicrobiaceae*, *Phyllobacteriaceae*, *Rhizobiaceae*), seis gêneros (*Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Mesorhizobium* e *Sinorhizobium*), e aproximadamente 50 espécies (GARRITY & HOLT, 2001; WILLEMS, 2006).

Em relação à classificação taxonômica de rizóbios que formam simbiose e nodulam o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*), até 1984 estava definido uma única espécie apenas, *Rhizobium leguminosarum* (JORDAN, 1984). Segundo Willems (2006) hoje o gênero

*Rhizobium* corresponde a quinze espécies conhecidas, sendo destas, cinco estirpes simbiotes em feijoeiro, como mostra a Tabela 2.

**Tabela 2.** Espécies do gênero *Rhizobium* (WILLEMS, 2006).

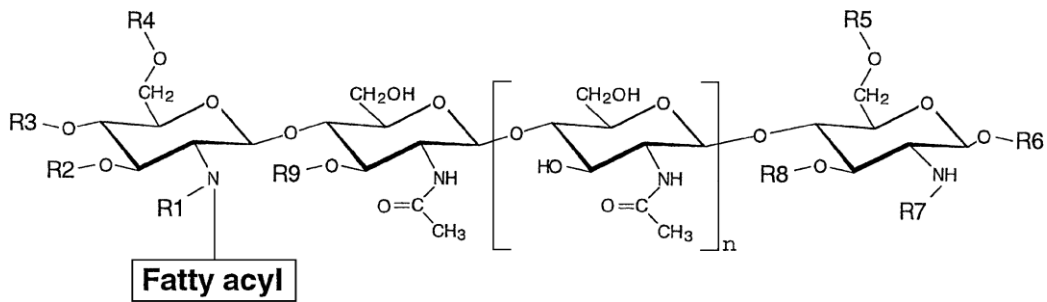
Name	Year	Host plant(s)	Reference
<i>R. leguminosarum</i>	1879	<i>Pisum, Lathyrus, Vicia, Lens, Phaseolus, Trifolium</i>	Frank (1879)
<i>R. lupinii</i>	1886	<i>Lupinus, Ornithopus</i>	Schroeter (1886)
<i>R. galegae</i>	1989	<i>Galega</i>	Lindström (1989)
<i>R. tropici</i>	1991	<i>Phaseolus vulgaris, Leucaena</i>	Martínez-Romero et al. (1991)
<i>R. etli</i>	1993	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Segovia et al. (1993)
<i>R. gallicum</i>	1997	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Amarger et al. (1997)
<i>R. giardinii</i>	1997	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Amarger et al. (1997)
<i>R. hainanense</i>	1997	<i>Desmodium, Stylosanthes, Centrosema, Tephrosia, Acacia, Zornia, Macroptilium</i>	Chen et al. (1997)
<i>R. mongolense</i>	1998	<i>Medicago ruthenica</i>	van Berkum et al. (1998)
<i>R. huautlense</i>	1998	<i>Sesbania herbacea</i>	Wang et al., (1998)
<i>R. yanglingense</i>	2001	<i>Coronilla, Gueldenstaedtia, Amphicarpaea</i>	Tan et al. (2001)
<i>R. sullae</i>	2002	<i>Hedysarum coronarium</i>	Squartini et al. (2002)
<i>R. indigoferae</i>	2002	<i>Indigofera</i>	Wei et al. (2002)
<i>R. loessense</i>	2003	<i>Astragalus</i>	Wei et al. (2003)
<i>R. daejeonense</i>	2005	<i>Medicago</i>	Quan et al. (2005)

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) ocorre através de uma simbiose mutualística, onde as bactérias diazotróficas, presentes nos nódulos das raízes, fixam o nitrogênio atmosférico e transferem para a planta o nitrogênio em sua forma assimilável (amônia, NH<sub>3</sub>) (TAIZ & ZEIGER, 2009).

Bactérias fixadoras de nitrogênio, ou diazotróficas, pertencentes à família *Rhizobiaceae* associam-se em raízes de diversas leguminosas, desempenhando papel fundamental de suprir as necessidades de nitrogênio do vegetal, estas bactérias são denominadas genericamente de rizóbios (MOREIRA e SIQUEIRA, 2000).

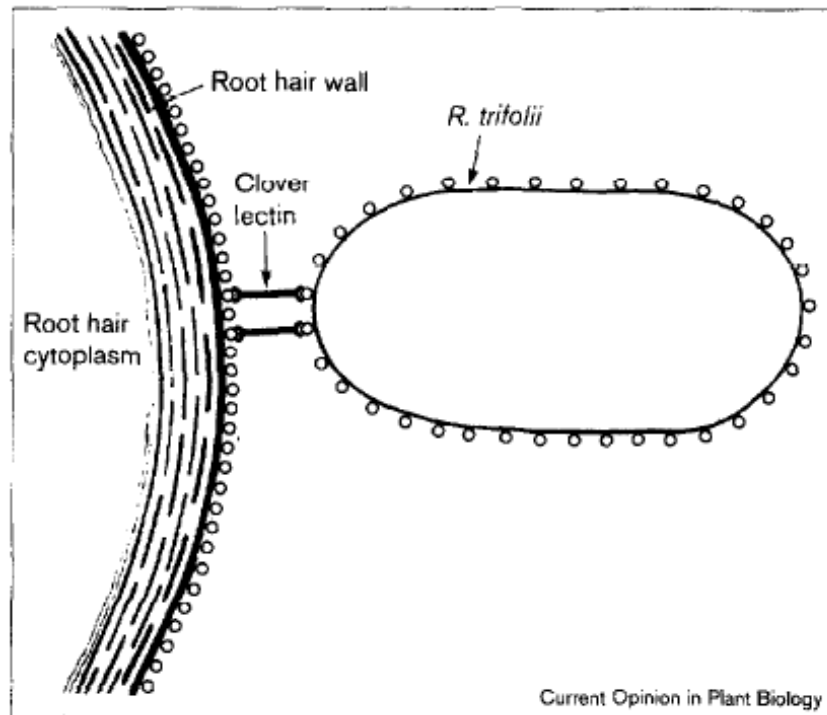
Rizóbios tem a capacidade de viver saprofiticamente nos solos, competindo com os demais microrganismos pelos recursos disponíveis (KEYSER *et al.*, 1997). A associação entre rizóbios e leguminosas é um processo complexo, que acontece quando a planta esta sob condições limitantes de nitrogênio. Nessas condições planta hospedeira e microrganismo trocam sinais moleculares para que ocorra o processo de reconhecimento e infecção. O primeiro estágio no estabelecimento da relação de simbiose entre a bactéria fixadora de nitrogênio e seu hospedeiro é a migração da bactéria em direção as raízes do vegetal. Esta migração é uma resposta mediada por atrativos químicos, em especial flavonóides, secretados pelas raízes. Estes flavonóides promovem a ativação de genes de nodulação (genes *nod*) resultando na síntese de fatores de nodulação (fatores Nod) (PHILLIPS e KAPULNIK, 1995).

Fatores de nodulação (Nod) são moléculas sinalizadoras oligossacarídeos de lipoquitina, que apresentam uma quitina  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4 ligada a um esqueleto N-acetil-D-glicosamina (variando em comprimento de três a seis unidades de açúcar), além de uma cadeia acil lipídica na posição C-2 do açúcar não-redutor (Figura 3) (STOKKERMANS *et al.*, 1995).



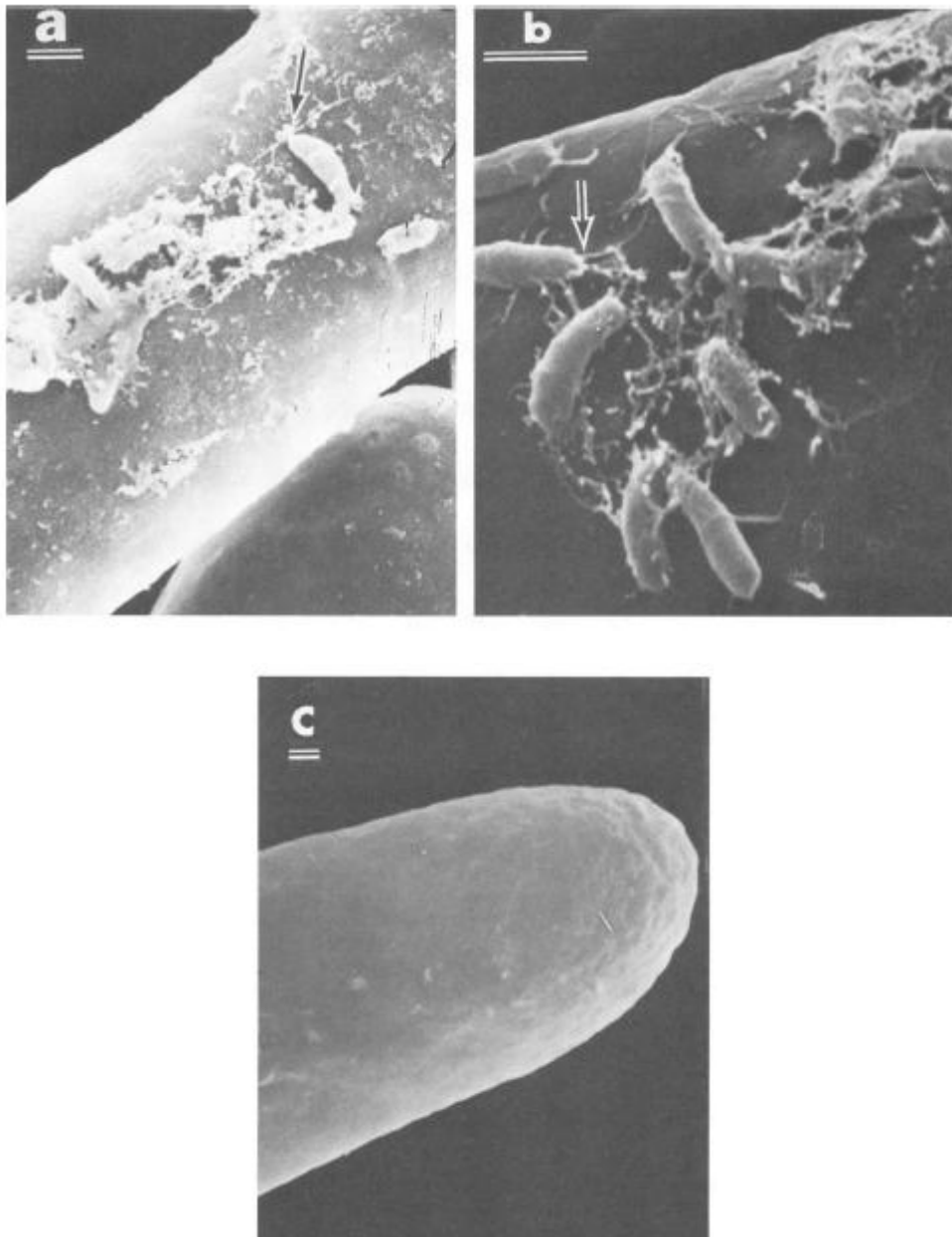
**Figura 3.** Estrutura geral dos fatores Nod produzidos por rizóbios (SPAINK 2000).

Uma leguminosa hospedeira em particular responde a um fator Nod específico. Alguns autores sugerem que os receptores de leguminosas para os fatores Nod são lectinas, produzidas nos pêlos radiculares (VAN RHIJN *et al.*, 1998; ETZLER *et al.*, 1999). Os fatores Nod ativam estas lectinas direcionando os rizóbios específicos aos hospedeiros apropriados e facilitando a ligação dos microrganismos à parede celular do pêlo radicular (TAIZ & ZEIGER, 2009) (Figura 4).



**Figura 4.** Modelo de Dazzo e Hubbell (1975), lectina de trevo promovendo a interação entre *Rhizobium trifolii* e a parede celular da raiz da planta hospedeira.

Durante o processo de infecção, as bactérias que estão ligadas aos pêlos radiculares liberam os fatores Nod produzidos, que induzem a modificação e o enrolamento das células do pêlo radicular. Então os microrganismos tornam-se envolvidos por um pequeno compartimento, formado pelo enrolamento. A parede celular do pêlo radicular também é degradada nessas regiões em resposta aos fatores Nod, permitindo que as células bacterianas acessem diretamente a superfície externa da membrana plasmática (LAZAROWITZ e BISSELING, 1997).



**Figura 5.** Imagens de *Rhizobium trifolii*, em raiz de trevo por Microscopia eletrônica de varredura. a) e b) Bactérias ligadas aos pêlos radiculares; c) Superfície do pêlo radicular de trevo. Barra: 0,5 $\mu$ m (DAZZO *et al.*, 1985).

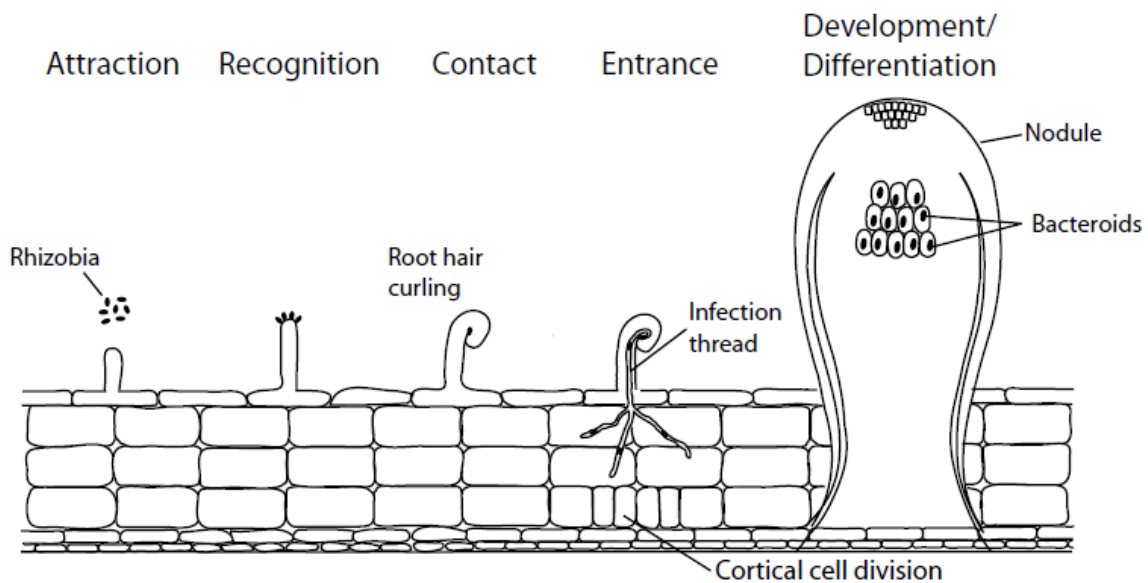
A próxima etapa é a formação de uma extensão interna tubular da membrana plasmática conhecido como canal de infecção, que é produzido pela fusão de vesículas derivadas do complexo de Golgi no local da infecção. Na região mais profunda do córtex as células corticais diferenciam-se e iniciam a divisão, formando uma área distinta no córtex, a partir do qual o nódulo irá se desenvolver (TIMMERS *et al.*, 1999).

Quando o canal de infecção atinge as células especializadas no nódulo, sua extremidade funde-se com a membrana plasmática da célula hospedeira, liberando células

bacterianas envoltas por uma membrana derivada da membrana plasmática da célula hospedeira. A ramificação do canal de infecção dentro dos nódulos permite a bactéria infectar muitas células (MAYLONA *et al.*, 1995).

Inicialmente, as bactérias continuam a se dividir, até certo momento, logo após, a partir de um sinal da planta, as bactérias param de se dividir e começam a aumentar em tamanho e a se diferenciarem em organelas endossimbióticas fixadoras de nitrogênio denominadas bacterióides. O nódulo como um todo desenvolve características semelhantes a um sistema vascular (o qual facilita a troca de nitrogênio fixado produzido pelos bacterióides por nutrientes disponibilizados pela planta) e uma camada de células para excluir o O<sub>2</sub> do interior do nódulo da raiz (TAIZ & ZEIGER, 2009).

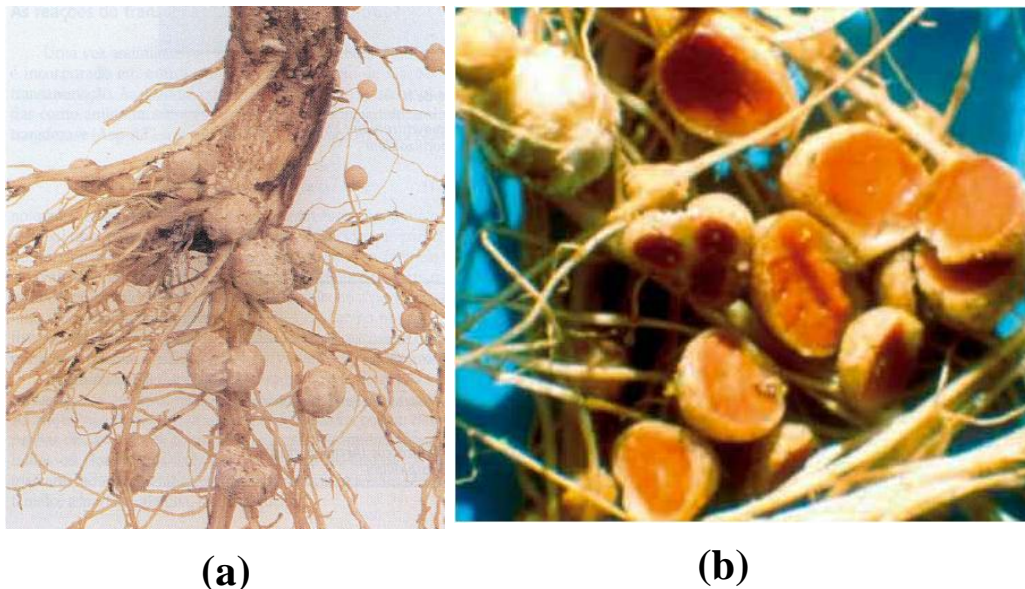
Em resumo o desenvolvimento da simbiose entre bactéria e plantas hospedeira pode ser dividido em uma progressão de eventos de atração, reconhecimento, contato, invasão, desenvolvimento e diferenciação como descrito por Lum e Hirsch em 2003 (Figura 6).



**Figura 6.** Progressão do processo de simbiose entre *Rhizozium* e planta hospedeira (LUM e HIRSCH, 2003).

A permeabilidade de gases dentro dos nódulos é regulada pela planta hospedeira, que mantém um nível de oxigênio que pode sustentar a respiração, mas é suficientemente baixo para evitar a inativação do complexo da nitrogenase (KUZMA *et al.*, 1993). O mecanismo de regulação da permeabilidade gasosa ainda não este bem elucidado.

Os nódulos possuem uma heme proteína de transporte do oxigênio chamada de leg-hemoglobina, a qual está presente em altas concentrações no citoplasma das células infectadas do nódulo, conferindo a esses nódulos uma cor rosada (Figura 7a e 7b). A planta hospedeira produz a porção globina da leg-hemoglobina em resposta à infecção pela bactéria (MARSCHNER, 1995), a bactéria simbiote produz a porção heme. A leg-hemoglobina apresenta uma alta afinidade pelo oxigênio, cerca de 10 vezes mais do que a cadeia  $\beta$  da hemoglobina humana. Embora se acreditasse que a leg-hemoglobina agisse como um tampão para o oxigênio do nódulo, estudos recentes indicam que ela armazena uma quantidade suficiente de oxigênio para a manutenção da respiração nodular apenas por poucos segundos (DENISON e HARTER, 1995).



**Figura 7.** a) Nódulos radiculares de soja (TAIZ & ZEIGER, 2009); b) Corte realizado em nódulos de soja, presença da cor vermelha devido a leghemoglobina. (Retirado do Google imagens. [www.plantiodireto.com.br/?body=cont\\_int&id=713](http://www.plantiodireto.com.br/?body=cont_int&id=713), novembro de 2009).

#### 1.4 UTILIZAÇÃO DE RIZÓBIOS NA PRÁTICA AGRÍCOLA

A tecnologia de inoculação de estirpes de rizóbios permite alcançar elevada produtividade com a diminuição, ou ainda, completa exclusão dos fertilizantes nitrogenados. Diversos estudos demonstram e comprovam que a inoculação de estirpes de rizóbios pode resultar em produtividades iguais ou ainda maiores do que a utilização de fertilizantes nitrogenados industriais (FERREIRA *et al.*, 2000; HUNGRIA *et al.*, 2000).

Apesar do aumento significativo da produção utilizando rizóbios, diversas condições ambientais são fatores limitantes para a fixação biológica de nitrogênio e o desenvolvimento do vegetal, como estresse hídrico, salinidade do meio, acidez do solo e altas temperaturas (RUMJANEK *et al.*, 2005). Sendo assim, a escolha das espécies de rizóbio para a inoculação é um fator importante para a fixação simbiótica de nitrogênio, pois existe grande variabilidade entre espécies destes microrganismos com respeito à resposta a essas variações ambientais.

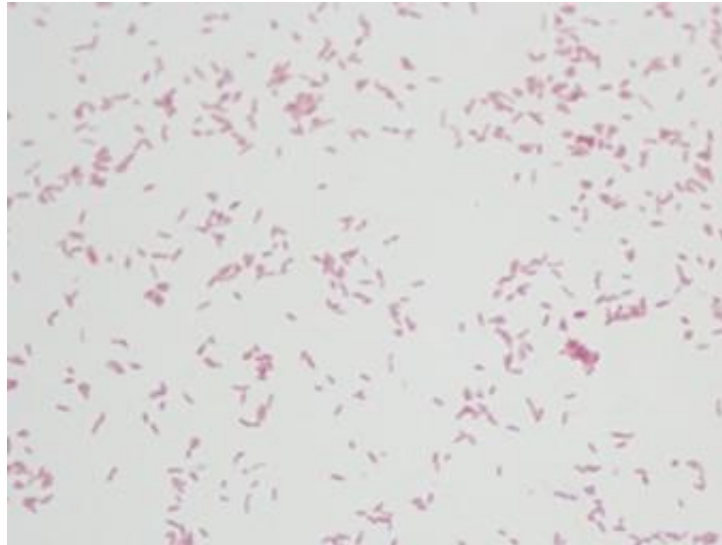
Segundo Straliozzo (2002), o inoculante utilizado no Brasil por muito tempo foi decepção para os produtores, visto que algumas espécies de rizóbio eram desenvolvidas em outros países e trazidas pelas instituições de pesquisa para o Brasil para serem testadas. As estirpes não se adaptavam as condições climáticas do país, ficando estas sujeitas a um elevado grau de instabilidade genética, ou seja, podendo perder a capacidade de fixar nitrogênio no feijoeiro (STRALIOTTO, 2002).

Martinez-Romero e colaboradores (1991) identificaram uma nova espécie e a definiram como *Rhizobium tropici* (tro' pi. ci. Do grego tropikos, trópicos). As bactérias dessa nova espécie foram descritas como aeróbias, Gram<sup>-</sup>negativas, com pH ótimo para crescimento variando entre 5 e 7, crescendo em temperatura de até 40°C (MARTÍNEZ-ROMERO *et al.*, 1991).

Desde a reunião da RELARE (Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola), realizada em 1994, ficou estabelecido que os programas brasileiros de seleção de estirpes de rizóbio para o feijoeiro deveriam selecionar estirpes mais eficientes e competitivas dentro da espécie *Rhizobium tropici* (HUNGRIA; ARAUJO, 1995).

*Rhizobium tropici* CIAT899 (comercialmente, SEMIA 4077), isolada pela CIAT, na Colômbia é uma estirpe de rizóbio que forma efetiva simbiose com *Phaseolus vulgaris* e *Leucaena* spp. Esta estirpe mostra ser uma espécie bastante competitiva, superando espécies como *Rhizobium leguminosarum* e *Rhizobium etli* (VLASSAK *et al.*, 1996 e 1997). Além disso, esta estirpe demonstra ser tolerante a diversos estresses ambientais, incluindo altas temperaturas, ambientes ácidos e de alta salinidade. Devido estas características que a distingue das demais, esta estirpe é atualmente a recomendada para a utilização em inoculantes para a cultura de feijoeiro (MARTÍNEZ - ROMERO *et al.* 1991; RICILLO *et al.*, 2000).





**Figura 8.** Imagem de coloração de Gram da estirpe de *Rhizobium tropici* CIAT 899 utilizando microscopia óptica. (Foto registrada pelo autor)

## 1.5 LECTINAS

### 1.5.1 Breve histórico

Potapov em 1968 introduziu o termo “lectinologia” referindo-se a uma área de estudos inteiramente voltada à pesquisa sobre uma classe especial de proteínas denominadas lectinas. O primeiro relato sobre lectinas descrito data de 1888, quando Peter Hermann Stillmark na sua tese de doutorado na Universidade de Dorpat (Estônia), demonstrou que extratos de sementes de mamona (*Ricinus communis*) promoviam a aglutinação de eritrócitos, denominando esse extrato de ricina. Embora hoje seja evidente que a “ricina” estudada por Stillmark era na verdade uma complexa mistura de moléculas tóxicas e aglutininas não tóxicas, seu trabalho foi o pioneiro e um marco na história da biologia por ser o primeiro a demonstrar a toxicidade em sementes de mamona e fatores hemaglutinantes de natureza protéica. Pouco tempo após a descoberta da ricina, H. Hellin, na mesma universidade, demonstrou a presença de uma hamaglutinina tóxica em sementes de *Abrus precatorius*, que foi denominada de abrina (SHARON e LIS, 1990; VAN DAMME *et al*, 1998).

A idéia de que a toxicidade era uma propriedade intrínseca das lectinas foi abandonada quando Landsteiner e Raubitschek em 1907 relataram pela primeira vez a presença de lectinas não tóxicas em leguminosas como *Phaseolus vulgaris*, *Pisum sativum*, *Lens culinaris* e *Vicia sativa*. Landsteiner foi o pioneiro nos estudos de lectinas vegetais,

---

utilizando estas aglutininas como ferramentas para o descobrimento dos grupos sanguíneos A, B e O (LANDSTEINER e RAUBITSCHKEK, 1907).

Devido à habilidade de algumas aglutininas de plantas para distinguir entre eritrócitos de diferentes tipos de sangue, Boyd e Shapleigh (1954) propôs o termo “lectinas” (do latim, *legere* - capaz de escolher, selecionar). Este termo foi generalizado por englobar todas as aglutininas açúcar-específico de origem não imune, independente de sua origem ou especificidade por tipo sanguíneo (SHARON e LIS, 1972).

Em 1936 Summer e Howell observaram que o açúcar da cana inibia a atividade hemaglutinante da lectina de *Concanavalia A* (ConA), mas apenas em 1952 Watkins e Morgan demonstraram que a atividade aglutinante das lectinas baseava-se na atividade específica de ligação a açúcar. Desta maneira as lectinas passaram a ser reconhecidas como proteínas de ligação a carboidratos, distinguindo-se de outras proteínas com base em um critério funcional bem definido (VAN DAMME *et al.*, 1998).

### 1.5.2 Definição e classificação

A idéia de especificidade de ligação, que já havia se tornada clara, aliada à conscientização do caráter ubíquo destas proteínas na natureza, levou ao surgimento de uma nova definição para lectinas baseado primariamente na especificidade de ligação a açúcar e inibição da atividade hemaglutinante. Goldstein e colaboradores em 1980 definiram lectinas como sendo proteínas (ou glicoproteínas) de origem não imune capaz de aglutinar células e precipitarem gliconjugados, excluindo assim várias classes de proteínas monovalentes. Quase que concomitantemente, uma nova definição foi proposta por Kocourek e Horejsi (1981), definindo lectinas como proteínas ou glicoproteínas de natureza não imune que se ligam a carboidratos, sem apresentar atividade enzimática contra esses açúcares e que não requerem grupos hidroxilas livres para sua ligação.

Com base no que se conhece atualmente sobre as lectinas, Peumans e Van Damme (1995) definiram lectinas como todas as proteínas 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.

As lectinas podem ser classificadas como (Figura 9):

**a) Merolectinas:** Inclui lectinas que possuem apenas um sítio de ligação a carboidrato e, conseqüentemente, não são capazes de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados.

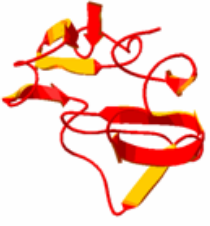
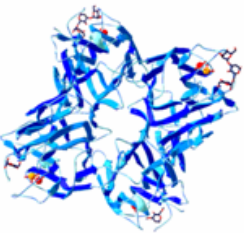





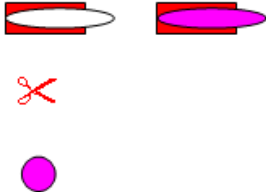
---

Exemplos dessa classe é a lectina heveína, proteína com ligação específica a quitina extraída do látex da seringueira (*Hevea brailiensis*) e as proteínas monoméricas com especificidade por manose, como as lectinas de espécies de orquídeas;

**b) Hololectinas:** Compreende aquelas lectinas que possuem dois ou mais sítios idênticos ou muito similares de ligação a um mesmo carboidrato, ou a carboidratos estruturalmente similares. Por definição essa classe de lectinas são multivalentes, sendo capazes de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados. Essa classe de lectinas está representada pelas hemaglutininas ou fitohemaglutininas (PEUMANS *et al.*, 2000);

**c) Quimerolectinas:** Engloba as lectinas que possuem um ou mais sítios de ligação a carboidratos, além de apresentarem atividade catalítica (ou outra atividade biológica não ligante a carboidrato) associada a outro domínio molecular, portanto, diferente do sítio de ligação a carboidrato (Figura 9). Como representantes dessa classe podem ser citadas as RIP's (proteínas inativadoras de ribossomos) (PEUMANS *et al.*, 1998);

**d) Superlectinas:** Essa nova classe de lectinas foi introduzida pelos mesmos autores em 1998. As superlectinas possuem dois sítios de ligação a carboidratos, os quais são, estruturalmente, diferentes e reconhecem açúcares não relacionados (Figura 9). Um único exemplo dessa classe de lectinas foi descrito até hoje, a lectina do bulbo da tulipa, TxLC-1 (*first Tulipa hybrid lectin with complex specificity*) que possui subunidades com um sítio específico para manose e outro para N-acetil-galactosamina, atuando de maneira totalmente independente. (VAN DAMME *et al.*, 1998).

Merolectina	Hololectina	Quimerolectina	Superlectina
 <p data-bbox="363 577 475 611"><b>Heveína</b></p>	 <p data-bbox="651 584 735 618"><b>Con A</b></p>	 <p data-bbox="922 595 1007 629"><b>Ricina</b></p>	
			
<p data-bbox="316 801 675 835"><b>Domínio carboidrato ligante</b></p> <p data-bbox="316 887 544 920"><i>Domínio catalítico</i></p> <p data-bbox="316 972 691 1005"><i>Domínio ribossomo inativante</i></p>			

**Figura 9.** Esquema de classificação de lectinas segundo Peumans e Van Damme (1995) e Van Damme *et al* (1998).

### 1.5.3 Estrutura das Lectinas

Segundo Cavada 2001, lectinas representam um grupo heterogêneo de proteínas, de origem não imune, que apresentam propriedades em comum de se ligar a carboidratos com alta especificidade. Essas proteínas representam um grupo com grande heterogeneidade estrutural, podendo diferir em vários aspectos tais como: composição de aminoácidos, massa molecular aparente, estrutura e número de subunidades, estrutura terciária, e ainda, pelo fato de conterem ou não íons metálicos ou cátions bivalentes em sua estrutura.

Grande parte destas proteínas pode ser agrupada em famílias distintas que exibem similaridades quanto às suas propriedades estruturais e de seqüência de aminoácidos.

Na família *Leguminosae*, encontram-se lectinas com alto grau de homologia na seqüência de aminoácidos, estrutura secundária e conformação tridimensional, evidenciando assim uma linha taxonômica bem definida (CAVADA *et al.*, 1993; SHARON e LIS, 1995). Yamamoto em 2001 descreveu que proteínas com domínios semelhantes aos de lectinas de leguminosas também foram encontrados em células animais.

A massa molecular aparente das lectinas exibem uma variação de 3,5 - 4,0 KDa (lectina de *Crotalaria striata*, KHANG *et al.*, 1990) a 480 KDa (lectina de rizoma de

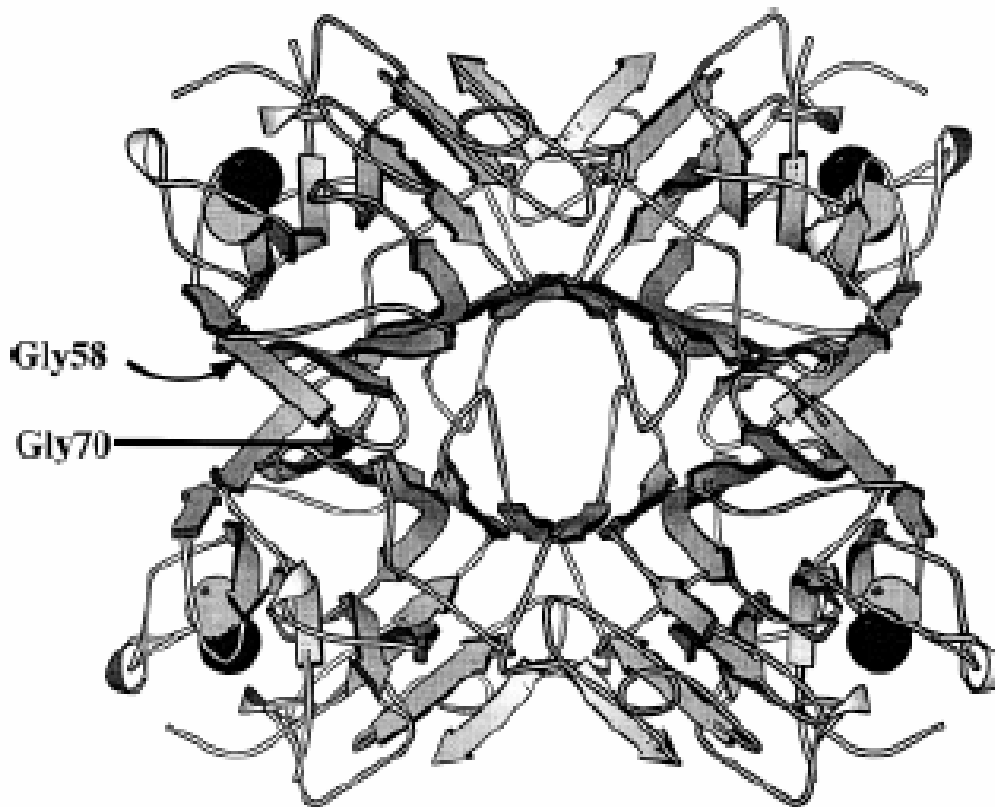
*Aegopodium podagraria*, (PEUMANS *et al.*, 1985). Outra característica observável é a presença de carboidratos em sua estrutura, cujo grau de glicosilação varia dentre as espécies (SHARON e LIS, 1989).

Lectinas consistem de subunidades, cujo número varia entre um, no caso da lectina de rizomas de *Urtica dioica* (PEUMANS *et al.*, 1984) a dez, no caso de uma das lectinas de *Araucaria angustifolia* (DATTA *et al.*, 1991). No entanto, as lectinas podem apresentar diferentes padrões de associações de suas subunidades dependendo da característica do meio onde se encontram (pH e temperatura) (DEL SOL *et al.*, 2006).

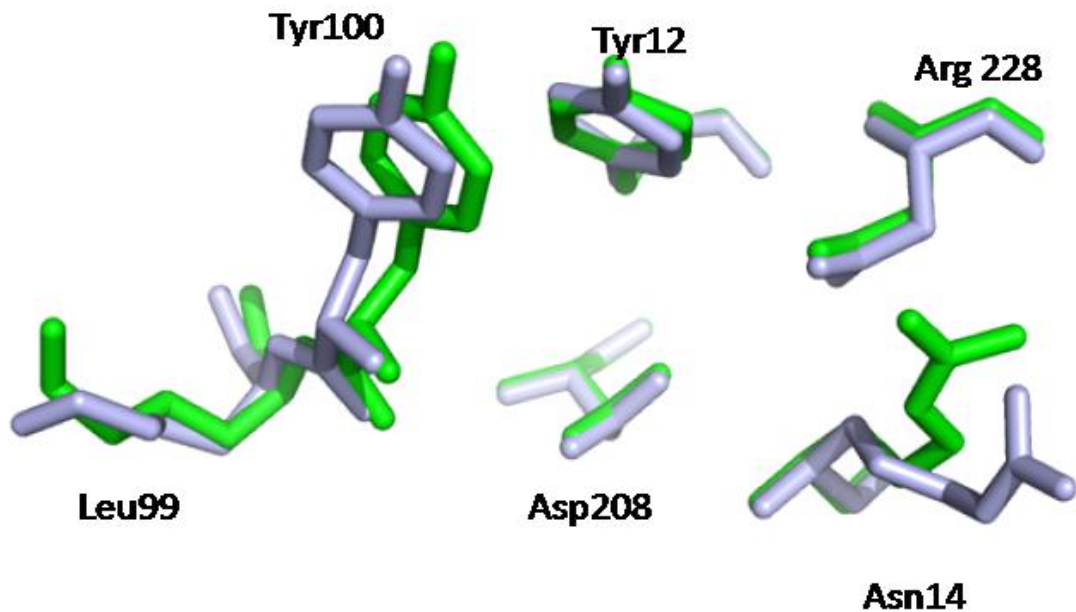
As lectinas de leguminosas, no geral, são compostas por duas ou quatro subunidades, iguais ou diferentes e com massa molecular em torno de 25 a 30 KDa. Frequentemente, estas subunidades são constituídas por um único esqueleto polipeptídico estabilizado por ligações não covalentes do tipo pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e eletrostáticas, podendo ou não formar dímeros canônicos. As lectinas da tribo Viciae (gêneros *Pisum*, *Vicia*, *Lathyrus*, e *Lens*) são dímeros onde cada subunidade igual é formada por duas cadeias polipeptídicas diferentes, uma cadeia polipeptídica leve (cadeia  $\alpha$ ) com massa de 5-7 KDa e uma cadeia polipeptídica pesada (cadeia  $\beta$ ) com massa de 15-19 KDa, estabilizadas por ligações não covalentes. (SHARON & LIS, 1989). Já as lectinas de espécies pertencentes à subtribo Diocleinae são tetrâmeros compostos por uma mistura de subunidades intactas formadas por uma cadeia polipeptídica (cadeia  $\Leftrightarrow$ ) com 237 resíduos de aminoácidos e de subunidades fragmentadas, nas quais a mesma cadeia polipeptídica está dividida em dois fragmentos ( $\Leftarrow$  e  $\Rightarrow$ ), devido ao fato de não ter havido a formação de uma ligação peptídica entre os resíduos 118 e 119 (CHRISPEELS *et al.*, 1986). Apesar de não estarem unidos covalentemente, os fragmentos são mantidos juntos por ligações não covalentes e formam um protômero cuja estrutura tridimensional é a mesma da subunidade formada pela cadeia íntegra (cadeia  $\Leftrightarrow$ ), sem descontinuidade da estrutura primária (BECKER *et al.*, 1975; SHARON e LIS, 1989).

Um exemplo da alta similaridade entre lectinas pertencentes à subtribo Diocleinae são as lectinas ConA e ConBr. Essas proteínas apresentam alta similaridade estrutural e homologia na seqüência de aminoácidos, A estrutura cristalina de ConBr mostra a mudança apenas de dois aminoácidos em relação a lectina ConA (Gly-58 e Gly-70 são substituídos em ConA por Asp e Ala respectivamente). Nenhum dos dois resíduos de aminoácidos estão próximos ao sitio de ligação a carboidrato em ambas lectinas, no entanto esta pequena diferença faz com que a estrutura da lectina ConBr seja mais aberta do que a lectina ConA (Figura 10 e 11). Isso ocorre devido a presença do resíduo de glicina na posição 58 de ConBr

que no caso de ConA é substituído por ácido aspártico. Este resíduo de aminoácido se encontra na subunidade A da proteína e interage com uma serina na posição 62 da subunidade C, ligação não evidenciada em ConBr (SANZ-APARICIO *et al.*, 1997; GRANGEIRO *et al.*, 1997).



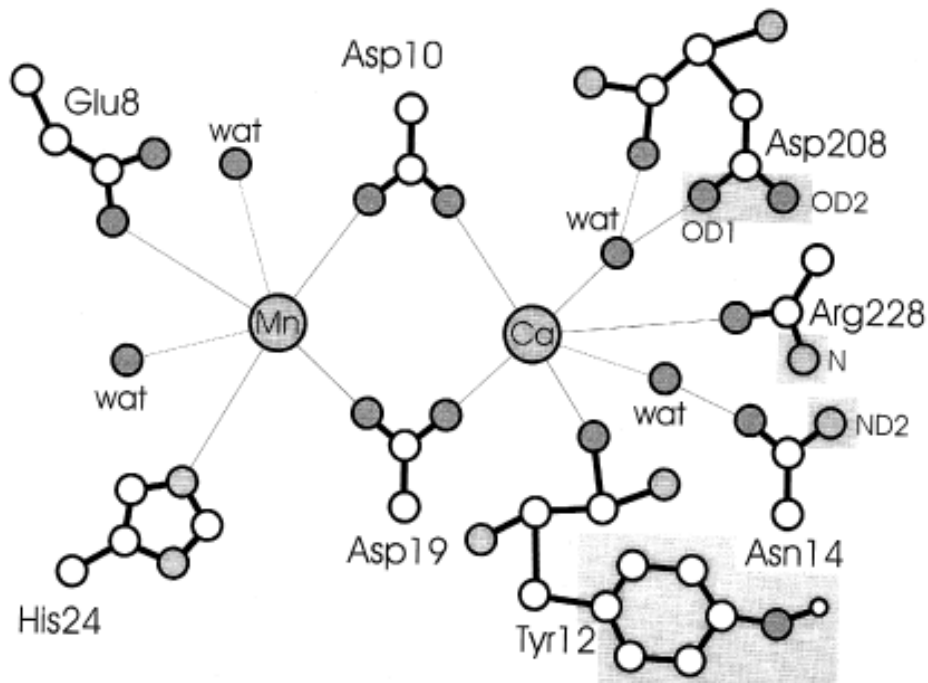
**Figura 10.** Estrutura tetramérica de ConBr lectina pertencente a subtribo Diocleinae. Resíduos de aminoácidos Gly 58 e Gly 70, na lectina ConA são substituídos por Asp e Ala respectivamente (SANZ-APARICIO *et al.*, 1997).



**Figura 11.** Sobreposição de ConBr (Cinza), ConA (Verde) no domínio de reconhecimento a carboidrato (CRD) mostrando diferenças no arranjo espacial dos resíduos de aminoácidos que compõem o CDR. (Fonte: Comparação das estruturas da lectina de sementes de *Canavalia brasiliensis* (código de Acesso PDB: 1AZD) e lectinas de sementes de *Canavalia ensiformes* (Código de acesso PDB: 2UU8) disponíveis em [www.pdb.org](http://www.pdb.org))

As lectinas podem ser encontradas em diferentes formas moleculares, como as isoformas ou isolectinas. Isto pode ser determinado por pequenas mudanças na seqüência de aminoácidos. Um exemplo clássico deste caso é a lectina de sementes de *Datura stramonium* que é formada por duas subunidades diferentes, A com 32 KDa e B com 28 KDa, podendo ser associadas originando três isoformas com as seguintes estruturas: AA, AB e BB (SHIBUYA *et al.*, 1986).

Grande parte das lectinas, como as lectinas pertencentes aos gêneros *Dioclea* e *Canavalia* são metaloproteínas, ou seja, necessitam de íons metálicos divalentes (geralmente  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$ ), para exercer a atividade de reconhecimento e ligação a carboidratos. Esta região ligante a íons metálicos foi primeira descrita na concanavalia A por Hardman e colaboradores em 1982, onde ambos os metais possuem ligação a quatro resíduos de aminoácidos e duas ligações com uma molécula de água (Figura 12) (HARDMAN *et al.*, 1982).

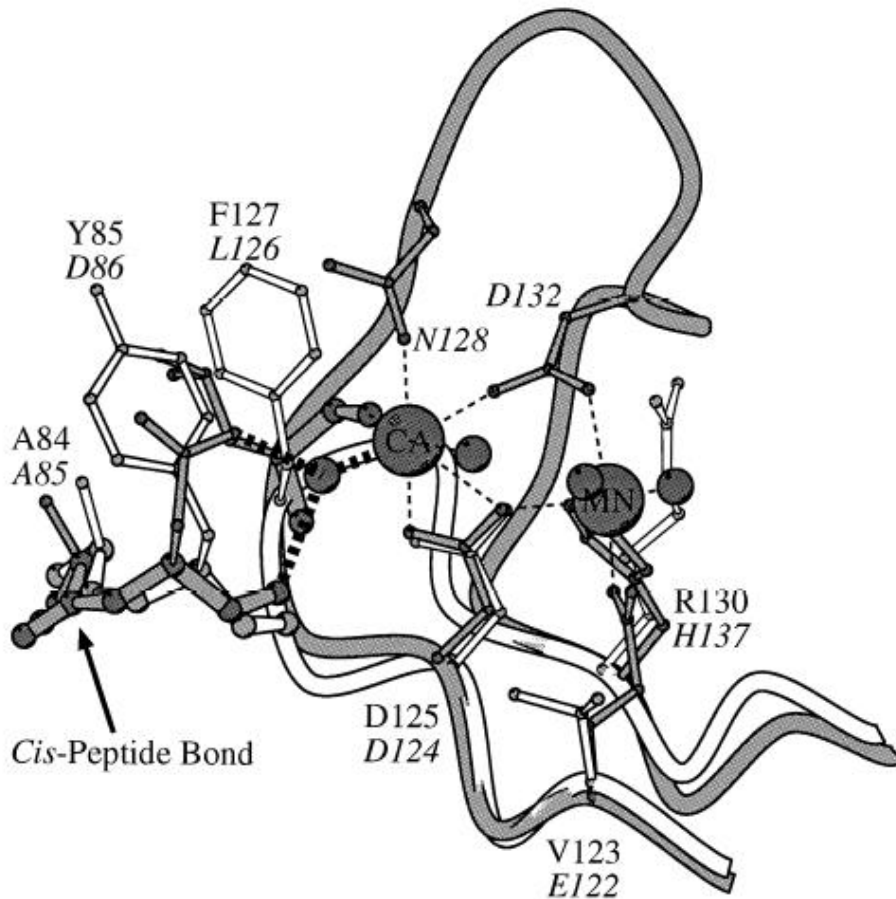


**Figura 12.** Representação esquemática dos sítios de ligação a metal na lectina de *Canavalia ensiformis* (LORIS *et al.*, 2004).

Estes íons ligam-se a sítios específicos na estrutura protéica, o que é fundamental para o estabelecimento do sítio de ligação a carboidratos e para conferir alto grau de estabilidade estrutural à molécula, protegendo-a contra a inativação (CAVADA *et al.*, 1993; CAVADA *et al.*, 1996) (Figura 13).

De acordo com SHARMA e SUROLIA (1997), o sítio de reconhecimento a carboidratos é formado de diversos *loops* com diferentes graus de variabilidade. As conformações destes “*loops*” são determinadas pela presença na estrutura de íons metálicos, como o  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$ , cuja ausência resulta em uma instabilidade local e na perda da capacidade de ligar-se a carboidratos (LORIS *et al.*, 2004).





**Figura 13.** Região do sítio de ligação a íons metálicos,  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$ , da lectina de *Phaseolus vulgaris* (LORIS *et al.*, 2004).

Algumas lectinas de leguminosas possuem ainda sítios de ligação hidrofóbicos que não interferem com os sítios de ligação a carboidratos (ROBERTS & GOLDSTEIN, 1982, ROBERTS & GOLDSTEIN, 1984). A função, nos organismos originais, desses sítios de ligação permanece obscura, mas o fato destes sítios estarem presentes em lectinas de leguminosas de diferentes espécies sugere que apresentam uma importante função biológica (HAMELRYCK *et al.*, 1999). Um desses sítios apresenta alta afinidade ( $10^6 \text{ M}^{-1}$ ) por adenina e certos derivados dessa base nitrogenada (ROBERTS & GOLDSTEIN, 1983). Este sítio já foi encontrado em lectinas tetraméricas e lectinas diméricas de leguminosas e pode ser encontrado sob duas formas: dentro da subunidade ou os que se estabelecem no centro do tetrâmero. Na lectina de *Canavalia ensiformis*, o sítio da subunidade liga-se ao hormônio

---

vegetal ácido indolacético do grupo das auxinas (EDELMAN & WANG, 1978) e o outro sítio, existe como uma cavidade única por tetrâmero, que se liga a adenina e também citocinas, que são hormônios derivados da adenina (SHARON e LIS, 1990).

Recentemente Delatorre e colaboradores determinaram a estrutura cristalográfica da lectina de ConM, isolada e purificada de sementes de *Canavalia maritima*, complexada naturalmente, via sítio hidrofóbico, com um aminoácido não protéico, ácido  $\alpha$ -aminobutírico, evidenciando uma importância fisiológica das lectinas dentro do desenvolvimento dos vegetais (DELATORRE, 2006).

Diversos tipos de ligações estabilizam a estrutura quaternária das lectinas, e uma dessas, muito presente nas lectinas de algas, estas ligações, conhecidas como pontes dissulfeto, são formadas entre resíduos de cisteína. Esse tipo de ligação permite uma alta estabilização da sua conformação, tornando-a bastante resistente a processos físicos e químicos, como elevação da temperatura e tratamento com solventes orgânicos, respectivamente. Para representar esse fato temos como exemplo, contendo na sua estrutura sete pontes dissulfeto, a lectina de alga vermelha *Hypnea musciformes* (NAGANO *et al.*, 2002).

#### 1.5.4 Distribuição das lectinas

Lectinas mostram ser uma classe de proteínas amplamente distribuídas na natureza por terem sido isoladas de todas as classes e famílias de seres vivos (algas, vertebrados, invertebrados e microrganismos, incluindo fungos e bactérias) e até mesmo em vírus (LIENER *et al.*, 1986), apresentando uma grande variedade de formas e tamanhos, desempenhando papéis biológicos em muitos processos celulares, tais como comunicação celular, defesa de hospedeiros, fertilização, desenvolvimento, infecção parasitária e metástase tumoral (GABIUS e GABIUS, 1997; DEL SOL *et al.*, 2007).

Lectinas encontradas em bactérias podem estabelecer um papel funcional nas etapas iniciais de infecções, por exemplo, quando ocorre a aderência das bactérias a células epiteliais do trato urinário e gastrointestinal. As lectinas de bactérias também podem agir como moléculas de reconhecimento por macrófagos de camundongos na fagocitose de bactérias na ausência de opsoninas. O mesmo acontece em macrófagos peritoneais, linfócitos e polimorfonucleares humanos (SHARON, 1987). O microrganismo *Porphyromonas gingivalis*, um patógeno com importância etiológica em doenças periodontais, liga-se através

---

de suas fímbrias a estruturas periodontais contendo glicoproteínas, evidenciando claramente um efeito “lectin-Like” (SOJAR *et al.*, 2004).

Em alguns vírus, lectinas parecem estar envolvidas no processo de adesão à célula hospedeira. Um exemplo é a infecção promovida pelo vírus da influenza, onde o início do evento de adesão é mediado por uma aglutinina da capa do vírion que reconhece e se liga a resíduos de ácido siálico da superfície celular (GLICK *et al.*, 1991). Lectinas também desempenham papel importante na doença da dengue, promovendo a adesão do patógeno junto às células do sistema imunológico, principalmente macrófagos. A presença de um receptor de manose faz a mediação para a infecção destas células pelo vírus da dengue, o qual possui uma lectina que reconhece e se liga fortemente a tal receptor (MILLER *et al.*, 2008).

Avanços importantes têm sido relatados no campo do combate a malária, no qual a expressão de uma lectina isolada do pepino do mar em mosquitos anofelinos impede o desenvolvimento de protozoários do gênero *Plasmodium*, causadores da malária (YOSHIDA *et al.*, 2007). Em protozoários, a lectina de *Entamoeba histolytica* parece desempenhar importante papel na etapa de aderência à célula hospedeira (células epiteliais do cólon), possuindo ainda, um papel na citotoxicidade celular, distinto da função de aderência (SAFFER e PETRY, 1991).

O número de trabalhos envolvendo lectinas isoladas de algas marinhas é ainda pequeno, porém tem crescido bastante nos últimos anos. As algas vermelhas são as que apresentam o maior número de espécies com atividade hemaglutinante seguidas das algas pardas e verdes (SAMPAIO, 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) e 9.3 KDa para *Hypnea musciformes* (NAGANO *et al.*, 2002) até 64,5 KDa para a lectina de *Ptilota serrata* (ROGERS *et al.*, 1990). De uma maneira geral, a atividade hemaglutinantes das lectinas de algas marinhas não é dependente da adição de cátions divalentes e não são inibidas pela presença de açúcares simples (SAMPAIO, 1992 e 1997).

Lectinas isoladas de invertebrados estão presentes em praticamente todas as classes examinadas, como caranguejos (UMETSU *et al.*, 1991), larvas de insetos (GRUBHOFFER e MATHA, 1991), carrapatos (SHARON e LIS, 1989), ouriço do mar (YAMADA e AKETA, 1982) e insetos (YU e KANOS, 2000), onde estão presentes principalmente na hemolinfa e órgãos sexuais (SHARON e LIS, 1989). 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).

Lectinas de vertebrados apresentam-se de duas maneiras mais comuns: 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. Em peixes, tem sido isolada uma lectina dependente de cálcio com funções ainda não muito claras (SUZUKI *et al.*, 2003).

Em seres humanos, dentre os vários tipos de lectinas existentes, uma delas possui importância fundamental no mecanismo de deflagração do sistema complemento, o que, recentemente, modificou todo o entendimento imunológico dessa cascata de proteínas, por indicar uma nova via além da clássica e da via alternativa entendidas como únicas até então. Trata-se da “manose-binding lectin” ou MBL que é capaz de disparar a fixação do complemento após ligar-se à estrutura de algum microrganismo invasor (NAUTA *et al.*, 2004). Além disso, a MBL possui um grande potencial em remover imunocomplexos circulantes, que são responsáveis por inúmeras doenças autoimunes como o lupus eritematoso sistêmico e a artrite reumatóide (SAEVARSOTTIR *et al.*, 2004).

### 1.5.5 Atividade Biológica

Stilmark em 1888, em sua tese de doutorado demonstrou a capacidade de lectinas de aglutinarem células (BEUTH *et al.*, 1995), mais além desta atividade essas proteínas vem demonstrando uma série de outras atividades. Entre estas se destacam: indução da proliferação de linfócitos e da produção de interferon- $\rightarrow$  (BARRAL-NETO *et al.*, 1992); estimulação de macrófagos e liberação de peróxido de hidrogênio (RODRIGUEZ *et al.*, 1992); indução da migração de leucócitos (BENTO *et al.*, 1993); indução da liberação de histamina (GOMES *et al.*, 1994); proteção parcial *in vivo* em animais infectados com *Leishmania amazonensis* e reconhecimento da forma metacíclica promastigota da *Leishmania braziliensis* por *Bauhinia purpurea* (PINTO -da- SILVA *et al.*, 2002); indução da produção *in vivo* e *in vitro* de óxido nítrico por células peritoneais (ANDRADE *et al.*, 1999); indução de apoptose (BARBOSA *et al.*, 2001); atividade antiinflamatória e pró-inflamatória de lectinas animais e vegetais (ASSREUY *et al.*, 1997; ASSREUY *et al.*, 1999; ALENCAR *et al.*, 1999) atividade analgésica (SAYYAH *et al.*, 2004), efeitos renais em rim isolado perfundido *in vitro* (TEIXEIRA *et al.*, 2001); interferência em mecanismos parasitários (JACOBSON e DOYLE, 1996); utilização de lectinas em endereçamento de drogas (SHARMA *et al.*, 2004; BIES *et*

*al.*, 2004; SMART, 2004). Recentemente Molchanova e colaboradores (2006) em seu trabalho, isolou uma lectina, galactose específica, de um anelídeo marinho que possui atividade anti-HIV.

As lectinas têm se mostrado ferramentas poderosas tanto para propósitos analíticos como para pesquisas em bioquímica, biologia celular, imunologia e áreas relacionadas. Uma de suas maiores contribuições tem sido no esclarecimento do papel de membranas celulares e subcelulares e na bioadesão celular. Nesses estudos tem sido utilizadas lectinas marcadas, quer radioativamente, quer com fluoresceína ou com imunomarcadores (RAPIN e BURGER, 1974; SHARON e LIS, 1986; BIES *et al.*, 2004).

Sobre a interação entre rizóbios e planta hospedeira lectinas demonstram possuir uma serie de atividades biológicas como: atracamento de rizóbios nos pêlos radiculares mediados por estas proteínas (KIJNE, *et al.*, 1997), aglutinação de rizóbios próximo das raízes de leguminosas (VANDENBOSCH *et al.*, 1994), reconhecimento de fatores Nod (VAN RHIJN *et al.*, 1998; ETZLER *et al.*, 1999), estímulo da adesão bacteriana mediado pelo tratamento com lectinas (LODEIRO *et al.* 2000), aumentando a infecção bacteriana nas raízes (BRELLES-MARIÑO *et al.* 1996), lectinas modulando positivamente o metabolismo de rizóbios pelo aumento do efluxo de H<sup>+</sup> (MARTINEZ *et al.*, 2002).

## 1.6 Objetivos

Esta dissertação teve como objetivo, avaliar a atividade das lectinas isoladas de sementes de *Canavalia brasiliensis* e *Canavalia ensiformis* sobre o crescimento “*in vitro*” de *Rhizobium tropici*. Também tem como objetivo, estudar a influência da estrutura tridimensional dos sítios de ligação destas lectinas em sua atividade biológica sobre o crescimento do micorganismo. Para alcançar tais objetivos, foram realizados ensaios de crescimento bacteriano em placa de microtitulação e o estudo da interação lectina/*Rhizobium tropici* por microscopia de fluorescência.

---

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Isolamento e purificação das lectinas

As lectinas utilizadas nestes experimentos foram cedidas gentilmente pelo Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada.

A etapa da pesquisa relacionada à obtenção e purificação das lectinas de sementes de *Canavalia brasiliensis* e *Canavalia ensiformis* foi realizada no Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas (BIOMOL – LAB), do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

**Tabela 3.** Lectinas utilizadas nos experimentos com suas respectivas siglas, especificidades por carboidratos e referência.

Lectinas vegetais	Siglas	Especificidade	Referências
<i>Canavalia brasiliensis</i>	ConBr	Glucose/Manose	Moreira e Cavada <i>et al.</i> , 1984
<i>Canavalia ensiformis</i>	ConA	Glucose/Manose	Moreira e Cavada <i>et al.</i> , 1984

### 2.2 Bactéria

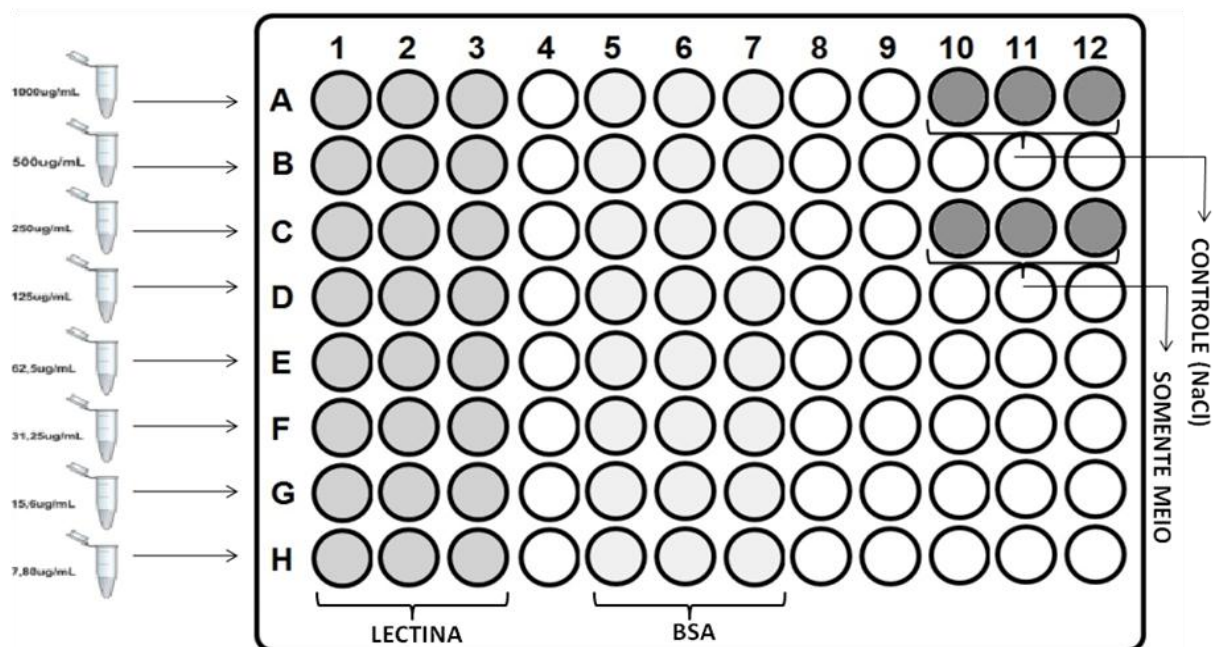
O microrganismo utilizado na pesquisa foi à estirpe de *Rhizobium tropici* CIAT 899, selecionada como eficiente para a fixação de nitrogênio atmosférico no feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*).

### 2.3 Ensaio de crescimento bacteriano em placa de microtitulação

As bactérias foram crescidas inicialmente em meio YM - Yeast-mannitol (VICENT *et al.*, 1970) por 48 horas a 28°C sob agitação constante. Após essa ativação inicial, a cultura foi renovada nas mesmas condições descritas acima. As células bacterianas foram então centrifugadas três vezes e ressuspensas em NaCl 0,15M (4500 rpm, por 5 min, a

4°C). Em seguida, a cultura foi ajustada á uma concentração aproximada de  $10^8$  UFC/mL utilizando a diluição 0,5 da escala de MacFarland.

As soluções de lectinas ConBr e ConA foram distribuídas (100 $\mu$ L) nas concentrações de 1mg/mL a 7,8 $\mu$ g/mL, e em seguida adicionado 100 $\mu$ L da suspensão bacteriana e incubados a 28°C por 12 horas. Após esse período foi retirada uma alíquota de 20 $\mu$ L de cultura de rizóbio em contato com lectina e inoculado em 180  $\mu$ L de YM em placa de microtitulação. Após esse procedimento a placa foi incubada a 28°C e realizado leituras periódicas nos tempos 0, 12, 24, 36 e 48 horas a 620nm em leitor de ELISA (BioTrak II – Plate Reader). Como controles foram utilizados NaCl 0,15M e albumina sérica bovina (BSA, nas mesmas concentrações da lectina).

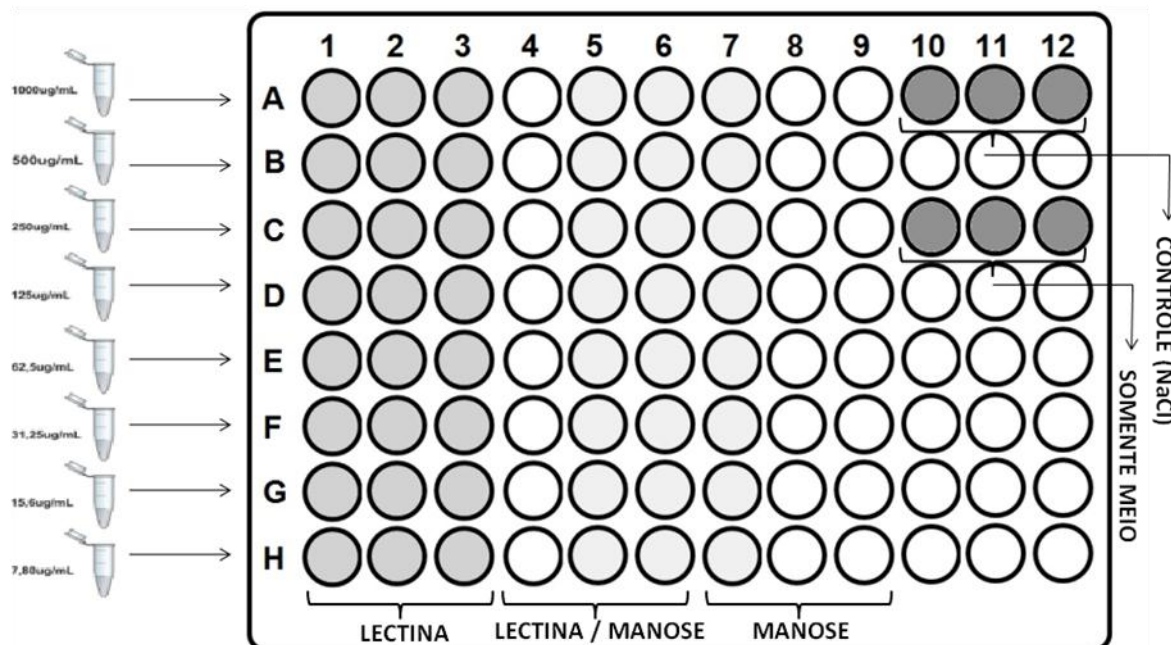


**Figura 14.** Representação esquemática da montagem da placa de 96 poços para o ensaio de atividade de crescimento microbiano.

## 2.4 Reversão da atividade da lectina com açúcar inibidor

Para a lectina (ou lectinas) que tenha atividade biológica com relação ao crescimento de *Rhizobium tropici*, quando comparada com o controle, foi investigado o envolvimento de resíduos de manose com efeito inibitório sobre o sítio de ligação lectínico. A lectina foi pré-incubada com 0,1M de  $\alpha$ -D-manose por 1 hora a 37°C, e após esse tempo foi utilizada no ensaio de crescimento bacteriano como descrito anteriormente. Foi utilizado

como controle NaCl 0,15M e 0,1M de  $\alpha$ -D-manose para investigar qualquer interferência do açúcar sobre o crescimento bacteriano.



**Figura 15.** Representação esquemática da montagem da placa de 96 poços para o ensaio de inibição atividade da lectina sobre o crescimento microbiano.

## 2.5 Estudo da interação lectina/*Rhizobium tropici* por microscopia de fluorescência

### 2.5.1 Marcação das lectinas e do BSA com (Isotiocianato de fluoriscéina) (FITC)

O processo de marcação de lectinas e do BSA foi realizado utilizando o protocolo de marcação do kit de marcação de anticorpos “FLUOROTAG™ FITC CONJUGATION KIT” Stock No. FITC-1 da SIGMA Chemical Company.

As lectinas ConBr e ConA, além da proteína controle BSA, foram dissolvidas em 1mL de tampão carbonato/bicarbonato de sódio 0,1M pH 9,0 na concentração de 5mg/mL. Após rápida agitação foi adicionada à mistura 250µL de uma solução de FITC (1mg/mL) sendo submetida à agitação constante por 2h ao abrigo da luz. Após incubação, a fração contendo lectina conjugada com FITC foi separada da FITC não conjugada por meio de cromatografia de exclusão molecular em coluna PD 10 (Pharmacia LKB – 9,0mL), previamente equilibrada com 30 mL de tampão fosfato salina 0,01M (contendo ainda: 138



mM de KCl e 27mM de NaCl) pH 7,4 e com fluxo contínuo mantido por força da gravidade. A amostra contendo lectina e FITC foi aplicada a coluna e a amostra foi eluída em 10 mL de PBS, coletando alíquotas de 1 mL, sendo monitorada a absorvância de cada alíquota a 280nm e 495 nm em espectrofotômetro. Após as leituras as alíquotas com absorvância maior que 0,400 foram coletadas e dialisadas contra água mili-Q para posterior liofilização e estocagem do material para uso posterior.

### **2.5.2 Determinação da Atividade Hemaglutinante das lectinas associadas com FITC**

Para determinar a viabilidade das lectinas associadas com FITC (ConBr/FITC e ConA/FITC), foram realizados ensaios de hemaglutinação.

Os testes de atividade hemaglutinante foram realizados com hemácias de coelho. O sangue coletado foi submetido à centrifugação por 10 minutos a 4000 rpm, o sobrenadante foi descartado e as hemácias foram lavadas com solução de NaCl 0,15M por 5 ciclos de centrifugação (10 minutos a 4000 rpm). As hemácias lavadas foram diluídas a 2% em NaCl 0,15M para posterior uso.

Uma alíquota de 100µL das lectinas na concentração de 100µg/mL foi adicionada em tubos de ensaio contendo tampão TRIS-NaCl 0,15M. Terminadas as diluições, foram adicionados 100µL da suspensão de hemácias a 2% (v/v). Os tubos foram deixados a 37°C por 30 minutos e após esse tempo deixados a temperatura ambiente. A análise da hemaglutinação foi realizada após 1 e 12 horas após o contato das lectinas com a solução de hemácias.

Após o tempo de 12 horas uma alíquota de cada amostra foi adicionada a uma lâmina de microscópio e a aglutinação das hemácias foi verificada por microscopia óptica

### **2.5.3 Microscopia de fluorescência**

Lectinas (ConBr e ConA), lectinas inibidas com manose (ConA + Manose e ConBr + Manose) e BSA associadas com FITC foram colocadas sobre agitação constante com as células bacterianas por 15 minutos. Passado esse tempo as células foram centrifugadas três vezes e ressuspendidas em tampão fosfato sódio 0,1 M (4500 rpm, por 5 min, a 4°C). As células bacterianas foram então deixadas secar sobre lâminas de microscópio e visualizada em microscópio de fluorescência. Processo semelhante foi realizado com 0.1 mg de FITC (para observar a interação do marcador com a parede bacteriana). Células bacterianas sem qualquer

tipo substância também foram observadas sobre microscopia de fluorescência, para a detecção de fluorescência natural.

As imagens de fluorescência foram obtidas usando o sistema de microscopia Olympus System Microscope Model BX60, com lâmpada de mercúrio de 100W e filtro para fluoresceína (excitação de 490 nm e emissão de 520 nm). Cada imagem foi visualizada usando uma objetiva de imersão de 100x e ocular de 10x (aumento total de 1000x). A câmera de captura acoplada ao sistema foi uma Evolution MP 5,0 cooled (MediaCybernetics, Silver Spring, MDI, USA), com tempo de exposição de 1,5 segundos e ganho igual a 1. As imagens foram salvas em formato JPEG.

## 2.6 Análise estatística

Os experimentos de crescimento microbiano foram realizados em três repetições (uma repetição por dia em dias consecutivos) com três amostragens de absorvância ( $ABS_{620}$ ) por experimento. Cada experimento constituiu um grupo experimental: Controle (NaCl), BSA, Manose, ConA, ConBr, ConA inibida com manose (caso necessário) e ConBr inibida com manose (caso necessário). Foi determinado o valor médio de  $ABS_{620}$  das três amostragens para cada repetição. Para identificar alguma diferença entre os valores médios de  $ABS_{620}$  entre as três repetições de cada grupo, foi utilizado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis. Caso fossem detectadas diferenças, a seqüência de três repetições seria novamente realizada, até que nenhuma diferença fosse encontrada, resultando assim em um total de nove amostras por grupo. Foi determinado novamente o valor médio de  $ABS_{620}$  de cada grupo, agora sobre nove amostras. Para cada grupo foi realizado o teste de normalidade Shapiro-Wilk para a determinação da normalidade ou não do grupo.

Em caso de distribuição normal, foi determinado o desvio padrão ( $\sigma$ ) e o erro de estimativa ( $E$ ), conforme a relação:

$$E = t_{\alpha/2} \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Onde  $\alpha$  é o nível de significância,  $n$  é o número de amostras e  $t_{\alpha/2}$  é o parâmetro da distribuição de Student  $t$ , que depende de  $\alpha$  e  $n$ . O intervalo de confiança para  $ABS_{620}$  será dado por:

$$\overline{ABS}_{620} \pm E$$

---

Onde  $\overline{ABS}_{620}$  é o valor médio de  $ABS_{620}$ . O teste-t para duas amostras foi utilizado para comparar a existência de diferenças significativas entre os grupos BSA, Manose, ConA, ConBr, ConA inibida com manose (caso este grupo exista) e ConBr inibida com manose (caso este grupo exista) com o grupo controle (NaCl) e ainda ; e ainda ConA inibida com manose (caso este grupo exista) com Com A e ConBr inibida com manose (caso este grupo exista) com ConBr.

Em caso de não normalidade da distribuição amostral dos grupos, foi utilizado o teste não paramétrico Mann-Whitney para duas amostras.

O nível de significância utilizado foi 0,01. Toda a análise estatística dos experimentos de crescimento microbiano foi realizada no programa Statistica 6.0 (StatSoft, inc).

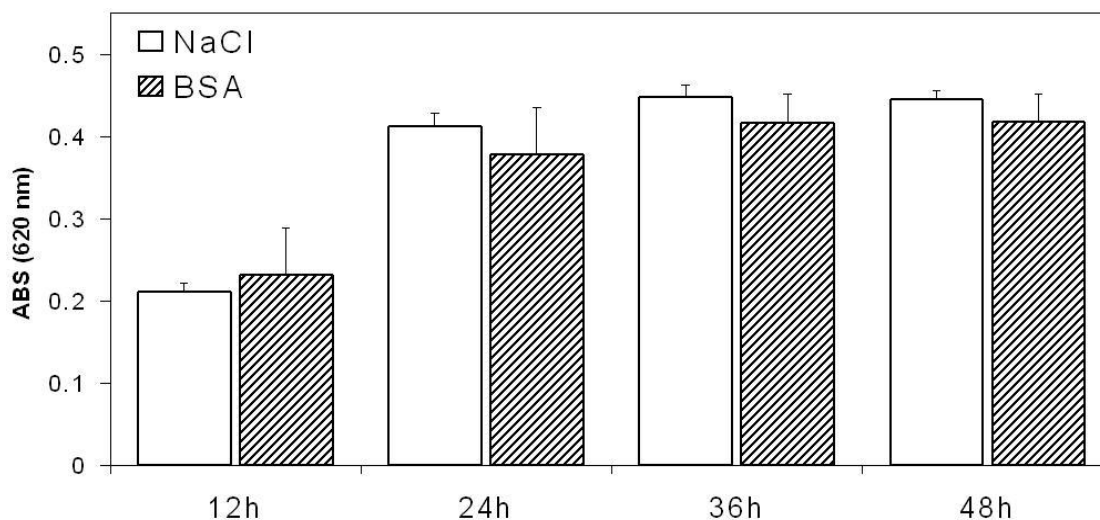
### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Ensaio de crescimento bacteriano em placa de microtitulação

A atividade de crescimento microbiano das lectinas *Canavalia ensiformis* (ConA), *Canavalia brasiliensis* (ConBr) e do controle utilizando albumina sérica bovina (BSA) foram testadas em placas de microtitulação com a estirpe bacteriana *Rhizobium tropici* CIAT899 (Figura 16, 17 e 18).

##### 3.1.1 Ensaio de crescimento microbiano utilizando albumina sérica bovina (BSA)

A proteína utilizada como controle, albumina sérica bovina (BSA), em testes de crescimento microbiano, não demonstrou diferença significativa em relação ao controle NaCl, mostrando assim que BSA não desempenhou qualquer atividade sobre o crescimento *Rhizobium tropici* em todas as horas testadas. A proteína BSA foi utilizada na maior concentração utilizada para a análise da sua possível atividade sobre o crescimento do microrganismo (Figura 16).



**Figura 16.** Atividade de BSA (albumina sérica bovina) sobre o crescimento microbiano de *Rhizobium tropici* CIAT899.

A proteína utilizada neste estudo como controle, albumina sérica bovina (BSA) é uma proteína amplamente estudada no campo da bioquímica. A BSA é a proteína mais abundante no plasma sanguíneo e possui função de depósito, assim como transporte de proteína para numerosos componentes, como cadeia longa de ácidos graxos ou bilirrubina,

---

ligados por alta afinidade à proteína. É a principal proteína que contribui para a pressão coloidal osmótica do sangue e também para o transporte de proteínas para numerosos compostos endógenos e exógenos. Com massa molecular de 66KDa, consiste em uma única cadeia polipeptídica, contendo cerca de 580 aminoácidos (NAKAMURA *et al.*, 1997). A albumina bovina (BSA) passa por notáveis mudanças reversíveis na conformação, usualmente sob condições não-fisiológicas (TATTINI *et al.*, 2006).

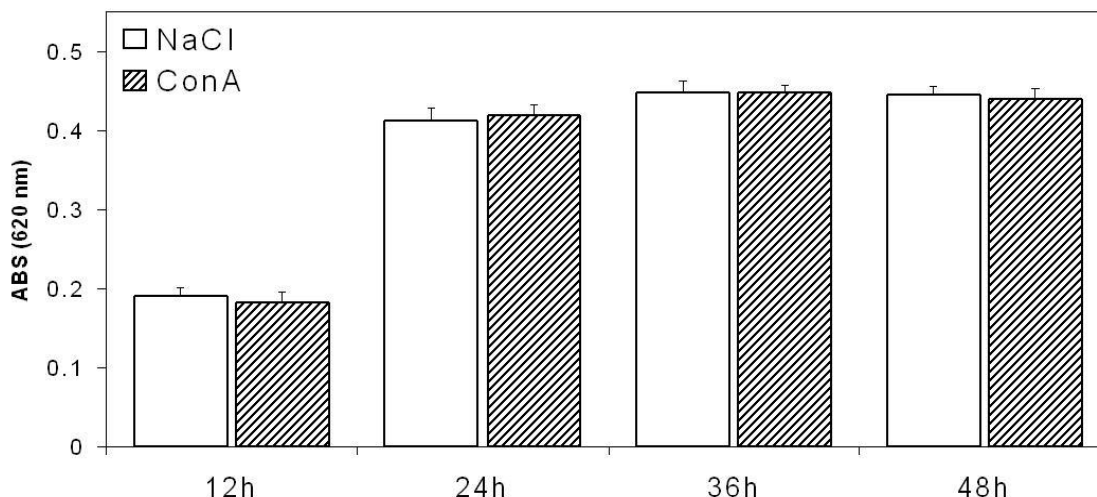
Por ser uma proteína de fácil isolamento em grandes quantidades, o que favorece a sua alta estabilidade e solubilidade, esta proteína vem sendo bastante utilizada em vários estudos bioquímicos (TATTINI *et al.*, 2006). Devido demonstrar características distintas de lectinas, como não apresentar sítios de ligação a carboidrato, essa proteína tem sido bastante explorada em ensaios diversos como modelo de comparação com a atividade biológica de lectinas (TEIXEIRA *et al.*, 2006; TEIXEIRA *et al.*, 2007; MARTINEZ *et al.*, 2004).

Nossos dados demonstraram que a proteína BSA não possui atividade efetiva sobre o crescimento de *Rhizobium tropici*, mostrando assim que a proteína não desempenhou nenhuma modificação metabólica sobre o microrganismo (Figura 16).

### **3.1.2 Ensaio de crescimento microbiano utilizando lectina isolada de *Canavalia ensiformis* (ConA)**

Para verificar uma possível atividade da lectina isolada de *Canavalia ensiformis* (ConA) sobre o crescimento microbiano foi utilizada para os testes a maior concentração utilizada no estudo (500µg/mL).

A lectina ConA não demonstrou nenhuma diferença com relação ao controle NaCl 0,15M, em todas as horas testadas. Demonstrando assim, que a lectina de *Canavalia ensiformis* não exerceu nenhuma atividade sobre o crescimento microbiano da estirpe de *Rhizobium tropici* CIAT 899 (Figura 17).



**Figura 17.** Atividade da lectina de *Canavalia ensiformis* (ConA) sobre o crescimento microbiano de *Rhizobium tropici* CIAT899.

A lectina ConA, obtida das sementes de *Canavalia ensiformis* foi a primeira lectina a ser isolada, seqüenciada e teve sua estrutura tridimensional determinada por cristalografia de raio-x. ConA é uma lectina D-glucose/D-manose específica e seu monômero contém 237 resíduos de aminoácidos. Muitos estudos bioquímicos, biofísicos e estruturais fizeram desta proteína a lectina de planta melhor caracterizada (CAVADA *et al.*, 2001).

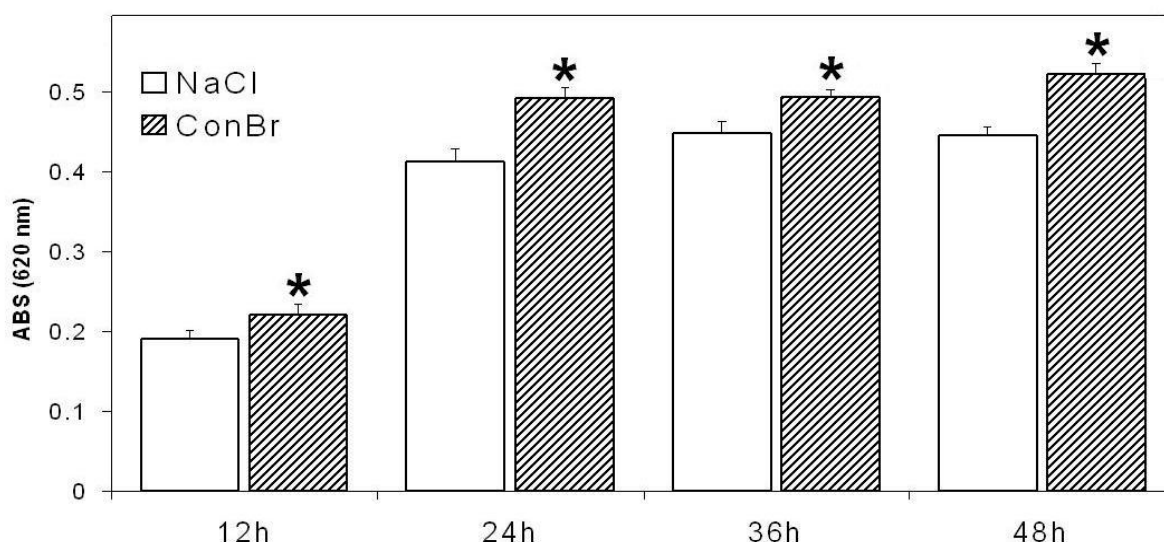
Esta lectina tem sido muito estudada e caracterizada quanto a sua estrutura e efeitos biológicos sobre diferentes sistemas. Foi utilizada no estudo da agregação bacteriana, com o intuito de inibir a agregação bacteriana provocada por componentes salivares com o intuito de se estudar a natureza dos receptores envolvidos (MIRTH *et al.*, 1981). No sistema nervoso central (SNC) a lectina ConA têm sido utilizada como ferramenta no isolamento de glicoproteínas (HELMNOLZ *et al.*, 2003). A lectina ConA mostra interação com diversas estirpes de rizóbio, incluindo as estirpes de *Rhizobium leguminosarum* e *Rhizobium phaseoli* (WONG, 1980).

Apesar de vários trabalhos demonstrarem a interação e atividade biológica de lectinas com especificidade a glucose/manose sobre bactérias fixadoras de nitrogênio (MARTINEZ, *et al* 2004; MARTINEZ, *et al* 2005; BAJAJ., *et al* 2001; ANTONYUK *et al.*, 1997), a lectina ConA não demonstrou nenhuma atividade sobre o crescimento de *Rhizobium tropici*, mostrando que esta lectina não desempenhou nenhuma modificação metabólica no microrganismo.

### 3.1.3 Ensaio de crescimento microbiano utilizando lectina isolada de *Canavalia brasiliensis* (ConBr)

A lectina de *Canavalia brasiliensis* foi testada para verificar a possível atividade desta proteína sobre o crescimento microbiano de *Rhizobium tropici*.

Os resultados mostraram uma melhor atividade da lectina ConBr sobre o crescimento microbiano de *Rhizobium tropici* nas maiores concentrações testadas (500µg/mL), sendo evidenciada estímulo sobre o crescimento microbiano nas horas 12, 24, 36 e 48 horas (todas as horas testadas) em relação ao controle NaCl 0,15M (Figura 18).



**Figura 18.** Atividade da lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) sobre o crescimento microbiano de *Rhizobium tropici* CIAT899.  $P < 0,01$  (\*) Diferença estatística da Lectina em relação a NaCl 0,15M.

A lectina ConBr isolada de sementes de *Canavalia brasiliensis* é uma lectina pertencente a subtribo Diocleina, que assim como ConA, possui ligação específica a D-glucose/D-manose. Esta proteína pode se apresentar na forma de monômero, dímero ou tetrâmero dependente das condições de pH, e mostra possuir uma série de atividades biológicas (SANZ-APARICIO *et al.*, 1997; GRANGEIRO *et al.*, 1997; RODRIGUEZ *et al.*, 1992; BARRAL-NETTO *et al.*, 1992; BARBOSA *et al.*, 2001; SUEN *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2009).

Como descrito anteriormente as lectinas de *Canavalia brasiliensis* e *Canavalia ensiformis* diferem entre si apenas em dois resíduos de aminoácidos, sendo que estes resíduos não estão próximos do sítio de ligação a carboidratos em ambas as proteínas (SANZ-APARICIO *et al.*, 1997; GRANGEIRO *et al.*, 1997). Apesar desta discreta diferença entre

estas duas lectinas, os resultados obtidos demonstraram diferentes atividades biológicas destas proteínas sobre o estímulo do crescimento de *Rhizobium tropici*. A ConBr estimulou o crescimento microbiano, enquanto a ConA não desempenhou qualquer atividade sobre o crescimento do microrganismo.

As lectinas de *Cavavalia ensiformis* e *Canavalia brasiliensis* têm apresentado diferentes efeitos biológicos em vários tipos de células relacionados à propagação de macrófagos peritoneais em camundongos (RODRIGUEZ *et al.*, 1992), estimulação de linfócitos humanos *in vitro* (BARRAL-NETTO *et al.*, 1992) ativação de linfócitos e apoptose (BARBOSA *et al.*, 2001), bem como a indução de apoptose em macrófagos de camundongos (SUEN *et al.*, 2000).

Recentemente Arruda (2009) em sua dissertação de mestrado demonstrou ainda diferentes atividades biológicas entre as lectinas de *Cavavalia ensiformis* e *Canavalia brasiliensis* em relação à atividade destas duas lectinas sobre a germinação de esporos de fungos fitopatogênicos. Em seus resultados a lectina de *Canavalia ensiformis* inibiu a germinação dos esporos do fungo fitopatogênico *Mucor sp.*, enquanto a lectina de *Canavalia brasiliensis* estimulou fortemente a germinação de esporos do mesmo fungo (ARRUDA, 2009).

Diferenças nas atividades biológicas entre as lectinas de *Cavavalia ensiformis* e *Canavalia brasiliensis* são explicadas por Sanz-Aparicio e colaboradores em 1997, onde o autor acredita que as atividades biológicas distintas apresentadas por estas duas proteínas deve-se ao fato de apenas uma substituição não-conservativa que afeta o sítio de ligação a carboidratos, fazendo com que este fique mais aberto em ConBr do que em ConA (SANZ-APARICIO *et al.*, 1997). Essa substituição não conservativa ocorre na posição 58 de ConBr, ocorrendo a substituição de um resíduo de glicina por um ácido aspártico, causando esta diferença estrutural entre essas proteínas (SANZ-APARICIO *et al.*, 1997).

A lectina de *Canavalia ensiformis* demonstra possuir um comportamento tetramérico homogêneo em pH acima de 7,0, ConBr apresenta uma mistura de dímeros (31%) e tetrâmeros (69%) em pH 8,0 (SANZ-APARICIO *et al.*, 1997; GRANGEIRO *et al.*, 1997). Segundo Cavada (2001) diferentes proporções entre as formas dimericas e tetramericas observadas nas lectinas da subtribo Diocleinae pode contribuir para diferentes potencialidades destas proteínas, podendo ser uma base para a explicação de atividades biológicas distintas entre ConA e ConBr.



Os resultados obtidos nesse trabalho demonstram que apenas ConBr desempenha atividade significativa sobre o crescimento microbiano de *Rhizobium tropici*, evidenciando assim a possibilidade da atividade de ConBr acontecer apenas na sua forma dimerica.

Estudos recentes mostram ainda que lectinas possam desempenhar diversas atividades biológicas sobre bactérias fixadoras de nitrogênio (MARTINEZ *et al.*, 2004; MARTINEZ, *et al* 2005; BAJAJ., *et al* 2001; SCHELUD'KO., *et al* 2006; SYTNIKOV, *et al* 2007). Porém poucos trabalhos têm explorado a atividade de lectinas sobre o crescimento de rizóbios.

A lectina de *Canavalia brasiliensis*, e outras lectinas de leguminosas, desempenham uma atividade significativa no estímulo respiratório da estirpe de *Rhizobium tropici* CIAT 899. O autor sugere que a atividade de ConBr sobre o estímulo da respiração de *Rhizobium tropici* seja pela interação da lectina com a membrana externa do microrganismo (MARTINEZ *et al.*,2004).

Em experimentos de agregação bacteriana, a lectina de *Canavalia brasiliensis* promoveu maior agregação das estirpes de rizóbio, *Rhizobium tropici*, *Rhizobium leguminosarum* bv. *Phaseoli* e *Rhizobium etli*, mostrando assim a interação entre ConBr e carboidratos de membrana destes microrganismos (MARTINEZ, *et al* 2005).

Os resultados obtidos demonstraram que a lectina de *Canavalia brasiliensis*, estimulou o crescimento da estirpe de *Rhizobium tropici* CIAT 899 em ensaios realizados em placa de microtitulação (Figura 18), enquanto que a lectina de *Canavalia ensiformis* não demonstrou qualquer estímulo sobre o crescimento microbiano desta estirpe (Figura 17).

A atividade da lectina ConBr sobre o crescimento de *Rhizobium tropici*, não evidenciado em ConA, demonstra possivelmente uma maior afinidade de ConBr a carboidratos expostos na membrana bacteriana do microrganismo causando modificações metabólicas no microrganismo.

### **3.2 Reversão da atividade da lectina com açúcar inibidor**

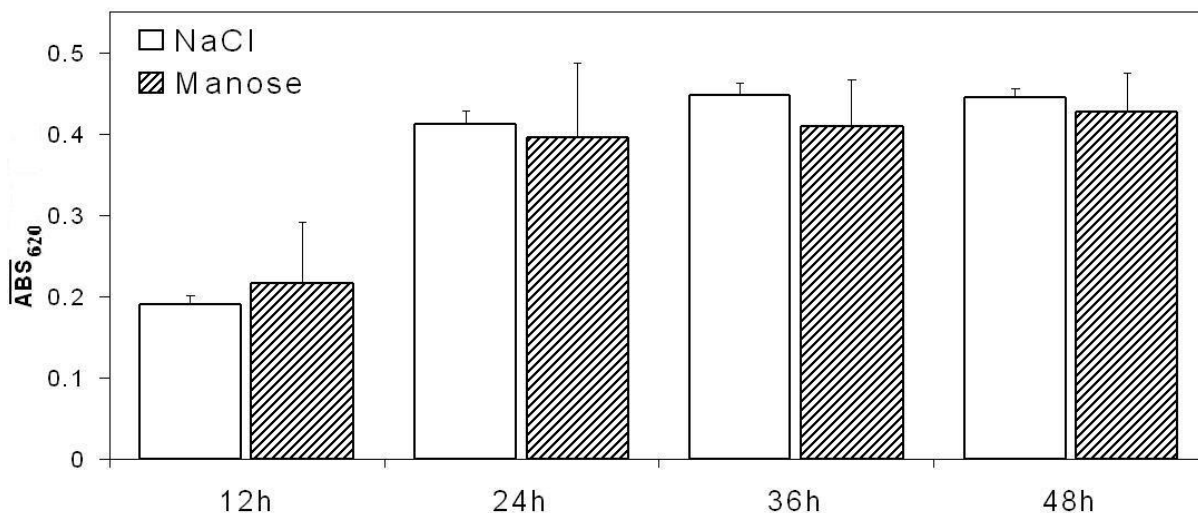
A atividade inibitória de resíduos de D-manose junto ao sítio de ligação da lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) foi testada sobre o crescimento microbiano da estirpe *Rhizobium tropici* CIAT899. O efeito apenas do açúcar inibidor ( $\alpha$ -D-manose) e da lectina ConBr complexada com açúcar inibidor (0,1 M de  $\alpha$ -D-manose) foram comparadas com o

controle (NaCl 0,15M). Também a lectina ConBr complexada foi comparada com a própria ConBr não complexada.

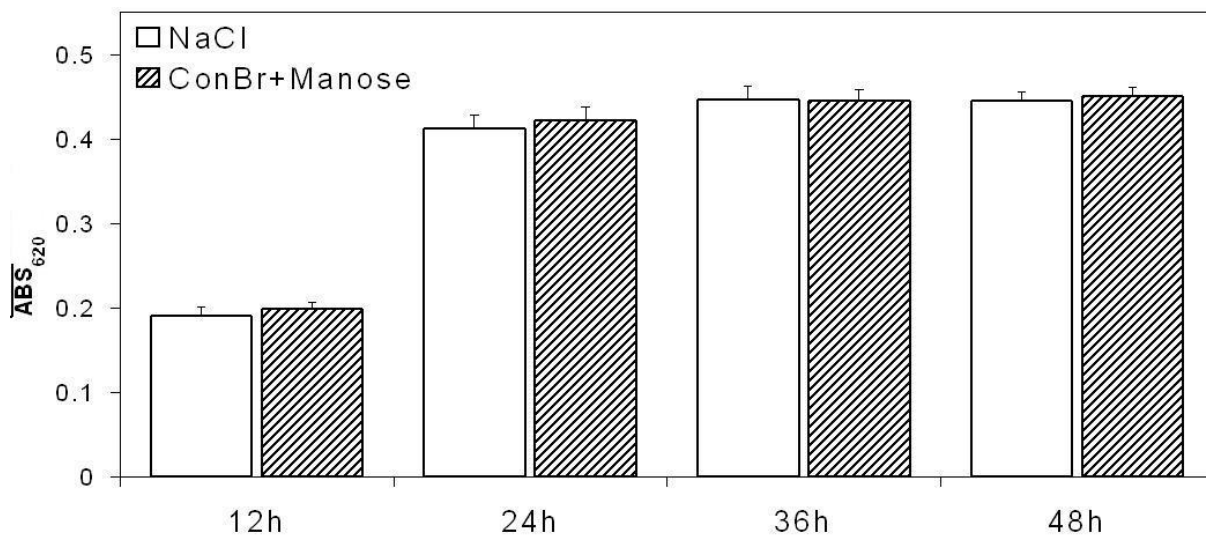
O açúcar inibidor utilizado não demonstrou atividade alguma sobre o crescimento de *Rhizobium tropici* quando comparados com o controle, mostrando assim que esse açúcar não interferia sobre o metabolismo de crescimento do microrganismo (Figura 19).

A lectina complexada com  $\alpha$ -D-manose não demonstrou diferença significativa com relação ao controle NaCl 0,15 M em nenhuma das horas testadas (Figura 20).

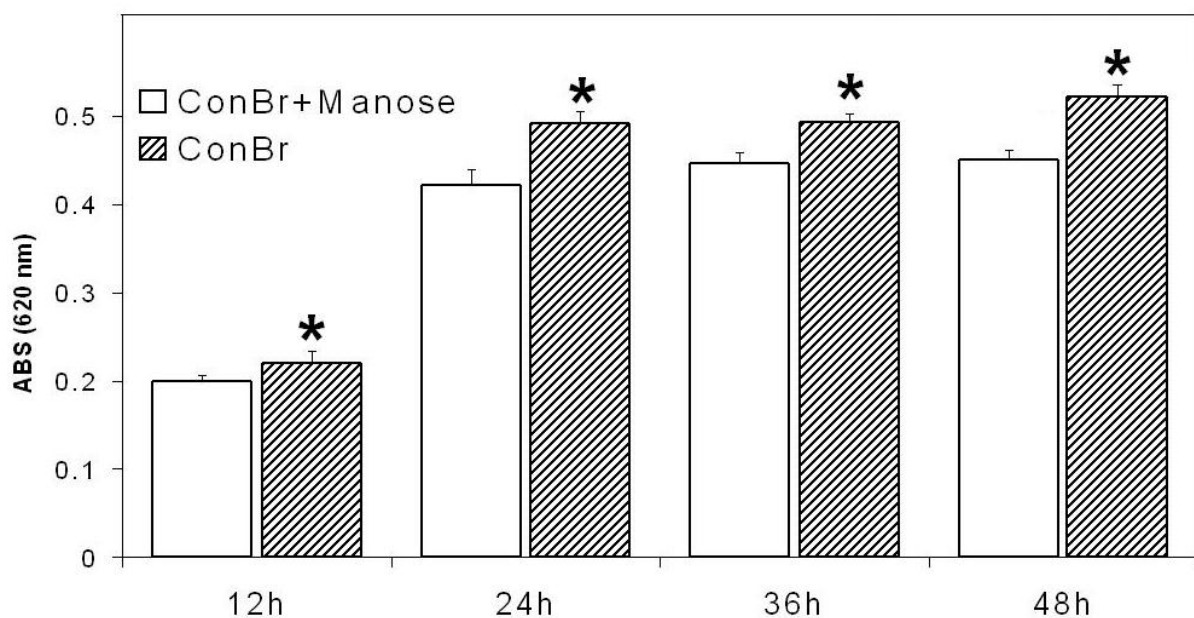
A lectina ConBr demonstrou atividade efetiva sobre o crescimento microbiano de *Rhizobium tropici* nas horas 12, 24, 36 e 48 (todas as horas testadas) em relação a lectina ConBr complexada com 0,1M de  $\alpha$ -D-manose (Figura 21).



**Figura 19.** Comparação entre o açúcar  $\alpha$ -D-manose e o controle experimental NaCl 0,15M.



**Figura 20.** Atividade da lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) complexada com Manose, sobre o crescimento microbiano de *Rhizobium tropici* CIAT899 e o controle experimental NaCl 0,15M.



**Figura 21.** Comparação entre a atividade da lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) e lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) complexada com 0,1M de Manose.  $P < 0,01$  (\*) Diferença estatística da ConBr em relação a ConBr+Manose.

Na literatura a utilização de açúcar ligado a lectina para inibir ou diminuir sua atividade biológica tem sido bastante explorada. Assrey (1997) demonstrou que a lectina de *Dioclea violacea* na presença de  $\alpha$ -metil-manosídeo perdeu sua atividade antiinflamatória em modelo de migração celular. Bitencourt e colaboradores (2008) demonstraram ainda a atividade antiinflamatória e antinocceptiva de uma lectina isolada da alga vermelha *Hypnea cervicornis* que na presença do seu açúcar inibidor perde tais atividades biológicas.

Martinez e colaboradores (2005) demonstraram ainda que a utilização de 10 $\mu$ M de D-glucose inibiu a atividade de agregação bacteriana de *Rhizobium tropici* causada pela lectina ConBr. Wong (1980) demonstrou que ConA marcada com FITC quando ligada a glucose ou manose perdia a interação com a superfície de varias estirpes de rizóbios.

Os resultados obtidos indicam uma especifica atividade lectinica de ConBr. A atividade sobre o crescimento de *Rhizobium tropici* anteriormente causada pela ligação entre ConBr e a superfície bacteriana foi inibida na presença de D-manose no seu sítio de ligação (Figura 20 e 21). Dessa maneira ConBr com o seu sítio de ligação a carboidrato ocupado pelo açúcar não interage com carboidratos da superfície do microrganismo, não causando assim qualquer modificação metabólica sobre a bactéria.

Ainda que estirpes como *Rhizobium tropici* CIAT 899, recomendada para inoculação do feijoeiro, possam produzir aumentos significativos nas produtividades médias brasileiras, o seu potencial de fixação biológica de nitrogênio ainda é bastante limitado para determinadas condições ambientais e cultivares de feijoeiro. Dessa forma, tem-se verificado ampla variabilidade de resposta à inoculação em condições de campo, demonstrando, freqüentemente, limitações do potencial simbiótico nesta interação. Nesse contexto a busca de bioinsumos que favoreçam a interação entre rizóbio e planta hospedeira vem sendo bastante explorada com o objetivo de um efeito sinérgico que promova maior fixação biológica de nitrogênio e aumento da produtividade do vegetal.

Resultados experimentais obtidos por Mercante & Franco (2000) demonstraram a possibilidade de se obter incrementos na nodulação inicial do feijoeiro, através da adição de exsudatos de sementes de espécies como *Mimosa flocculosa* e *Leucaena leucocephala*, que poderiam resultar em ganhos significativos no rendimento da cultura do feijoeiro, através da maximização do processo simbiótico.

Estudos têm demonstrado ainda que as lectinas de origem vegetal, entre muitas funções, estão envolvidas no reconhecimento em associações simbióticas com bactérias fixadoras de nitrogênio e com fungos micorrízicos. Também funcionam como proteínas de reserva e participam, tanto *in vivo* como *in vitro*, de fenômenos de reconhecimento de

carboidratos na superfície celular, o que as torna muito úteis como ferramentas biotecnológicas (RÜDIGER & GABIUS, 2001).

Estudos recentes têm mostrado que determinadas lectinas possam atuar na agregação e formação de biofilme por estirpes de rizóbio, potencializando a sua interação com plantas hospedeiras (FUJISHIGE *et al.*, 2006)

Antonyuk e Iganotov (2001) demonstraram em seu trabalho que a utilização a aglutinina do germe do trigo (específica para manose/glucose) adicionada à suspensão bacteriana de *Azospirillum brasilensis* aumenta a síntese protéica no microrganismo em especial a enzima nitrogenase (enzima que promove fixação de nitrogênio pelo microrganismo). O autor sugere que a lectina ligada à superfície bacteriana promova forte atividade sobre o metabolismo bacteriano, resultando na expressão de novos genes e como consequência a biossíntese de novas proteínas nas células bacterianas.

Recentemente Sytnihov e colaboradores (2007) mostraram que a lectina de soja (SBA) adicionada à suspensão bacteriana de *Bradyrhizobium japonicum*, aumenta a eficiência do sistema de simbiose na planta hospedeira além do aumento da produtividade nas plantas. Segundo os autores esta lectina parcialmente ligadas às células bacterianas influem sobre o metabolismo ativando e preparando o microrganismo para uma subsequente cooperação com a planta hospedeira.

Sytnikov e colaboradores ainda em 2007 demonstraram que a incubação da lectina SBA com *Bradyrhizobium japonicum* aumentou a atividade de fixação de nitrogênio nos nódulos, e promoveu maior fotossíntese no vegetal. Segundo o autor lectinas não devem ser consideradas apenas moléculas de reconhecimento ou sinalização nos estágios iniciais de simbiose, mais também como sinais moleculares que modula o metabolismo bacteriano e influencia suas propriedades simbióticas e as condições fisiológicas da planta hospedeira.

Holanda e colaboradores (2005) em ensaios de crescimento bacteriano de cepas patogênicas, utilizando placas de microtitulação, demonstraram que a lectina isolada da alga *Solieria filiformis*, apesar de inibir o crescimento de varias bactérias gram-positivas, promoveu maior crescimento microbiano da bactéria *Bacillus subtili*, esse resultado sendo inibido na presença de manana (açúcar inibidor). Os autores acreditam que a lectina ao interagir com receptores presentes na membrana do microrganismo promove alterações no fluxo de nutrientes, explicando sua atividade.

O mecanismo molecular pelo qual a lectina de *Canavalia brasiliensis* estimula o crescimento de *Rhizobium tropici* “*in vitro*” não pode ser identificado no trabalho realizado. Porem os dados obtidos neste trabalho corrobora com o trabalho de Bajaj (2001), onde este

autor demonstra a atividade de duas variedades de lectinas purificadas de *Pisum sativum*, com especificidade para manose, promoveram maior crescimento microbiano de *Rhizbium leguminisarium*. O autor sugere que o estímulo do crescimento do microrganismo pode provavelmente acontecer pela ligação da proteína na superfície bacteriana afetando positivamente o transporte de nutrientes.

### 3.3 Estudo da interação lectina/*Rhizobium tropici* por microscopia de fluorescência

#### 3.3.1 Atividade hemaglutinante

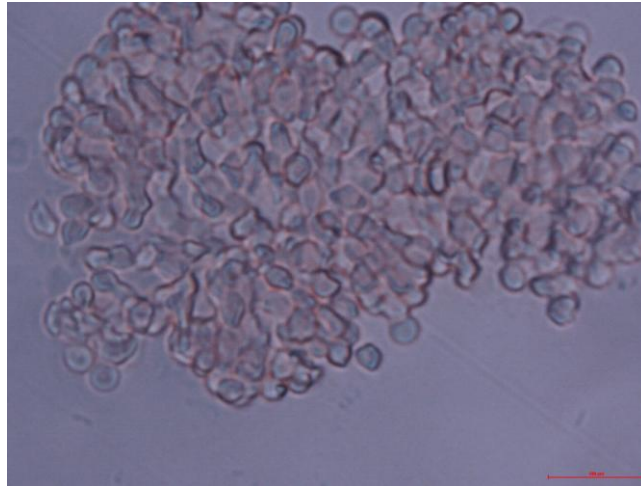
As lectinas isoladas de sementes de *Canavalia brasiliensis* e *Canavalia ensiformis* marcadas e não marcadas com FITC, utilizadas nos testes de crescimento microbiano mostraram forte atividade sobre a aglutinação de eritrócitos de coelho. Esses resultados demonstram assim a viabilidade destas proteínas nos ensaios de fluorescência (Figuras 22, 23, 24, 25, 26).

O controle dos testes de hemaglutinação (não utilizando lectinas) mostrou células morfolologicamente normais, não sendo verificada aglutinação dos eritrócitos (Figura 22).

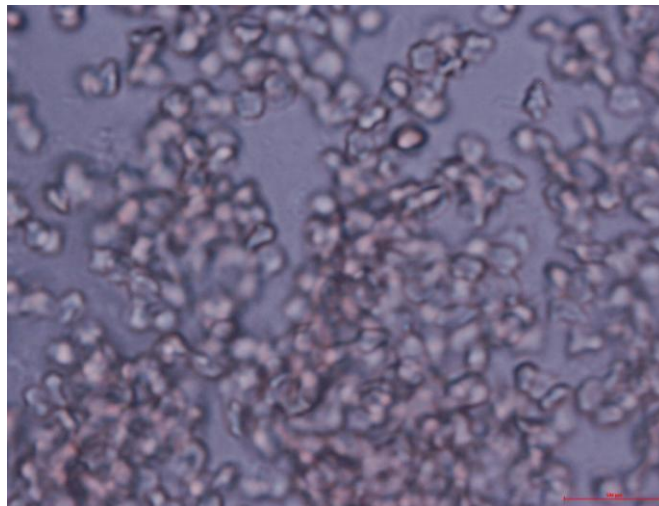


**Figura 22:** Imagem de hemácias de coelho utilizadas como controle experimental dos testes de atividade hemaglutinante analisado por microscopia óptica no aumento de 100x (barra: 500µm).

A atividade da lectina ConA marcada e não marcada com FITC mostraram forte aglutinação dos células (Figura 23 e 24 respectivamente).

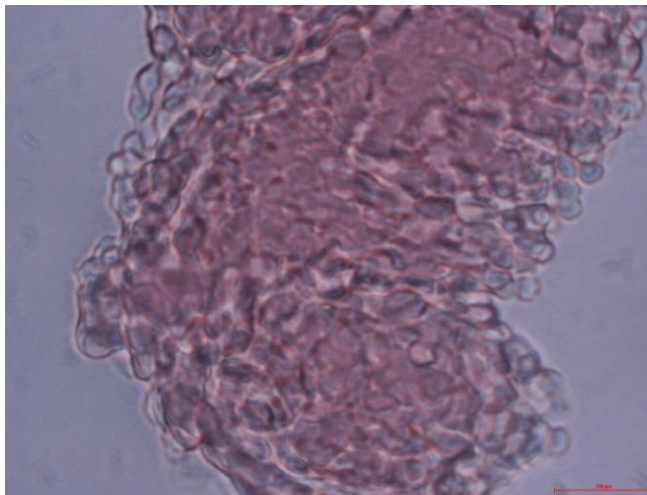


**Figura 23:** Imagem da atividade hemaglutinante da lectina ConA frente a hemácias de coelho analisado por microscopia óptica no aumento de 100x (barra: 500μm).

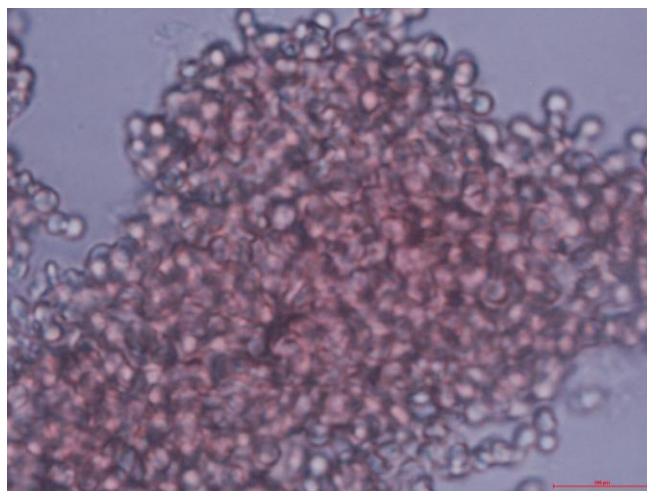


**Figura 24:** Imagem da atividade hemaglutinante da lectina ConA/FITC frente a hemácias de coelho analisado por microscopia óptica no aumento de 100x (barra: 500μm).

Assim como a lectina ConA, a lectina ConBr marcada e não marcada com FITC mostraram forte aglutinação dos células (Figura 25 e 26 respectivamente).



**Figura 25:** Imagem da atividade hemaglutinante da lectina ConBr frente a hemácias de coelho analisado por microscopia óptica no aumento de 100x (barra: 500 $\mu$ m).

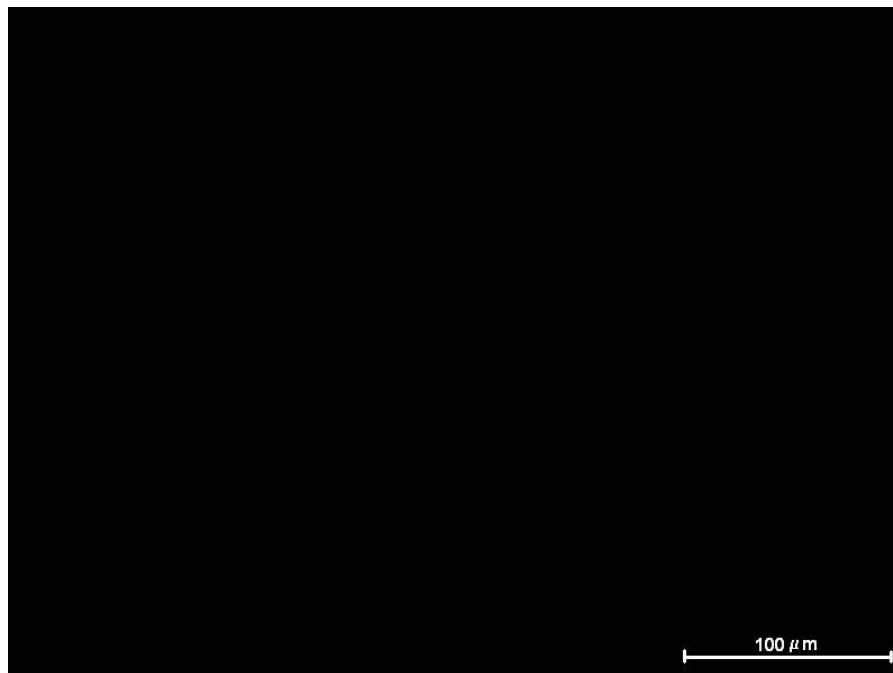


**Figura 26:** Imagem da atividade hemaglutinante da lectina de ConBr/FITC frente a hemácias de coelho analisado por microscopia óptica no aumento de 100x (barra: 500 $\mu$ m).



### 3.3.2 Fluorescência natural de *Rhizobium tropici*

Para verificar a possível fluorescência natural emitida pela estirpe de *Rhizobium tropici*, o microrganismo foi colocado sobre lâmina de vidro e verificado por microscopia de fluorescência. Os resultados demonstraram que a estirpe bacteriana de *Rhizobium tropici* CIAT 899 não apresentou qualquer fluorescência que fosse percebida por microscopia de fluorescência (Figura 27).



**Figura 27:** Imagem da fluorescência natural emitida pela estirpe bacteriana *Rhizobium tropici*. Barra: 100μm

### 3.3.3 Interação entre FITC e *Rhizobium tropici*

Para verificar a interação de FITC (Isotiocianato de fluoresceína) com a superfície bacteriana da estirpe *Rhizobium tropici* CIAT 899, o microrganismo foi colocado em contato com FITC na concentração de 1μg/mL e depois verificado sua interação entre FITC e o microrganismo por microscopia de fluorescência.

Os resultados obtidos demonstraram que o microrganismo em contato com FITC na concentração de 1μg/mL não foi verificada presença de fluorescência, mostrando assim que não houve interação entre superfície bacteriana de *Rhizobium tropici* e FITC (Figura 28).

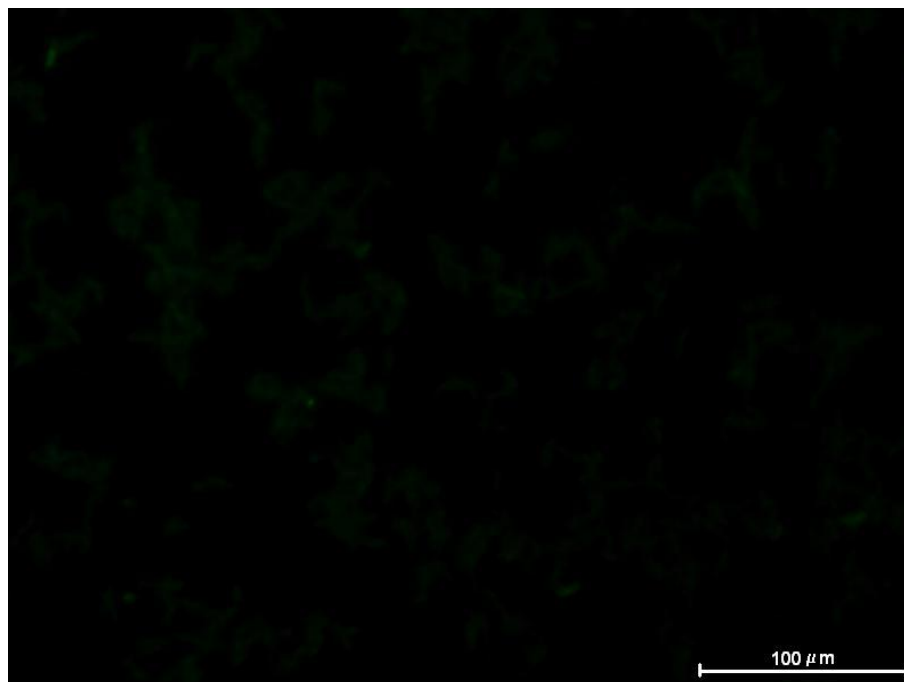


**Figura 28:** Imagem da interação entre FITC e a estirpe bacteriana *Rhizobium tropici*. Barra: 100μm

#### 3.3.4 Interação entre BSA e *Rhizobium tropici*

Como controle negativo dos testes experimentais, o microrganismo foi tratado com BSA (albumina sérica bovina) na concentração de 100μg/mL e depois verificado sua interação com a superfície bacteriana de *Rhizobium tropici* por microscopia de fluorescência.

Os resultados demonstraram que a proteína BSA em contato com o microrganismo apresentou uma baixa emissão de fluorescência, mostrando assim que BSA interage fracamente com o microrganismo (Figura 29).

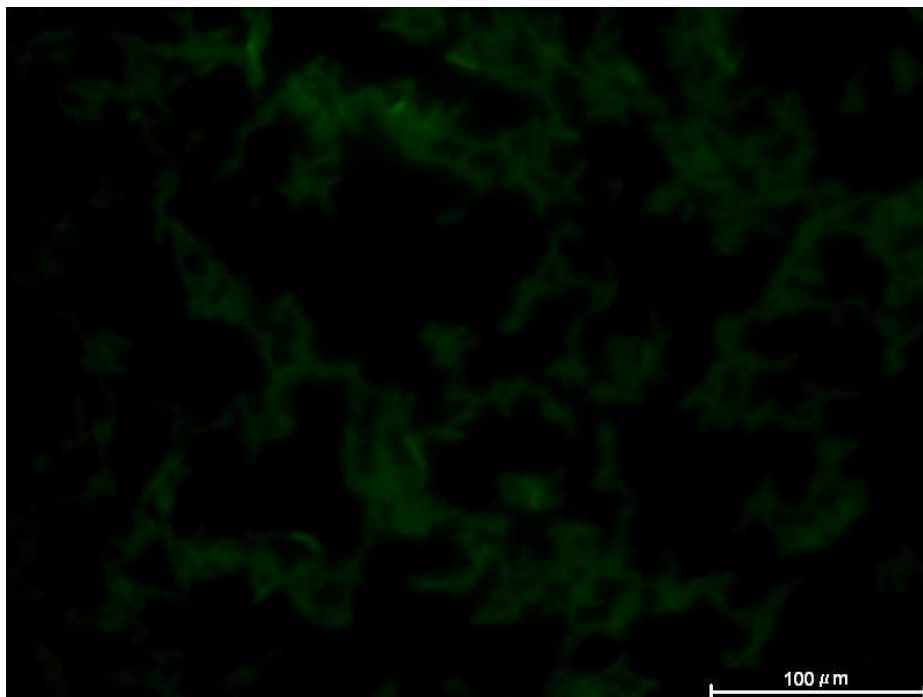


**Figura 29:** Imagem da interação entre BSA/FITC e superfície bacteriana de *Rhizobium tropici*. Barra: 100 $\mu$ m

### 3.3.5 Interação entre ConA e *Rhizobium tropici*

Para verificar a interação entre a lectina ConA e a superfície bacteriana de *Rhizobium tropici*, a lectina previamente marcada com FITC foi colocada em contato com a bactéria e depois verificado sua interação por microscopia de fluorescência.

Apesar da lectina ConA não apresentar atividade sobre o crescimento de *Rhizobium tripici* em placa de microtitulação, nossos testes demonstraram um forte emissão de fluorescência obtida da interação entre ConA marcada com FITC e a superfície bacteriana de *Rhizobium tropici*, mostrando assim interação entre ConA e carboidratos expostos na superfície do microrganismo (Figura 30).

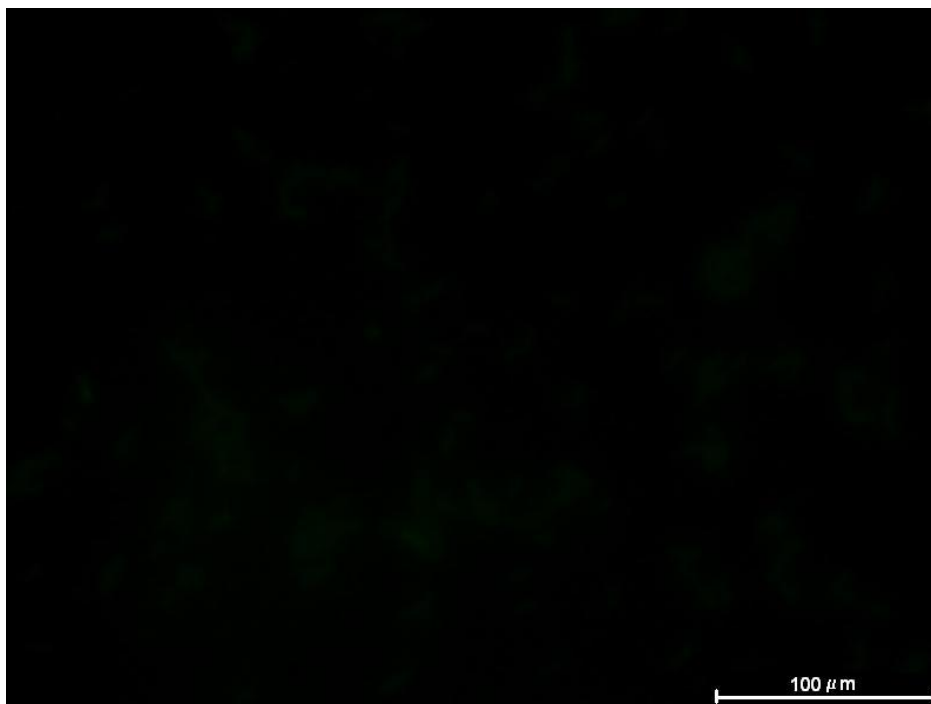


**Figura 30:** Imagem da interação entre ConA/FITC e superfície bacteriana de *Rhizobium tropici*. Barra: 100 $\mu$ m

### 3.3.6 Inibição da interação entre ConA e *Rhizobium tropici* utilizando açúcar inibidor

Para verificar a inibição da interação entre a lectina ConA e a superfície bacteriana de *Rhizobium tropici*, ConA previamente marcada com FITC foi complexada a resíduos de D-manose, e posteriormente colocada em contato com a bactéria durante 30min.

Os resultados demonstraram uma menor emissão de fluorescência emitida pela amostra quando ConA foi pré-incubada com seu açúcar inibidor (D-manose). Os resultados obtidos mostraram assim que a emissão de fluorescência apresentado pelo microrganismo é evidenciada pela ligação entre a lectina ConA e carboidratos expostos na superfície da bactéria (Figura 31).

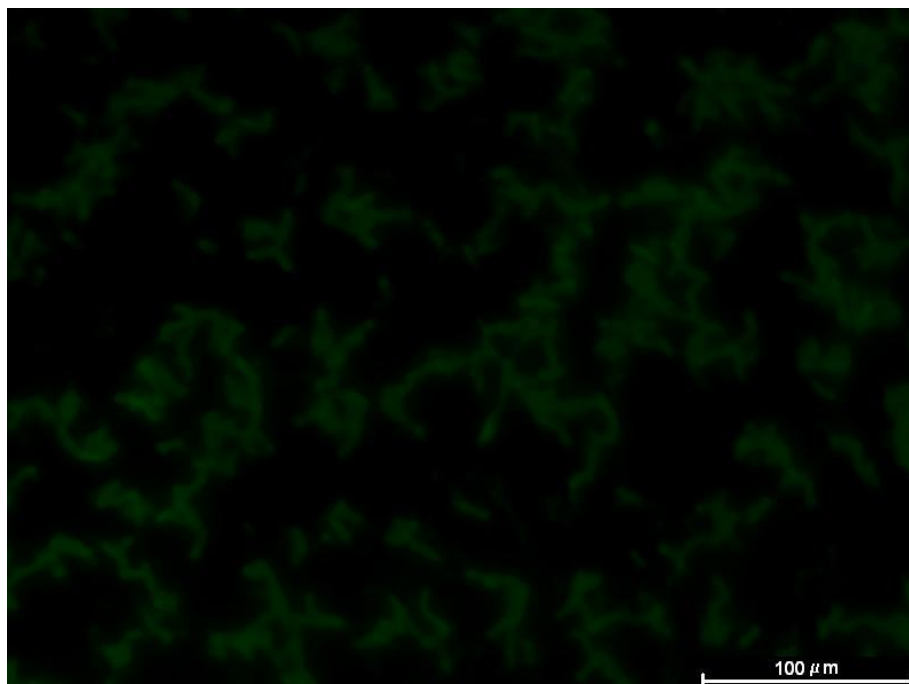


**Figura 31.** Imagem da interação entre ConA/FITC complexada a D-manose e superfície bacteriana de *Rhizobium tropici*. Barra: 100 $\mu$ m

### 3.3.7 Interação entre ConBr e *Rhizobium tropici*

Para verificar a interação entre a lectina ConBr e a superfície bacteriana de *Rhizobium tropici*, a lectina previamente marcada com FITC foi colocada em contato com a bactéria e depois verificado sua interação por microscopia de fluorescência.

A lectina ConBr utilizada nos testes de crescimento microbiano em placa de microtitulação mostraram um forte emissão de fluorescência causada pela interação entre a lectina ConBr marcada com FITC e a superfície bacteriana de *Rhizobium tropici*, resultado semelhante ao obtido com a utilização de ConA. Os resultados obtidos mostraram assim, a interação entre ConBr e carboidratos expostos na superfície do microrganismo (Figura 32).

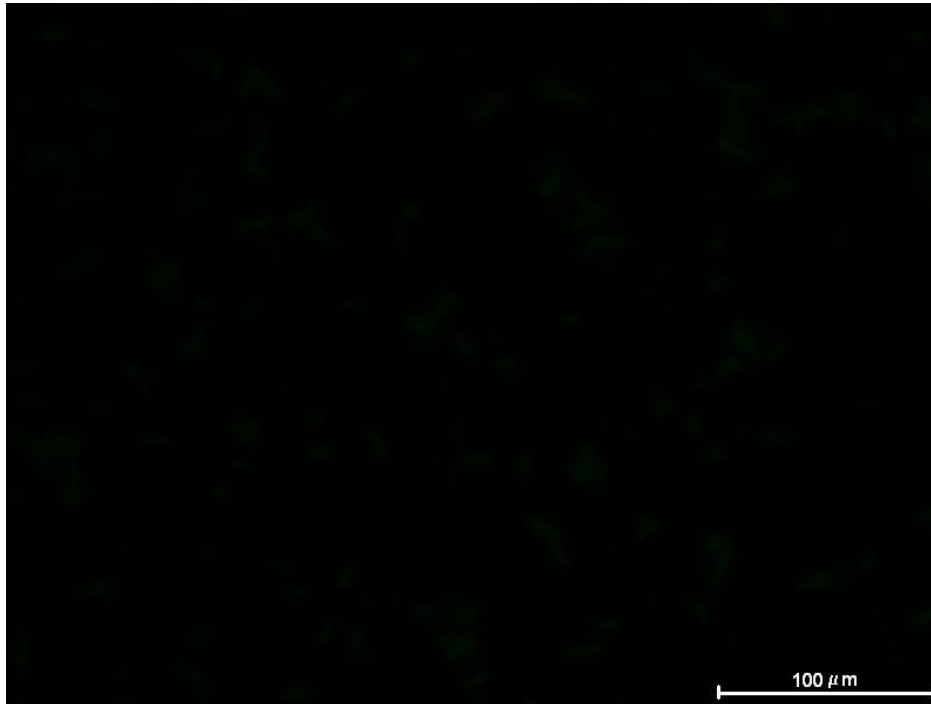


**Figura 32.** Imagem da interação entre ConBr/FITC e superfície bacteriana de *Rhizobium tropici*. Barra: 100 $\mu$ m

### 3.3.8 Inibição da interação entre ConBr e *Rhizobium tropici* utilizando açúcar inibidor

Para verificar a inibição da interação entre a lectina ConBr e a superfície bacteriana de *Rhizobium tropici*, ConBr previamente marcada com FITC foi complexada a resíduos de D-manose, e posteriormente colocada em contato com a bactéria durante 30min.

Os resultados demonstraram uma menor emissão de fluorescência emitida pela amostra quando ConBr foi pré-incubada com seu açúcar inibidor (D-manose), resultado semelhante ao obtido por ConA. Os resultados obtidos mostraram assim que a emissão de fluorescência apresentado pelo microrganismo era evidenciado pela ligação entre a lectina ConBr e carboidratos expostos na superfície da bactéria (Figura 33).



**Figura 33.** Imagem da interação entre ConBr/FITC complexada a D-manose e superfície bacteriana de *Rhizobium tropici*. Barra: 100 $\mu$ m

Os resultados encontrados por microscopia de fluorescência demonstraram claramente que as lectinas ConA e ConBr mostram interação específica a carboidratos expostos na superfície bacteriana, essa interação é diminuída na presença de resíduos de D-manose presentes no seu sítio de ligação. Quando a lectina tem o seu sítio de ligação preenchida pelo açúcar, a ligação entre lectina e carboidratos da superfície bacteriana é diminuída fazendo com que a fluorescência emitida entre ConA e ConBr não complexada ao açúcar seja mais evidente do que a lectina complexada com D-manose.

Em 1980 Wong já havia evidenciado a interação entre ConA e várias estirpes do gênero *Rhizobium* (WONG, 1980). O autor demonstrou em seu trabalho que a lectina ConA marcada previamente com FITC interage com diferentes estirpes de *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium phaseoli*, *Rhizobium japonicum* e *Rhizobium sp*, observando emissão de fluorescência em testes utilizando espectrofotofluorômetro. Quando ConA foi complexada ao açúcar (glucose) a fluorescência emitida pela ligação da lectina a bactéria era diminuída (WONG, 1980), sendo evidenciado assim uma específica interação entre lectina e carboidratos da superfície bacteriana.

Recentemente Chen e colaboradores (2006) demonstraram a interação entre a lectina de soja (SBA) e carboidratos da superfície de *Bradyrhizobium japonicum* utilizando

---

SBA marcada com FITC ligada a superfície bacteriana, estes autores ainda mediram a força de interação entre a lectina e o microrganismo utilizando Microscopia de Força Atômica (CHEN *et al.*, 2006).

Os resultados obtidos demonstraram que a lectina ConA apesar de interagir com carboidratos de superfície de *Rhizobium tropici* como demonstrados na figura 24, esta lectina não foi capaz de estimular o crescimento microbiano do microrganismo (Figura 17).

Bajaj e colaboradores (2001) demonstraram que duas lectinas isoladas de *Pisum sativum*, com especificidade por glucose/manose, marcadas com FITC mostraram ligação específica em *Rhizobium leguminosarum* e *Rhizobium cowpea* mais as duas lectinas testadas apresentaram atividade sobre o crescimento bacteriano apenas da estirpe *Rhizobium leguminosarum*.



---

## 4. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Nesse trabalho buscamos demonstrar a atividade das lectinas isoladas de sementes de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) e *Canavalia ensiformis* (ConA) sobre o crescimento “*in vitro*” de *Rhizobium tropici*. Os resultados obtidos mostraram que a lectina ConBr foi capaz de estimular de maneira significativa o crescimento “*in vitro*” de *Rhizobium tropici*. O efeito encontrado foi revertido na presença do açúcar inibidor (manose), sugerindo uma efetiva atividade lectínica. No entanto a lectina ConA não demonstrou nenhuma atividade sobre o crescimento do microrganismo. Os ensaios de microscopia de fluorescência demonstraram que ambas as lectinas se ligaram a superfície bacteriana através de sítios de ligação a carboidratos. A diferença na atividade biológica entre ConA e ConBr sobre o crescimento microbiano provavelmente está relacionado com a diferença estrutural nos seus sítios de ligação a carboidratos.

Com base nos resultados apresentados, pode-se concluir que a lectina isolada de *Canavalia brasiliensis* liga-se a superfície bacteriana de *Rhizobium tropici* desempenhando uma atividade metabólica, ainda desconhecida, sobre o crescimento do microrganismo. Esses dados são suficientemente significantes para o estudo da interação entre rizóbio e planta hospedeira. Contudo, novos estudos serão necessários para melhor caracterizar a atividade biológica desta lectina sobre o metabolismo de *Rhizobium tropici*, além de estudos em campo para determinar o desempenho de ConBr sobre a cultura de grãos.

## **5. COLABORADORES**

**Este trabalho foi realizado graças ao apoio das seguintes instituições:**

A Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior – CAPES

A Universidade Federal do Ceará – UFC

A Faculdade de Medicina de Sobral – FAMED

Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas – Biomol Lab

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA Oeste

Núcleo de Biotecnologia de Sobral – NUBIS

Laboratório de Imunologia e Bioquímica de Sobral – LIBS

---

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

'TMANNETJE, L. A re-examination of the taxonomy of the genus *Rhizobium* and related genera using numerical analysis, 1967.

ALENCAR, N.M.; TEIXEIRA, E.H.; ASSREUY, A.M.; CAVADA, B.S.; FLORES, C.A.; RIBEIRO, R.A. Leguminous lectins as tools for studying the role of sugar residues in leukocyte recruitment. *Mediators of inflammation*, 8, 107-131, 1999.  
and applications. *Glycoconjugate Journal*, v.18, p.589-613, 2001.

ANDRADE, J.L.; ARRUDA, S.; BARBOSA, T.; PAIM, L.; RAMOS, M.V.; CAVADA, B.S.; BARRAL-NETTO, M. Lectin-induced NO production. *Celular Immunology*, 194, 98-112, 1999.

ANDREWS, D. J AND KASSAM, A. H. The importance of multiple cropping in increasing world food supplies. In *Multiple Cropping*. Eds. I R Papendick, P A Sanchez and G B Triplett. pp. 1–11. A.S.A Special Publ. 27. Amer. Soc. Agron. Madison WI, USA, 1976.

ANTONYUK, L. P. and IGNATOV, V.V. The Role of Wheat Germ Agglutinin in Plant–Bacteria Interactions: A Hypothesis and the Evidence in Its Support. *Russian Journal of Plant Physiology*, Vol. 48, No. 3, pp. 364–369, 2001

ARAÚJO, R.S. Fixação biológica de nitrogênio em feijão. In: ARAUJO, R.S. & HUNGRIA, M., eds. *Microrganismos de importância agrícola*. Brasília, Embrapa.p.91-120, 1994.

ARRUDA, F.V.S. Atividade de lectinas de leguminosas sobre a germinação de esporos de fungos fitopatogênicos. *Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará*, 2009.

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  $\pm$ mannose binding lectins isolated from Brazilian beans. *Mediators of Inflammation*, 6, 201  $\pm$ 210, 1997.

ASSREUY, A.M.; MARTINS, G.J.; MOREIRA, M.E.F.; BRITO, G.A.C.; CAVADA, B.S.; RIBEIRO, R.A.; FLORES, C.A. Prevention Of Cyclophosphamide-Induced Hemorrhagic Cystitis By Glucose-Mannose Binding Plant Lectins. *The Journal of Urology*. 161, 1988 – 1993, 1999.

BAJAJ, M., SONI, G., SINGH. C.K. (2001) Interaction of pea (*Pisum sativum* L.) lectins with rhizobial strains. *Microbiological research*. 156(1):71-4.

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. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. Rio de Janeiro, Brasil. 96(5), 673 – 678, 2001.

BARRAL-NETTO, M.; SANTOS, S.B.; BARRAL, A.; MOREIRA, L.I.M.; SANTOS, C.F.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, J.T.A.; CAVADA, B.S. Human lymphocyte stimulation by legume lectins from the Diocleae tribe. *Immunological Investigations*, 21, 297-303, 1992.

BARRAL-NETTO, M.; VON SOHSTEN, R.L.; TEIXERA, M.; CONRADO DOS SANTOS, W.L.; POMPEU, M.L.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, J.T.A.; CAVADA, B.S.; FALCOFF, E.; BARRAL, A. In vivo protective effect of the lectin from *Canavalia brasiliensis* on BALB/c mice infected by *Leishmania amazonensis*. *Acta Tropica*, 60, 237-250, 1996.

BECKER J.W.; REEKE G.N.J.; WANG J.L.; CUNNINGHAM B.A.; EDELMAN G. M.; The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. III. Structure of the monomer and its interactions with metals and saccharides. *J Biol Chem*. 250(4), 1513-24, 1975.

BEIJERINCK, M. W. Culture des *Bacillus radicola* aus den Knochen. *Bot. Ztg.* 46, 740-750, 1888.

BELLAVER, A e FAGUNDES, R.S. Inoculação com *Rhizobium tropici* e uso do nitrogênio na base e por cobertura na cultura do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). *Cascavel*, v.2, n.4, p.1-10, 2009.

BENTO, C.A.M.; CAVADA, B.S.; OLIVEIRA, J.T.A.; MOREIRA, R.A.; BARJA-FIDALGO, C. Rat paw edema and leukocyte immigration induced by plant lectins. *Agents and Actions*, 38, 48-54, 1993.

BEUTH, J.; STOFFEL, B.; KO, H.L.; JELJASZEWICZ, J.; PULVERER, G. Immunomodulating ability of galactoside-specific lectin standardized and depleted mistletoe extract. *Arzneimittelforschung*. 45(11), 1240-1242, 1995.

BIES, C.; LEHR, C.M.; WOODLEY, J.F. Lectin-mediated drug targeting: history and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56(4), 425-435, 2004.

BITENCOURT, F.S; FIGUEIREDO, J.G; MOTA,M.R.L; BEZERRA, C.C.R; SILVESTRE, P.P; VALE, M.R; NASCIMENTO, K.S; SAMPAIO, A.H; NAGANO, C.S; SAMPAIO, S.S; FARIAS, W.R.L; CAVADA, B.S; ASSREUY, A.M.S; ALENCAR, N.M.N. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of a mucin-binding agglutinin isolated from the red marine alga *Hypnea cervicornis*. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 377:139-148, 2008.

BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S.; NEVES, M.C.P.; SUHET, A. R.; PERES, J.R. Quantification of the contribution of N<sub>2</sub> fixation to field-grown grain legume – a strategy for the practical application of the 15N isotope dilution technique. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 22, p. 649-655,1990.

BOYD, W.C.; SHAPLEIGH, E. Antigenic relations of blood group antigens as suggested by tests with lectins. In: *Plant Lectins. Molecular and biological aspects*.

BRELLES-MARIÑO, G.; COSTA, G. A.; BOIARDI, J. L. Enhancement of infection thread formation by *Rhizobium etli* incubated with bean seed lectin. *Microbiological Research*. v. 151, p. 243-46, 1996.

BURRIS, R. H. & ROBERTS, G. P. Biological nitrogen fixation. *Annu. Rev. Nutr.* 13: 317-335, 1993.

BUTTERY, B.R.; PARK, S.J; FINDLAY, W.J. Growth and yield of white bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in response to nitrogen, phosphorus and potassium fertilizer and to inoculation with *Rhizobium*. *Canadian Journal of Plant Sciences*, v.67, p.425-432, 1987.

CAVADA, B.S.; BARBOSA, T.; ARRUDA, S.; GRANGEIRO, T.B.; BARRAL-NETTO, M. Revisiting proteus: do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins. *Curr Protein Pept Sci* 2, 123–135, 2001.

CAVADA, B.S.; GRANGEIRO, T.B.; RAMOS, M.V.; CORDEIRO, E.F.; OLIVEIRA, J.T.A.; MOREIRA, R.A. Isolation and partial characterization of a lectin from the *Dioclea rostrata* Benth seeds. *R. Bras. Fisiol. Veg.* 8, 31-36, 1996.

CAVADA, B.S.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, J.T.A.; GRANGEIRO, T.B. Primary structure and functions of plant lectins. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* 5(2), 193-202, 1993.

CHEN J., LIN S AND LIN L.. Rhizobial surface biopolymers and their interaction with lectin measured by atomic force microscopy. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 22: 565–570, 2006.

CHRISPEELS, M.J; HARTL, P.M; STURM, A and FAYE, L. Characterization of the endoplasmic reticulum-associated precursor of concanavalin A. Partial amino acid sequence and lectin activity. *J. Biol. Chem.* 261: 10021-10024, 1986.

CHUEIRE, L. M. O; BANGEL E. V; MOSTASSO F. L; CAMPO R. J; PEDROSA F. O & HUN, M. Classificação taxonômica das estirpes de rizóbio recomendadas para as culturas da soja e do feijoeiro baseada no seqüenciamento do gene 16s rrna. *R. Bras. Ci. Solo*, 27:833-840, 2003.

COSTA JUNIOR, P.F. Comportamento de leguminosas arbóreas inoculadas com fungos micorrízicos arbusculares e rizóbio em estéril de argila. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) Universidade Estadual Vale do Fluminense, 1997.

DATTA, P.K.; FIGUEROA, M.O.D.C.R.; LAJOLO, F.M. Purification and characterization of two major lectins from *Araucaria brasiliensis* syn. *Araucaria angustifolia* seeds (pinhão). *Plant Physiol*, 97, 856-862, 1991.

DAZZO, F.B and HUBBELL, H.D. Cross-reactive antigens and lectins as determinants of symbiotic specificity in the *Rhizobium-clover* association. *Appl Microbial.* 30:1017-i 033,1975.

DAZZO, F.B; TRUCHET, G.L; SHERWOOD, J.E; HRABAK, E.M; ABE, M and PANKRATZ, S.H. Specific Phases of Root Hair Attachment in the *Rhizobium trifolii*- Clover Symbiosist. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, Dec. p. 1140-1150, 1984.

DEL SOL, R; ARMSTRONG, I; WRIGHT, C; DYSON, P. Characterization of changes to the cell surface during the life-cycle of *Streptomyces coelicolor*: atomic force microscopy of living cells. *J Bacteriol.* Dec 28, 2006.

DELATORRE, P.; GADELHA, C.A; ROCHA, B.M.; GADELHA, T.S; CAJAZEIRAS, J.B; FREITAS, B.T; SOUZA, e P; NASCIMENTO, K.S; SAMPAIO, A.H; AZEVEDO JR, W.F; CAVADA, B .S. Crystal Structure of a lectin from *Canavalia maritima* (ConM) in complex with trehalose and maltose. *Journal of Structural Biology*, USA, v. 154, p. 280-286, 2006.

DELWICH, C.C. The cycling of carbon and nitrogen in the biosphere. *Microbiology and Soil fertility*, p. 29, 1965.

DENISON, R. F., and HARTEY, B. L. Nitrate effects on nodule oxygen permeability and leghemoglobin. *Plant Physiol.* 107: 1355- 1364, 1995.

DIXON, R. O D., and WHEELER, C. T. *Nitrogen Fixation in Plants*. Chapman and Hall, New York, 1986.

DOBEREINER, J. A importância da fixação biológica de nitrogênio para a agricultura sustentável. *Biociência Ciência & Desenvolvimento*. Disponível On Line. [www.biociencia.com.br/revista/bio01/1hp\\_15.asp](http://www.biociencia.com.br/revista/bio01/1hp_15.asp), 1997.

DUQUE, F.F.; NEVES, M.C.P.; FRANCO, A.A.; VICTORIA, R.L.; BODDEY, R.M. The response of field grown *Phaseolus vulgaris* L. to *Rhizobium* inoculation and qualification of N<sub>2</sub> fixation using <sup>15</sup>N. *Plant and Soil*, v.88, p.333-343, 1985.

EDELMAN, G.M.; WANG, J.L. Binding and functional properties of concanavalin A and its derivatives. III. Interactions with indoleacetic acid and other hydrophobic ligands. *J Biol Chem.* 10; 253(9): 3016-22, 1978.

ETZLER, M. E.; KALSI, G.; EWING, N. N.; ROBERTS, N. J.; DAY, R. B.; MURPHY, J. B. A nod factor binding lectin with apyrase activity from legume roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 96, p. 5856-61, 1999.

FERREIRA, A.N.; ARF1, O.; CARVALHO, M.A.C.; ARAÚJO, R.S.; SÁ, M.E.; BUZETTI, S. Estirpes de *Rhizobium tropici* na inoculação do feijoeiro. *Scientia Agricola*, Piracicaba, v.57, n.3, p.507-512, 2000.

FERREIRA, P.A.A; SILVA, M.A.P; CASSETARI, A; RUFINI, M; MOREIRA, F.M.S; ANDRADE, M.J.B. Inoculation with *Rhizobium* strains in beans crop. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.39, n.7, p.2210-2212, out, 2009.

FRANCO, A.A. Nutricional restraints for tropical grain legume symbiosis. In: VICENT, J.M.K.; WHITNEY, J. (Ed.). *Exploiting the legume-Rhizobium in tropical agriculture*. Hawaii: University of Hawaii. p.237-252, 1977.

FRANCO, A.A.; DOBEREINER, J. A biologia do solo e a sustentabilidade dos solos tropicais. *Summa Phitopatologica*, Jaboticabal, v. 20, n. 1, p. 68-74, 1994.

FRANK, B. Ueber die Pilzsymbiose der Leguminosen. *Ber Deut. Bot. Ges.* 7, 332–346, 1889.

FRED, E. B.; BALDWIN, I. L. and MCCOY, E. Root Nodule Bacteria and Leguminous Plants. University of Wisconsin Studies in Science, number 5. University of Wisconsin Press, Madison, 1932.

FUJISHIGE, N.A.; KAPADIA, N.N.; DE HOFF, P.L.; HIRSCH, A.M. Investigations of *Rhizobium* biofilm formation. FEMS Microbiology Ecology, v.56, p.195-206, 2006.

GABIUS H.J.; GABIUS S. Glycoscience Status and Perspectives. Chapman & Hall, Weinheim, Germany, 1997.

GARRITY, G.M. & HOLT, J.G. The road map to the Manual. In: BOONE, D.R. & CATENHOLZ, R.W., eds. Bergey's manual of systematic bacteriology. New York, Springer-Verlag. v.1. p.119-166, 200.

GLICK, G.D.; TOOGOOD, P.L.; WILEY, D.C.; SKEHEL, J.J.; KNOWLES, J.R. Ligand recognition by influenza virus. The binding of bivalents sialosides. The J. Biochem. Chem., 266(35), 23660-23669, 1991.

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

GOMES, j.C.; ferreira, R.R.; cavada, B.S.; moreira, R.A. Histamine release induced by glucose (mannose)-specific lectins isolated from Brazilian beans. Comparison with concanavalin A. Agents Actions 41, 132-135, 1994.

GRAHAM, P. H. The application of computer techniques to the taxonomy of the root-nodule bacteria of legumes. J. Gen. Microbiol. 35, 511-517, 1964.

GRAHAM, P.H. Some problems of nodulation and symbiotic nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris* L.: A review. Field Crops Research, v.4, p.93-112, 1981.

GRANGEIRO, T.B.; SCHRIEFER, A.; CALVETE, J.J.; RAIDA, M.; URBANKE, C.; BARRAL-NETTO, M.; CAVADA, B.S. Eur J Biochem, v248, p. 43-48, 1997.

GRUBHOFFER, L.; MATHA, V. Characteristics of a new L-fucose and N-acetyl-D-galactosamine specific lectin from the integument of *Galleria mellonella* larval. Comp. Biochem, Physiol., 100(1): 73-76, 1991.

HAAG, H.P., MALA VOLTA, E. GARGANTINI, H. et al. Absorção de nutrientes pela cultura do feijoeiro. Bragantia, Campinas, v. 26, n. 30, p. 381-391, 1967.

HAMELRYCK, T.W.; LORIS, R.; BOUCKAERT, J.; DAO-THI, M.H.; STRECKER, G.; IMBERTY, A.; FERNANDEZ, E.; WYNS, L.; ETZLER, M.E. Carbohydrate binding, quaternary structure and a novel hydrophobic binding site in two legume lectin oligomers from *Dolichos biflorus*. J Mol Biol. 286(4): 1161-77, 1999.

HAMMARSTROM, S. Snail (*Helix pomatia*) agglutinin. Meth. Enzymol., 28: 368-383. . Diagn Microbiol Infect Dis. 2004 Mar;48(3):195-9, 1972.

HARDARSON, G.; BLISS, F.A.; GIGALES-RIVERO, M.R.; HENSON, R.A.; KIPENOLT, J.A.; LONGERI, L.; MANRIQUE, A.; PEÑA-CABRIALES, J.J.; PEREIRA, P.A.A.; SANABRIA, C.A.; TSAI, S.M. Genotypic variation in biological nitrogen fixation by common bean. *Plant and Soil*, v.159, p.59-70, 1993.

HARDMAN, K.D; AGARWAL, R.C; FREISER, M.J.. *J. Mol. Biol.* 157, 69–89, 1982.

HELMHOLZ H.; CARTELLIERI S.; HE L.; THIESEN P.; NIEMEYER B. Process development in affinity separation of glycoconjugates with lectins as ligands. *Journal of Chromatography A*, v 1006, p.127-135, 2003.

HORI, K.; MIYAZAWA, K.; FUSEYANI, N.; HASHIMOTO, K.; ITO, K. Hypnins low-molecular weight peptidic agglutinins isolated from a marine red alga, *Hypnea japonica*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 873, 228-236, 1986.

HUNGRIA, M.; ANDRADE, D.S.; BALOTA, E.L. & COLOZZI-FILHO, A. Importância do sistema de semeadura direta na população microbiana do solo. Londrina, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 1997.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T. Environmental factors affecting N<sub>2</sub> fixation in grain legumes in the tropics, with emphasis on Brazil. *Field Crop Research*. v. 65: 151–164, 2000.

JACOBSON, R.L.; DOYLE R.J. *Parasitol Today*, 12(2): 55-61, 1996.

JORDAN, D. C. Family III. Rhizobiaceae Conn 1938. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Eds. N Krieg and R G Holt. pp. 234–235. 1st edition, Vol. 1 The Williams & Wilkins Co, Baltimore, 1984.

KAPLAN, L AND LYNCH, T. F. Phaseolus (Fabaceae) in archeology: AMS radiocarbon dates and their significance for pre-Colombian agriculture. *Economic Bot.* 53, 261–272, 1999.

KEYSER, H.H.; SOMASEGARAN, P.; BOHLOOL, B.B.. *Rhizobial Ecology and Technology*. In: METTING JUNIOR., F.B. ed. *Soil Microbial Ecology*. New York. Dekker. p. 205-206, 1997.

KHANG, N.Q.; JEAN-LUC, G.; HOEBEKE, J. A blood group A specific lectin from the seeds of *Crotalaria striata*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1033, 210–213, 1990.

KIJNE, J. W.; BAUCHROWITZ, M. A. and DIAZ, C. L. Root lectins and rhizobia. *Plant Physiology*, 115:869-73, 1997.

KOCOUREK, J.; HOREJSI, V. A note of the recent discussion of definition of the term "lectin". *Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*. Proceedings of the 5th Lectin Meeting, v. 3, p. 3-6, 1981.

KUZNA, M. M., HUNT, S., and LAYZELL, D. B. Role of oxygen in the limitation and inhibition of nitrogenase activity and respiration rate in individual soybean nodules. *Plant Physiol.* 101: 161-169, 1993.



LANDSTEINER, K.; RAUBITSCHKE, H. Beobachtungen über Hamolyse and Hemagglutination. Zbl. Bakt. I. Abt. Orig., 45 660, citado por Gold & Balding, 1975.

LAZAROWITZ, S. G., and BISSELING, T. Plant development from the cellular perspective: Integrating the signal (Cellular Integration of Signaling Pathways in Plant Development, Acquafredda de Maratea, Italy, May 20-30, 1997). *Plant Cell* 9: 1884-1900, 1997.

LIENER, I.E.; SHARON, N.; GOLDSTEIN, I.J. The lectins: Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine. Academic Press, 600, 1986.

LLIPS, D. A and KAPULNIK, Y. Plant isoflavonoids, pathogens and symbionts. *Trends Microbiol.* 3: 58-64, 1995.

LODEIRO, A . R.; LÓPEZ-GARCÍA, S. L.; VÁZQUEZ, T. E. E.; FAVELUKES, G. Stimulation of adhesiveness, infectivity, and competitiveness for nodulation of *Bradyrhizobium japonicum* by its pretreatment with soybean seed lectin. *FEMS Microbiology Letters*, v. 188, p. 177-84, 2000.

LORIS, R.; VAN WALLE, I.; DE GREVE, H.; BEECKMANS, S.; DEBOECK, F.; WYNS, L.; BOUCKAERT, J. Structural basis of oligomannose recognition by the *Pterocarpus angolensis* seed lectin. *J Mol Biol.* 30; 335(5): 1227-40, 2004.

LUM, M.R and HIRSCH, A.M. Roots and Their Symbiotic Microbes: Strategies to Obtain Nitrogen and Phosphorus in a Nutrient-Limiting Environment. *J Plant Growth Regul* (2003) 21:368–382, 2003.

MALAVOLTA, E.; MORAES, M. F. Fundamentos do nitrogênio e do enxofre na nutrição mineral das plantas cultivadas. In: SIMPÓSIO SOBRE NITROGÊNIO E ENXOFRE NA AGRICULTURA BRASILEIRA, 2006, Piracicaba. Piracicaba: ESALQ/ POTAFOS, 2006.

MARÉCHAL R, MASCHERPA J M AND STAINIER F. Etude taxonomique d'un groupe complexe d'espèces des genres *Phaseolus* et *Vigna* (Papilionaceae) sur la base de données morphologiques et polliniques, traitées par l'analyse informatique. *Boissiera* 28, 1–27, 1978.

MARSCHNER, H. Mineral Nutrition of Higher Plants, 2nd ed. Academic Press, London, 1995.

MARTÍNEZ, C.R., CHANWAY, C.P., ALBERTINI, A.V., FIGUEIREDO, M.V., SAMPAIO, A.H., CASTELLON, R.R., CAVADA, B.S., LIMA-FILHO, J.L. The interaction of *Vatairea macrocarpa* and *Rhizobium tropici*: net H<sup>+</sup> efflux stimulus and alteration of extracellular Na<sup>+</sup> concentration. *FEMS Microbiology Letters*. 1;238(1):17-22, 2004.

MARTÍNEZ, C.R., NETTO, A.M., FIGUEIREDO, M.V.B., CAVADA, B.S. and LIMA-FILHO, J L. Kinetic sedimentation of *Rhizobium* aggregates produced by leguminous lectins. *World J. c.* 21: 75–82, 2005.

MARTINEZ, C.R.; ALBERTINI, A.V.P.; FIGUEIREDO, M.V.B.; SILVA, V.L.; SAMPAIO, A.H.; CAVADA, B.S.; LIMA-FILHO, J.L. Respiratory stimulus in *Rhizobium* sp. by legume lectins. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.20, p.77-83, 2004.

MARTÍNEZ-ROMERO, E. Diversity of *Rhizobium*–*Phaseolus vulgaris* symbiosis: overview and perspectives. *Plant Soil* 252, 11–23, 2003.

MARTÍNEZ-ROMERO, E.; SEGOVIA, E.; MERCANTE, F.M.; FRANCO, A.A.; GRAHAM, P.H. & PARDO, M.A. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 41:417-426, 1991.

MENGEL, K.; KIRKBY, E.A. Principles of plant nutrition. Bern : International Potash Institute, 687p, 1987.

MERCANTE, F. M. Uso de inoculante garante economia de 3 bilhões de dólares na cultura da soja no país. Disponível em: < [www.embrapa.br/noticias/artigos/folder.2005-02-02.1550581232/artigo.2005-12-05.0506770395/mostra\\_artigo](http://www.embrapa.br/noticias/artigos/folder.2005-02-02.1550581232/artigo.2005-12-05.0506770395/mostra_artigo)>. Acesso em: novembro de 2009.

MERCANTE, F.M.; FRANCO, A.A. Expressão dos genes *nod* de *Rhizobium tropici*, *R. etli* e *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* e estabelecimento da nodulação do feijoeiro na presença de exsudatos de sementes de *Mimosa flocculosa* e *Leucaena leucocephala*. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.24, p.301-310, 2000.

MERCANTE, F.M.; TEIXEIRA, M.G.; ABOUD, A.C.S. & FRANCO, A.A. Avanços biotecnológicos na cultura do feijoeiro sob condições simbióticas. *R. Univ. Rural: Sér. Ciênc. Vida*, 21:127-146, 1999.

MILLER, J. L.; DE WET, B. J. M.; MARTINEZ-POMARES, L.; RADCLIFFE, C. M. DWEK, R. A; RUDD, P. M.; GORDON, S. The mannose receptor mediates dengue virus infection of macrophages. *PLoS Pathog* v. 4(2): e17, 2008.

MIRTH, D.B.; MILLER, C.J.; KINGMAN, A.; BOWEN, W.H. Binding of Salivary Aggregating Factors for *Streptococcus mutans* by Concanavalin A and Fucose-Binding Protein. *Caries Res.* 15, 1-8, 1981

MITHOFER, A. Suppression of plant defence in rhizobia-legume symbiosis. *Trends Plant Sci.* Oct;7(10):440-4. Review, 2002.

MOFFET, M. L and COLWELL, R. R. Adansonian analysis of the Rhizobiaceae. *J. Gen. Microbiol.* 51, 245–266, 1968.

MOLCHANOVA, V.; CHIKALOVETS, I.; CHERNIKOV, O.; BELOGORTSEVA, N.; LI, W.; WANG, J.H.; YANG, D.Y.; ZHENG, Y.T.; LUKYANOV, P.A. New lectin from the sea worm *Serpula vermicularis*: Isolation, characterization and anti-HIV activity. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* Dec 5, 2006.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J.O. Fixação Biológica do Nitrogênio, capítulo 9, p. 501-529. In: *Microbiologia e Bioquímica do Solo*. Editora UFLA, 729 p, 2000.

MOREIRA, R.A; CAVADA, B.S. Lectin from *Canavalia brasiliensis* Mart. Isolation, characterization and behavior during germination. *Biol Plant Praga – Checoslov;*26:113–20, 1984.

MOTTA, VT. Bioquímica básica. 2. ed. São Paulo: Autolab, 2003. 365p.

MYLONA, P, PAWLOWSKI, K., and BISELING, T. Symbiotic nitrogen fixation. *Plant Cell* 7: 869-885, 1995.

NAGANO, C.S.; MORENO, F.B.M.B.; BLOCH, J.R.C.; PRATES, M.V.; CALVETE, J.J.; SAKER-SAMPAIO, S.; FARIAS, W.R.L.; TAVARES, T.D.; NASCIMENTO, K.S.; GRANGEIRO, T.B.; CAVADA, B.S.; SAMPAIO, A.H. Purification and Characterization of a new Lectin from the Red Marine Alga *Hypnea Musciformis* Protein and Peptide Letters, 9(2); 159-165, 2002.

NAKAMURA, K.; ERA, S.; OZAKI, Y.; SOGAMI, M.; HAYASHI, T.; MURAKAMI, M. Conformational changes in seventeen cystine disulfide bridges of bovine serum albumin proved by Raman spectroscopy. *Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett.*, v.417, p. 375-378, 1997.

NAUTA, A.J.; CASTELLANO, G.; XU, W.; WOLTMAN, A.M.; BORRIAS, M.C. DAHA, M.R.; VAN KOOTEN, C.; ROOS, A. Opsonization with C1q and mannose-binding lectin targets apoptotic cells to dendritic cells. *J Immunol*, 173(5): 3044-50, 2004.

NEWTON, W. E. Nitrogen fixation in perspective. In: PEDROSA, F. O.; HUNGRIA, M.; YATES, M. G.; NEWTON, W. E. (eds.) *Nitrogen Fixation: From Molecules To Crop Productivity*. Kluwer Academic Publishers, 2000.

PELEGRIN, R. ; MERCANTE, F. M. ; OTSUBO, I. M. N. ; OTSUBO, A. A. . Resposta da cultura do feijoeiro à adubação nitrogenada e à inoculação com rizóbio. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 33, p. 219-226, 2009.

PEREIRA, P.A.A.; ARAUJO, R.S.; ROCHA, R.E.M.; STEINMETZ, S. Capacidade dos genótipos de feijoeiro de fixar N<sub>2</sub> atmosférico. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.19, p.811-815, 1984.

PEUMANS, W.J and VAN DAMME, W.J.M. Lectins as Plant Defense Proteins. *Plant Physiol.* 109: 347-352, 1995.

PEUMANS, W.J.; DE LEY, M.; BROEKAERT, W.F. An unusual lectin from stinging nettle (*Urtica dioica*) rhizomes. *FEBS Letters*, 177, 99-103, 1984.

PEUMANS, W.J.; HAUSE, B.; VAN DAMME E.J.; The galactose-binding and mannose-binding jacalin-related lectins are located in different sub-cellular compartments. *FEBS Lett.* 477(3), 186-92, 2000.

PEUMANS, W.J.; NSIMBA-LUBAKI, M.; PEETERS, B.; BROEKAERT, W.F. Isolation and partial characterization of a lectin from ground elder (*Aegopodium podagraria*) rizoms. *Planta*, 164, 75-82, 1985.

PINTO-DA-SILVA, L.H.; CAMURATE, M.; COSTA, K.A.; OLIVEIRA, S.M.P.; CUNHA-E-SILVA, N.L.; SARAIVA, E.M.B. *Leishmania (Viannia) braziliensis* metacyclic promastigotes purified using *Bauhinia purpurea* lectin are complement resistant and highly

infective for macrophages in vitro and hamsters in vivo. *International Journal for Parasitology*, 32(11), 1371-1377, 2002.

POWSON, D.S. Understanding the soil nitrogen cycle. *Soil Use and Management*. 9:86 – 94, 1993.

RADIS-BAPTISTA, G.; MORENO, F.B.; NOGUEIRA, L.L.; MARTINS, A.M.; OLIVEIRA, T.D.; TOYAMA, M.H.; CAVADA, B.S.; DE AZEVEDO, W.F.Jr, YAMANE, T. Crotacetin, a novel snake venom C-type lectin homolog of convulxin, exhibits an unpredictable antimicrobial activity. *Cell Biochem Biophys*. 44(3): 412-23, 2006.

RAIJ, B. van. Fertilidade do solo e adubação. Piracicaba: Agronômica Ceres, Associação Brasileira para a Pesquisa da Potassa e do Fosfato. 343p, 1991.

RAMOS, M.L.G.; BODDEY, R.M. Yield and nodulation of *Phaseolus vulgaris* and the competitiveness of an introduced *Rhizobium* strain: effects of lime, mulch and repeated cropping. *Soil Biology & Biochemistry*, v.19, p.171-177, 1987.

RAPIN, A.M.; BURGER, M.M. Tumor cell surfaces: general alterations detected by agglutinins. *Adv Cancer Res*. 20: 1-91, 1974.

RICCILLO, P.M; COLLAVINO, M.M; GRASSO, D.H; ENGLAND, R; BRUIJN, F.J and AGUILAR, O.M. A *guaB* Mutant Strain of *Rhizobium tropici* CIAT899 Pleiotropically Defective in Thermal Tolerance and Symbiosis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. Vol. 13, No. 11, 2000.

ROBERTS, D.D.; GOLDSTEIN, I.J. Adenine binding sites of the lectin from lima beans (*Phaseolus lunatus*). *J Biol Chem*. 258(22): 13820-4, 1983.

ROBERTS, D.D.; GOLDSTEIN, I.J. Effect of carbohydrate and metal ion binding on the reactivity of the essential thiol groups of lima bean lectin. *J Biol Chem*. 259(2): 903-8, 1984.

ROBERTS, D.D.; GOLDSTEIN, I.J. Hydrophobic binding properties of the lectin from lima beans (*Phaseolus lunatus*). *J Biol Chem*. 10;257(19): 11274-7, 1982.

RODRIGUEZ, D.; CAVADA, B.S.; OLIVEIRA, J.T.A.; MOREIRA, R.A.; RUSSO, M. Differences in macrophage stimulation and leukocyte accumulation in response to intraperitoneal administration of glucose/mannose-binding plant lectins. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, 25, 823-826, 1992.

ROGERS, D.J.; BLUNDEN, G.; EVANS, P.R. *Ptilota plumose*, A new source of a blood group B specific lectin. *Medic Laboratory Sciences*, 34: 193-200, 1977.

RÜDIGER H; GABIUS H J. Plant lectins: occurrence, biochemistry, functions and applications. *Glycoconjugate journal*;18(8):589-613, 2001.

RUMJANEK, N. G.; MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R.; NEVES, M. C. P. Fixação biológica de nitrogênio. In: FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. de A.; RIBEIRO, V. Q. (Ed.). *Feijão-caupi: avanços tecnológicos*. Brasília, DF. Embrapa Informação Tecnológica, Teresina. Embrapa Meio-Norte. p. 281-355, 2005..

SAEVARSDOTTIR, S.; VIKINGSDDOTTIR, T.; VALDIMARSSON, H. The potential role of mannan-binding lectin in the clearance of self-components including immune complexes. *Scand J Immunol*, 60(1-2): p. 23-9, 2004.

SAFFER, L.D.; PETRY, W.A.J. Role of the galactose lectin *Entamoeba histolytica* in adherence-dependent killing of mammalian cells. *Infect. Immun.*, 59(12), 4681-4683, 1991.

SAMPAIO, A.H. Hemaglutininas de algas marinhas do nordeste brasileiro e isolamento da hemaglutinina de *Hypnea musciformis* (WULFEN) LAMOUROUX. Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, 74, 1992.

SAMPAIO, A.H. Lectins from *Ptilota* and *Ulva* species. Tese de Doutorado apresentada a Universidade de Portsmouth, Inglaterra, 198, 1997.

SANTOS, A. B. dos.; FAGERIA, N. K.; SILVA, O. F. da.; MELO, M. L. B. de. Resposta do feijoeiro ao manejo de nitrogênio em várzeas tropicais. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 38, n. 11, p. 1265-1271, 2003.

SANZ-APARÍCIO, J.; HERMOSO, J.; GRANJEIRO, T.B.; CALVETE, J.J.; CAVADA, B.S. The crystal structure of *Canavalia brasiliensis* lectin suggests a correlation between its quaternary conformation and its distinct lectin biological properties from Concanavalin A. *FEBS Letters*, v 405, p. 114-118, 1997.

SAYYAH, M.; HADIDI, N.; KAMALINEJAD, M. Analgesic and anti-inflammatory activity of *Lactuca sativa* seed extract in rats *Journal of Ethnopharmacology* 92: 325–329, 2004.

SCHLESINGER, W. H. *Biogeochemistry: An Analysis of Global Change*, 2ed. Academic Press, San Diego, CA. 1997.

SHARMA, A.; SHARMA, S.; KHULLER, G.K. Lectin-functionalized poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles as oral/aerosolized antitubercular drug carriers for treatment of tuberculosis. *J Antimicrob Chemother*, v. 25, 2004.

SHARMA, V.; SUROLIA, A. Analyses of carbohydrate recognition by legume lectins: size of the combining site loops and their primary specificity. *J Mol Biol.* 28; 267(2): 433-45, 1997.

SHARON, N and LIS, H. Legume lectins--a large family of homologous proteins. *FASEB J.* 4(14): 3198-208. Review, 1990.

SHARON, N. and LIS, H. Lectins: cell-agglutinating and sugarspecific proteins. *Science*, 177, 949–959, 1972.

SHARON, N. Bacterial Lectins, *Cell-Cell Recognition and Infections Disease*. *FEBS Lett.* 217 (2): 145-157, 1987.

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

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

SHARON, N.; LIS, H. *LECTINS*, Chapman and Hall. London 126, 1989.

SHIBUYA, N.; GOLDSTEIN, I.J.; SHAFER, J.A.; PEUMANS, W.J.; BROEKAERT, W.F. Carbohydrate binding properties of the stinging nettle (*Urtica dioica*) rhizome lectin. *Arch Biochem Biophys*. 15:249(1): 215-24, 1986.

SINGH, S. P; GEPTS, P AND DEBOUCK, D. G. Races of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). *Econ. Bot.* 45, 379–396, 1991.

SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S.; GRISE, B.M.; HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R.S. *Microrganismos e Processos Biológicos do Solo: Perspectivas Ambientais*. Brasília-SPI. (EMBRAPA-CNPAP. Documentos, 45). 142p, 1994.

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

SMITHSON, P.C.; GILLER, K.E. Appropriate farm management practices for alleviating N and P deficiencies in low-nutrient soils of the tropics. *Plant and Soil*, The Hague, v. 245, n.1, p.169-180, 2002.

SOARES, A.L.; PEREIRA, J.P.A.R.; FERREIRA, P.A.A.F.; VALE, H.M.M.; LIMA, A.S.; ANDRADE, M.J.B.; MOREIRA, M.S.. Eficiência agronômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em Perdões (MG). I – caupi. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa-MG, v. 30, p.795-802, 2006.

SOJAR, H.T.; SHARMA, A.; GENCO, R.J. *Porphyromonas gingivalis* fimbriae binds to neoglycoproteins: evidence for a lectin-like interaction. *Biochimie*. 86(4-5): 245-9, 2004.

SPAINK, H.P. Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 54:257–88, 2000.

STILLMARK, H. Über Ricin ein giftiges Ferment aus den Samen von *Ricinus communis* L. und einigen anderen Euphorbiaceen.. *Inaugural Dissertation Dorpat – Tese de Doutorado*. Universidade de Dorpat, Estônia, 1888.

STOKKERMANS, T. J. W., IKESHITA, S., COHN, J., CARLSON, R. W, STACEY, G., OGAWA, T., and PETERS. N. K. Structural requirements of synthetic and natural product lipo-chitin oligosaccharides for induction of nodule primordia on *Glycine soja*. *Plant Physiol.* 108: 1587-1595, 1995.

STRALIOTTO, R; TEIXEIRA, M.G; MERCANTE, F.M. Fixação Biológica de Nitrôgeno. In: AIDAR, H; KLUTHCOUSKI, J; STONE, L.F. Produção de feijoeiro comum em várzeas tropicais. Santo Antonio de Goiás: Embrapa arroz e feijão. P. 120-153, 2002.

SUZUKI, Y.; TASUMI, S.; TSUTSUI, S.; OKAMOTO, M.; SUETAKE, H. Molecular diversity of skin mucus lectins in fish. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 136(4): 723-30, 2003.

SYTNIKOV, D. M., KOTS S. YA, and DATSENKO V. K. Efficacy of Biological Preparations of Soybean Root Nodule Bacteria Modified with a Homologous Lectin. *Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya*, 2007, Vol. 43, No. 3, pp. 304–310. 2007

SYTNIKOV, D. M; KIRIZII, D. A.; MALICHENKO, S. M. and KOTS, S. YA. Productivity of Soybean–Rhizobium Symbiosis after Modification of Root Nodule Bacteria ctivity with Exogenous Proteins. *Russian Journal of Plant Physiology.* Vol. 54, No. 3, pp. 366–372, 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia vegetal.* 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 719p, 2004.

TATTINI, V; PARRA, D.F; PITOMBO, R.N.M. Influência da taxa de congelamento no comportamento físico-químico e estrutural durante a liofilização da albumina bovina. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.* vol. 42, n. 1, j.an./mar., 2006.

TEIXEIRA, E.H ; NAPIMOGA, M.H; CARNEIRO, V. A. ; OLIVEIRA, T.M ; NASCIMENTO, K. S; NAGANO, C.S; SOUSA, J.B; HAVT, A; PINTO, V.P.T; GONÇALVES, R.B; FARIAS, W.R.L ; SAMPAIO, S.S ; SAMPAIO, A.H; CAVADA, B.S. In vitro inhibition of oral streptococci binding to enamel acquired pellicle by Algal Lectins. *Journal of Applied Microbiology.* v. 103, p. 1001-1006, 2007.

TEIXEIRA, E.H., NAPIMOGA,M.H.; CARNEIRO, C.A.; OLIVEIRA, T.M.; CUNHA, R.M.S.; HAVT, A.; MARTINS, J.L.; PINTO, V.P.T.; GONÇALVES, R.B.; CAVADA, B.S. In vitro inhibition of Streptococci binding to enamel acquired pellicle by plant lectins. *J Appl Microbiol*, 101: 111–116, 2006.

TIMMERS, A . C. J., AURIAC, M.-C., and TRUCHET, G. Refined analysis of early symbiotic steps of the Rhizobium-Medicago: Interaction in relation with microtubular cytoskeleton rearrangements. *Development* 126: 3617-3628, 1999.

UMETSU, K.; YAMASHITA, K.; SUZUKI, T. 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, 1991.

VAN DAMME, E. J. M; PEUMANS, W.J; BARRE, A and ROUGÉ, P. Plant Lectins: A Composite of Several Distinct Families of Structurally and evolutionary Related Proteins with Diverse Biological Roles. *17(6):575–692*, 1998.

VAN RHIJN, P, GOLDBERG, R. B., and HIRSCH, A . M. Lotus corniculatus nodulation specificity is changed by the presence of a soybean lectin gene. *Plant Cell* 10: 1233-1249, 1998.

VAN RHIJN, P.; GOLDBERG, R. B.; HIRSCH, A. M. Lotus corniculatus nodulation specificity is changed by the presence of a soybean lectin gene. *The Plant Cell*, v. 10, p. 1233-49, 1998.

VANDENBOSCH, K. A.; RODGERS, L. R.; SHERRIER, D. J.; KISHINEVSKY, B. D. A peanut nodule lectin in infected cells and in vacuoles and the extracellular matrix of nodule parenchyma. *Plant Physiology*, v. 104, p. 327-37, 1994.

VENTURINI, S. F.; ANTONIOLLI, Z. I.; VENTURINI, E. F.; GIRACCA, E. M. N. Efeito da inoculação com *Rhizobium* e aplicação de nitrogênio em cobertura na cultura do feijoeiro. UFSM, CCR, Departamento de Solos, Santa Maria-RS. 4p. 2002.

VLASSAK, K; MERCANTE, F.M; STRALIOTTO, R; FRANCO, A.A.; VUYLSTEKE, M; VANDERLEYDEN, J. Evaluation of the intrinsic competitiveness saprophytic competence of *Rhizobium tropici* IIB strain. *Biology and Fertility of Soils*. Berlin v.24, p 274-282, 1997.

VLASSAK, K; VANDERLEYDEN, J; FRANCO, A.A. Competition and persistence of the *Rhizobium tropici* and *Rhizobium etli* in a tropical soil during successive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultures. *Biology and Fertility of Soils*. Berlin v.21. p 61-68, 1996.

WANI, S.P.; RUPELA, O.P.; LEE, K.K. Sustainable agriculture in the semi-arid tropicsthrough biological nitrogen in grain legumes. *Plant and Soil*, v. 174, p. 29-491995.

WATKINS, W. M. and MORGAN, W. T. J. Neutralization of the anti-H agglutinin in eel by simple sugars. *Nature* 169: 825–826, 1952.

WILLEMS, A. The taxonomy of rhizobia: an overview. *Plant and Soil* 287:3–14, 2006.

WILSON, J. K. Over five hundred reasons for abandoning the cross inoculation groups of legumes. *Soil Sci.* 58, 61–69, 1944.

WONG, P.P. Interactions between Rhizobia and Lectins of Lentil, Pea, Broad Bean, and Jackbean. *Plant Physiol.* 65, 1049-105, 1980.

YAMADA, Y.; AKETA, K. Purification and partial characterization of hemagglutinins in seminal plasma of the sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*. *Bioch et Bioph Acta*, 709: 220-226, 1982.

YAMAMOTO, A. M.; CHERNAJOVSKY, Y.; LEPAULT, F.; PODHAJECER, O.; FELDMANN, M.; BACH, J. F. and CHATENAUD, L. The activity of immunoregulatory t cells mediating active tolerance is potentiated in nonobese diabetic mice by an il-4-based retroviral. *The Journal of Immunology*, 166: 4973-4980, 2001.

YOSHIDA, S.; SHIMADA, Y.; KONDOH, D.; KOUZUMA, Y.; GLOSH, A. K.; JACOBS-LORENA, M.; SINDEN, R. E. Hemolytic C-Type Lectin CEL-III from Sea cucumber expressed in transgenic mosquitoes impairs malaria parasite development. *PLoS Pathogens*, 3 (12): 1962-1970, 2007.

YU, X.Q.; KANOS, M.R. Immulectin-2, a lipopolysaccharide-specific lectin from na insect, *Manduca Sexta* is induced in response to gran negative bacteria. *J. Biol. Chem.*, 275(48): 37373-37381, 2000.