



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

PATRÍCIA GADELHA DE CASTRO

**XILOGLUCANAS E GALACTOMANANAS DE LEGUMINOSAS:
INTERAÇÃO COM LECTINAS D-GALACTOSE-LIGANTES.**

FORTALEZA

2007

PATRÍCIA GADELHA DE CASTRO

**XILOGLUCANAS E GALACTOMANANAS DE LEGUMINOSAS:
INTERAÇÃO COM LECTINAS D-GALACTOSE-LIGANTES.**

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

Orientador: Prof. Dr. Renato de Azevedo
Moreira.

Co-Orientadora: Dra. Daniele Maria Alves
Teixeira-Sá.

FORTALEZA

2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- C35 Castro, Patrícia Gadelha de.
Xiloglucanas e galactomananas de leguminosas: interação com lectinas d-galactose-ligantes /
Patrícia Gadelha de Castro – 2007.
100 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de
Bioquímica e Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2007.
Área de Concentração: Bioquímica Vegetal.
Orientação: Dr. Renato de Azevedo Moreira.
Coorientação: Profa. Dra. Daniele Maria Alves Teixeira-Sá.
1. Carboidratos. 2. Cromatografia. 3. Gomas. I. Título.

CDD 574.192

PATRÍCIA GADELHA DE CASTRO

**XILOGLUCANAS E GALACTOMANANAS DE LEGUMINOSAS:
INTERAÇÃO COM LECTINAS D-GALACTOSE-LIGANTES.**

Dissertação submetida à coordenação do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

Aprovada em: 13.07.2007

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Renato de Azevedo Moreira (Orientador)

Universidade de Fortaleza



Prof. Dra. Daniele Maria Alves Teixeira-Sá (Co-Orientadora)

Universidade Estadual do Ceará



Prof. Dra. Ana Cristina Monteiro Moreira

Universidade de Fortaleza

*Ao querido David
e aos meus pais,
Expedito e Janice,
Com amor e gratidão.*

**“Sem sonhos, as perdas se tornam insuportáveis, as pedras do caminho se tornam montanhas, os fracassos se transformam em golpes fatais. mas se você tem grandes sonhos... seus erros produzirão crescimento, seus desafios produzirão oportunidades, seus medos produzirão coragem.”
(Augusto Cury)**

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a Deus, minha força, meu rochedo e minha fortaleza, por ter-me ensinado que, nas falhas e lágrimas, se esculpe a sabedoria.

Aos meus pais, pelo apoio e amor incondicional durante todo o percurso. Obrigada por me terem ajudado a construir meu caráter e por se terem dedicado, mesmo com tantas dificuldades, à minha formação. Vocês são essenciais na minha vida!

Ao David, meu preto, pela paciência e amor que demonstrou a todo instante; pelo incentivo, sem o qual, muitas vezes, teria desistido e pela compreensão nos momentos em que estive ausente, dedicando-me ao trabalho. Espero, um dia, retribuir da mesma forma todo esse carinho.

Aos meus irmãos Ronald, Fabrício e Christiane, por transformarem momentos familiares em momentos de descanso e descontração. Obrigada pelo carinho!

À amiga e Co-orientadora Dra. Daniele Teixeira, por ter-se doado no momento em que mais precisei, pela atenção, orientação e por ter permitido que utilizasse parte de seu projeto para realizar este trabalho.

Ao professor Dr. Renato de Azevedo Moreira, por ter aberto as portas de seu laboratório para mim e por toda a orientação durante esses dois anos.

À profa. Dra. Ana Cristina de Azevedo Moreira, por ter-me recebido tão gentilmente em seu laboratório na UNIFOR para que parte do trabalho fosse feita.

À profa. Dra. Ana Cecília Góes Horta, pelo adorável convívio no Lablec II, pela atenção e paciência durante esses dois anos.

Ao Prof. Itamar Filgueiras, pessoa adorável, que tive o prazer de conhecer nos últimos meses e com quem aprendi bastante durante a redação deste trabalho. O amor com o qual ele desempenha seu trabalho deveria ser imitado por muitos. Obrigada pela paciência e correção desta dissertação.

Aos pesquisadores Dr. Marcos Silveira Buckeridge, Dra Carmen Lúcia de O. Petkowicz e Dra. Fany Reicher, por terem cedido gentilmente as amostras de polissacarídeos para a realização dos experimentos.

Aos amigos do laboratório de lectinas e glicoconjugados, que, durante esse tempo, foram para mim uma grande e maluca família; em especial às amigas Gabrieli e Shelly, pelas inúmeras vezes que trabalharam comigo até tarde, durante feriados e finais de semana, para que este trabalho fosse concluído em tempo recorde. Sem a ajuda de vocês, não teria sido possível. Aos amigos Ossian e Carlos Eduardo, pela ajuda com os últimos detalhes, e a todos os outros

companheiros, Wagner, Morgana, Álvaro, Renata, Clébia, Fábria e Ed Carlos agradeço de coração pelos conselhos, trocas de conhecimentos e amizade.

Aos amigos e professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.

À amiga Ana Luiza de Oliveira Timbó, pelo incentivo para que eu buscase a Pós-Graduação e por ter me despertado para o mundo da pesquisa.

Ao primo querido (em memória) Dr. Adriano Cordeiro Gadelha, pelo carinho, incentivo e por ter sido modelo de perseverança e dedicação aos estudos.

A TODOS SOU EXTREMAMENTE GRATA!

Este trabalho foi realizado graças às seguintes instituições:

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior (CAPES);

Conselho nacional de Desenvolvimento científico e Tecnológico (CNPq);

Fundação Cearense de Amparo á Pesquisa do Estado do Ceará (FUNCAP);

Universidade de Fortaleza (UNIFOR);

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – Universidade Federal do Ceará (UFC).

RESUMO

Polissacarídeos ocorrem em grandes quantidades nas sementes como componentes da parede celular ou como reserva. Dentre estes últimos, incluem-se as xiloglucanas cotiledonárias e as galactomananas endospermicas. As xiloglucanas apresentam uma cadeia principal de β -D-(1 \rightarrow 4)-glucana ramificada com ligações α -(1 \rightarrow 6) por resíduos D-xilopiranosídeos ou β -D-galactopiranosídeo-(1 \rightarrow 2)-D-xilopiranosídeos, enquanto as galactomananas endospermicas consistem em cadeias poliméricas de resíduos β -D-manopiranosil (1 \rightarrow 4) ligados, substituídos em O-6 por unidades de α -D-galactopiranosil. O objetivo deste trabalho foi analisar a interação de xiloglucanas e galactomananas com lectinas galactose-ligantes e, assim, sugerir o uso de tais polissacarídeos como alternativa barata e eficaz na preparação de matrizes cromatográficas para o isolamento e determinação da especificidade anomérica de novas lectinas. Dessa forma, as interações das lectinas das sementes de *Artocarpus integrifolia* (frutalina), *Artocarpus incisa* (jacalina), *Ricinus communis* (ricina) e *Arachis hypogaea* (PNA) com matrizes de xiloglucanas de sementes de *Copaifera langsdorffii*, *Mucuna sloanei* e *Hymenaea courbaril* (MC, MMu, MJ, respectivamente) e de galactomananas de *Mimosa scabrella*, *Stryphnodendron barbatiman*, *Adenantha pavonina* e *Dimorphandra mollis* (MM, MS, MA; MD, respectivamente) foram analisadas. As galactomananas apresentaram melhor capacidade de retenção da jacalina (MA – 0,92 mg ; MM – 1,48 mg ; MD – 0,88 mg ; MS – 0,83 mg) e da frutalina (MA – 0,99 mg ; MM – 1,09 mg ; MD – 0,94 mg ; MS – 0,85 mg), lectinas que possuem especificidade por α -D-galactose. Vale destacar que a galactomanana de *M. scabrella* apresentou melhor capacidade de retenção da lectinas testadas. Por outro lado a ricina, capaz de ligar-se aos dois anômeros, mas que se liga preferencialmente ao anômero β , teve maior massa retida nas colunas de xiloglucana (MMu – 2,17 mg ; MJ – 1,30 mg ; MC – 2,83 mg). Houve diferença nos perfis de retenção da PNA, que também se liga aos anômeros α e β da galactose, sendo que a melhor retenção foi na coluna contendo matriz de *M. sloanei* (0,12 mg). As colunas foram todas saturadas com extrato bruto a partir das farinhas das sementes, para que se utilizasse a capacidade máxima de retenção de cada matriz. Atividade hemaglutinante foi detectada em ambos os picos PI e PII. Para a ricina, atividade tóxica foi realizada e detectada para todos os PII obtidos. Por meio de SDS-PAGE, a pureza de cada uma das lectinas foi confirmada. Diante dos resultados expostos, pode-se sugerir o uso de xiloglucanas e galactomananas para o isolamento, purificação e determinação da especificidade anomérica de lectinas galactose-ligantes.

ABSTRACT

Polysaccharides are found in large quantity in seeds and they represent the main compounds of cell wall or reservoir. Among reservoir compounds, it included cotyledonary xyloglucans and endospermic galactomannans. The xyloglucans are made of a main chain of β -D-(1 \rightarrow 4)-glucan with α -(1 \rightarrow 6) ramifications of D-xylopyranoside or β -D-galactopyranoside-(1 \rightarrow 2)-D-xylopyranoside residues. Endospermic galactomannans are polimeric chains of β -D-mannopyranosil (1 \rightarrow 4) and replaceabled in O-6 for units of α -D-galactopyranosil. The aim of this work is investigate the interaction of xyloglucans and galactomannans with galactose bounding lectins and show the possibility of the usage of these polysaccharides as cheap and useful chromatographic matrices for isolation and determination of anomeric specificity of galactose bounding lectins. The interactions of lectins from seeds of *Artocarpus integrifolia* (frutalin), *Artocarpus incisa* (jacalin), *Ricinus communis* (ricin) e *Arachis hypogaea* (PNA) were performed with coluns of xyloglucans of seeds from *Copaifera langsdorffii*, *Mucuna sloanei* and *Hymenaea courbaril* (MC, MMu, MJ, respectively) and galactomannans from *Mimosa scabrella*, *Stryphnodendron barbatiman*, *Adenanthera pavonina* and *Dimorphandra mollis* (MM, MS, MA; MD, respectively). The galactomannans showed the best colun interaction capacity for the jacalin (MA – 0,92 mg ; MM – 1,48 mg ; MD –0,88 mg ; MS – 0,83 mg) and frutalin (MA – 0,99 mg ; MM – 1,09 mg ; MD - 0,94 mg ; MS - 0,85 mg) lectins. Remarkably the *M. scabrella* galactomannan showed the best colun interaction among all lectins analysed. On the other hand, ricin was better hold in coluns made of xyloglucan (MMu – 2,17 mg ;MJ – 1,30 mg; MC – 2,83 mg). For PNA lectin, differences were detected in colun interaction capacity. The best colun interaction was with the *M. sloanei* matrix (0,12 mg) for PNA lectin. All coluns were fill with sample extract of flour from seeds and hemagglutination assays was performed with PI and PII. In these assays, hemagglutination activity was detected in both PI and PII from the coluns. For ricin, toxic activity was made and it was detected for all obtained chromatographic samples. With SDS-PAGE it was possible confirmed the purification of the studied lectins. The bands in polyacrilamid gel were the same for the lectins purified. In conclusion, it can be suggested the usage of xyloglucans and galactomannans for isolation, purification and determination of anomeric specificity of galactose-bounding lectins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura química parcial de uma xiloglucana de reserva de parede secundária.....	21
Figura 2 -	Estruturas simplificadas e nomenclatura para alguns oligossacarídeos relacionados às xiloglucanas.....	22
Figura 3 -	Jatobá (<i>Hymenaea courbaril</i>).....	25
Figura 4 -	<i>Mucuna sloanei</i>	26
Figura 5 -	Estrutura química parcial de uma galactomanana presente em endosperma de sementes.....	28
Figura 6 -	<i>Adenantha pavonina</i>	31
Figura 7 -	Representação esquemática dos diferentes tipos de lectinas vegetais: merolectinas, hololectinas, quimerolectinas, multilectinas e superlectinas.	33
Figura 8 -	Componentes monossacarídicos. Átomos são mostrados nas cores padrão.....	35
Figura 9 -	Lectina de amendoim (<i>Arachis hypogaea</i>).....	44
Figura 10 -	Estrutura do complexo jacalina-T-antígeno.....	46
Figura 11 -	Visão estérica do sítio ligante da jacalina com os ligantes (A) melibiose (Gal α 1-6Glc) e (B) metil- α -T-antígeno (Gal β 1-3GalNAc- α -O-me).....	47
Figura 12 -	Ricina.....	50
Figura 13 -	Extração de xiloglucana de mucuna (<i>M. sloanei</i>).....	54
Figura 14 -	Esquema de extração das xiloglucanas de sementes de jatobá (<i>H. courbaril</i>) e copaíba (<i>Copaifera langsdorffii</i>).....	56
Figura 15 -	Esquema de extração da galactomanana de sementes de carol (<i>A. pavonina</i>).....	58
Figura 16 -	Perfis cromatográficos da lectina de <i>A. integrifolia</i> (jaca) em colunas de galactomananas e xiloglucanas.....	65
Figura 17 -	Eletroforese (SDS-PAGE) das frações não-retidas (PI) do extrato total de <i>Artocarpus integrifolia</i>	66
Figura 18 -	Massa retida de jacalina em matriz de afinidade de galactomananas e xiloglucanas.....	67
Figura 19 -	Eletroforese (SDS-PAGE) das frações retidas do extrato total de <i>A.</i>	

	<i>integrifolia</i>	70
Figura 20 -	Perfis cromatográficos da lectina de <i>A. incisa</i> (fruta-pão) em colunas de galactomananas e xiloglucanas.....	71
Figura 21 -	Análise comparativa da retenção das lectinas de <i>A. integrifolia</i> e <i>A. incisa</i> em colunas de galactomananas e xiloglucanas.....	72
Figura 22 -	Eletroforese em gel de poliacrilamida da fração não-retida do extrato total de <i>A. incisa</i>	73
Figura 23 -	Eletroforese em gel de poliacrilamida da fração não-retida do extrato total de <i>A. incisa</i>	74
Figura 24 -	Perfis cromatográficos da lectina de <i>Ricinus communis</i> (ricina) em colunas de galactomananas e xiloglucanas.....	76
Figura 25 -	Massa de ricina retida nas matrizes cromatográficas de galactomananas e xiloglucanas.....	77
Figura 26 -	Eletroforese (SDS-PAGE) da fração não-retida do extrato total de <i>Ricinus communis</i>	79
Figura 27 -	Eletroforese (SDS-PAGE) da fração retida do extrato total de <i>Ricinus communis</i> em colunas de galactomananas.....	80
Figura 28 -	Eletroforese (SDS-PAGE) da fração retida do extrato total de <i>Ricinus communis</i> em colunas de xiloglucanas.....	81
Figura 29 -	Perfis cromatográficos da lectina de <i>Arachis hypogaea</i> (amendoim) em colunas de galactomananas e xiloglucanas.....	82
Figura 30 -	Massa retida da lectina de <i>A. hypogaea</i> nas matrizes cromatográficas de galactomananas e xiloglucanas.....	84
Figura 31 -	Eletroforese (SDS-PAGE) da fração não-retida do extrato total de <i>Arachis hypogaea</i>	85
Figura 32 -	Eletroforese (SDS-PAGE) da fração retida do extrato total de <i>Arachis hypogaea</i>	86
Figura 33 -	Eletroforese (SDS-PAGE) da fração retida do extrato total de <i>Arachis hypogaea</i>	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Principais compostos de reserva e as características relevantes para as suas funções nas sementes.....	18
Tabela 2 -	Proporção de oligossacarídeos derivados da digestão completa em xiloglucanas de diferentes espécies.....	26
Tabela 3 -	Determinação de proteínas solúveis pelo método de Lowry, modificado por Hartree (1972), das amostras dos polissacarídeos.....	63
Tabela 4 -	Parâmetros das matrizes de afinidade preparadas a partir de galactomananas e xiloglucanas.....	63
Tabela 5 -	Massa retida de jacalina em matriz cromatográficas de galactomananas e xiloglucanas.....	66
Tabela 6 -	Razão manose/galactose das galactomananas utilizadas.....	68
Tabela 7 -	Massa de lectina (jacalina e frutalina) retida nas colunas de galactomananas e xiloglucanas.....	72
Tabela 8 -	Massa de ricina retida em cada uma das matrizes cromatográficas.....	77
Tabela 9 -	Atividade hemaglutinante da fração retida de <i>R. communis</i> em cada uma das matrizes cromatográficas.....	81
Tabela 10 -	Massa retida da lectina de <i>A. hypogaea</i> nas matrizes cromatográficas de galactomananas e xiloglucanas.....	83

LISTA DE ABREVIATURAS

MC	Matriz de xiloglucana de sementes de <i>Copaifera langsdorffii</i>
MMu	Matriz de xiloglucana de sementes de <i>Mucuna sloanei</i>
MJ	Matriz de xiloglucana de sementes de <i>Hymenaea courbaril</i>
MM	Matriz de galactomanana de sementes de <i>Mimosa scabrella</i>
MS	Matriz de galactomanana de sementes de <i>Stryphnodendron barbatiman</i>
MA	Matriz de galactomanana de sementes de <i>Adenantha pavonina</i>
MD	Matriz de galactomanana de sementes de <i>Dimorphandra mollis</i>
PI	Pico 1
PII	Pico II
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (desnaturante)
SDS	Dodecil-sulfato de sódio
S/M	Razão sacarose/monossacarídeos
Glc ₄	Subunidades de quatro glucoses
Glc-Xyl-Gal	Proporção glucose:xilose:galactose
RIP	Proteína inativadora de ribossomos
PNA	Lectina de <i>Arachis hypogaea</i>
GlcNAc	N-acetilglucosamina
GalNAc	N-acetilgalactosamina

SUMÁRIO

1. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
1.1. Parede celular vegetal – Considerações gerais.....	15
1.2. Sementes e compostos de reserva.....	17
1.3. Xiloglucanas.....	19
1.3.1. Xiloglucana de <i>Copaifera langsdorffii</i> Desf.....	23
1.3.2. Xiloglucana de <i>Hymenaea courbaril</i>	24
1.3.3. Xiloglucana de <i>Mucuna sloanei</i>	25
1.4. Galactomananas.....	27
1.4.1. Galactomanana de <i>Mimosa scabrella</i> Benth.....	28
1.4.2. Galactomanana de <i>Dimorphandra mollis</i> Benth.....	29
1.4.3. Galactomanana de <i>Stryphnodendron barbatiman</i>	29
1.4.4. Galactomanana de <i>Adenantha pavonina</i>	30
1.5. Lectinas Vegetais.....	31
1.5.1. Especificidade por Açúcar.....	34
1.5.2. Isolamento por cromatografia de afinidade.....	36
1.5.3. Sítios carboidrato-ligantes e interações lectina-carboidrato.....	38
1.5.4. Propriedades Estruturais das lectinas de plantas.....	40
1.6. <i>Arachis hypogaea</i>	42
1.7. <i>Artocarpus integrifolia</i>	44
1.8. <i>Artocarpus incisa</i> L.....	47
1.9. <i>Ricinus communis</i>	48
2. OBJETIVO.....	51
3. MATERIAIS.....	52
3.1. Sementes.....	52
3.2. Polissacarídeos.....	52
3.3. Hemácias.....	52
3.4. Outros materiais.....	52
4. MÉTODOS.....	53
4.1. Isolamento dos polissacarídeos de sementes.....	53
4.1.1. Xiloglucana de sementes de <i>Mucuna sloanei</i>	53

4.1.2 Xiloglucanas de sementes de <i>Hymenaea courbaril</i> e <i>Copaifera langsdorffii</i>	55
4.1.3. Galactomanana de sementes de <i>Adenanthera pavonina</i>	57
4.2. Determinação de proteínas solúveis dos polissacarídeos.....	59
4.3. Reticulação do polissacarídeo com epiclorigrina.....	59
4.4. Isolamento das lectinas de <i>Arachis hypogaea</i> (PNA), <i>Artocarpus integrifolia</i> (jacalina), <i>Artocarpus incisa</i> (frutalina) e <i>Ricinus communis</i> (ricina).....	59
4.4.1. Preparo dos extratos brutos.....	59
4.4.2. Cromatografias de Afinidade.....	60
4.5. Ensaio de atividade hemaglutinante.....	60
4.6. Ensaio de atividade tóxica.....	61
4.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE-SDS).....	61
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
5.1. Extração dos polissacarídeos e determinação de proteínas solúveis.....	62
5.2. Preparação das matrizes de afinidade.....	63
5.3. Preparação dos extratos protéicos.....	64
5.4. Cromatografias de afinidade.....	64
5.4.1. Interação da jacalina com galactomananas e xiloglucanas.....	64
5.4.2. Interação da futalina com galactomananas e xiloglucanas.....	70
5.4.3. Interação da ricina com galactomananas e xiloglucanas.....	75
5.4.4. Interação da aglutinina de <i>A. hypogaea</i> com galactomananas e xiloglucanas.....	82
6. CONCLUSÃO.....	87
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1. Parede celular vegetal – Considerações gerais

Todas as células vegetais possuem parede celular, de suma importância para o crescimento e diferenciação em toda planta (TINÉ, 2002). Paredes celulares primárias são compostas por polissacarídeos, pequenas proporções de glicoproteínas e, em alguns tipos celulares especializados, existem também substâncias como lignina, suberina, cutina ou sílica (FRY, 2004). Por sua vez, a parede secundária contém pouca proteína ou pectina e normalmente contém lignina (CARPITA; MCCANN, 2000).

A parede celular primária governa a taxa e a direção da expansão celular e, dessa maneira, o tamanho final e a forma da célula (FRY, 2004). Os polissacarídeos dessa parede formam uma estrutura bifásica, composta por microfibrilas de celulose e um elemento matriz constituído de duas classes de polissacarídeos: pectinas e hemiceluloses. Outros constituintes dessas paredes incluem proteínas estruturais e enzimáticas, compostos hidrofóbicos e moléculas inorgânicas (ROSE; BENNETT, 1999). Podem ser caracterizados dois principais tipos de parede celular primária: as do tipo I, compostas principalmente por celulose, xiloglucana e pectina e as paredes primárias do tipo II, formadas principalmente por celulose, arabinoxilana e glucana (REID, 2000).

A parede celular secundária é uma espessa camada depositada internamente à parede primária, constituindo cerca de 90 % da parede celular em espessura. Cada camada possui uma orientação própria das microfibrilas de celulose, entre as quais se encontram localizadas porções de lignina e hemiceluloses. Essa parede começa a ser formada no momento em que cessa a expansão da parede celular primária. Deposita-se, na forma de um cilindro, em torno da parede primária pré-existente (EMONS; MULDER, 1998).

A celulose é o principal polímero de parede celular, servindo de “andaime” para a ligação de outros componentes (LEROUXEL *et al.*, 2006). As microfibrilas de celulose são formadas por cadeias de glucose β -1,4 ligadas que formam associações paralelas, de número variável, dependendo da espécie (ROSE; BENNETT, 1999). Essas microfibrilas são produzidas por complexos enzimáticos de celulose-sintase presentes na membrana plasmática e, em seguida, são depositadas, sob uma orientação controlada, diretamente dentro da parede. Nas paredes primárias, a orientação da deposição das microfibrilas é normalmente

perpendicular ao eixo do alongamento celular e acredita-se que esse controle seja desempenhado pelos microtúbulos (CARPITA; MCCANN, 2000; BASKIN, 2001).

Os polissacarídeos componentes da matriz são sintetizados no complexo de Golgi por glicano-sintases e glicosiltransferases e enviados para a parede por meio de vesículas secretoras (CARPITA; MCCANN, 2000; KEEGSTRA; RAIKHEL, 2001). As hemiceluloses constituem cerca de até 30% do peso das paredes celulares primárias, uma proporção igualmente grande das paredes secundárias mais espessas e quase 100% de algumas paredes especializadas, como as paredes celulares de reserva das sementes, nas quais os polissacarídeos são mobilizados como reserva nutritiva durante a germinação (REID, 2000). Os polissacarídeos hemicelulósicos são moléculas complexas que se associam, de forma não covalente, com as microfibrilas de celulose, formando uma matriz de ligações cruzadas, responsável pela resistência mecânica da parede. Em dicotiledôneas, as pontes de hidrogênio que se formam entre as microfibrilas de celulose e hemicelulose, provavelmente, constituem a base da parede primária. As hemiceluloses podem ser divididas em quatro principais classes: xiloglucanas, (galacto)mananas, (arabino)xilanas e glucanas de ligações mistas (LEROUXEL *et al.*, 2006).

Existem ainda as pectinas, polissacarídeos estruturalmente complexos, ricos em ácido galacturônico. Essas macromoléculas são capazes de modular a permeabilidade da parede a solutos, aderir células umas às outras e participar, eficientemente, na sinalização de infecções causadas por patógenos. (DIETRICH *et al.*, 1998). Esses polímeros são componentes abundantes nas paredes celulares primárias. As paredes do tipo I chegam a ter, aproximadamente, 35% de pectinas na sua constituição, sendo essa proporção menor nas paredes do tipo II, típicas de gramíneas (REID, 2000). A composição desses polímeros varia de tecido para tecido, compreendendo um número de domínios estruturais distinguíveis (MCNEIL *et al.*, 1984). Dentre esses domínios, destacam-se a homogalacturonana e a ramnogalacturonana I. Uma minoria quantitativa é representada pela ramnogalacturonana II, um domínio pectínico altamente conservado que possui função específica em ligar traços essenciais do elemento boro (O'NEILL *et al.*, 1996).

Em menor quantidade, dentre os constituintes da parede encontram-se as enzimas que participam do metabolismo dos polissacarídeos de parede, destacando-se as hidrolases e transferases, além de proteínas estruturais, das quais se podem citar as extensinas e proteínas ricas em hidroxiprolinas (TINÉ, 2002).

Cada polissacarídeo e glicoproteína constituintes da matriz da parede celular primária são, isoladamente, solúveis em água, porém, na parede intacta, essas moléculas estão ligadas,

formando um arcabouço que se sustenta em ambiente aquoso (IIYAMA *et al.*, 1994). Muitas dessas ligações cruzadas são não-covalentes e são fracas individualmente, mas numerosas o suficiente para conferir resistência. Outras ligações que formam esse arcabouço são covalentes e existem em menor número, mas são individualmente fortes (FRY *et al.*, 2004).

1.2. Sementes e compostos de reserva

Acredita-se que as sementes tenham surgido entre 360 e 340 milhões de anos atrás com o aparecimento das gimnospermas. A principal vantagem de tal passo evolutivo foi a de que, naquela nova estrutura, havia mais espaço para armazenar nutrientes e, ao mesmo tempo, o integumento oferecia um nível maior de proteção contra a perda de água e contra o ataque de patógenos e herbívoros (MAUSETH, 1998).

As reservas das sementes têm, basicamente, duas funções que se relacionam com a manutenção e o desenvolvimento do embrião até a formação de uma plântula que apresente a capacidade de se manter de uma forma autotrófica. As reservas podem funcionar como fonte de energia para manter processos metabólicos em funcionamento e/ou como fonte de matéria-prima para a construção de tecidos vegetais que irão constituir a plântula (BUCKERIDGE *et al.*, 2004).

Há enorme variação na composição das sementes, mas as substâncias armazenadas em grande quantidade constituem os carboidratos, os lipídeos e as proteínas. Os dois primeiros servem como fonte de energia e carbono para a germinação das sementes e o desenvolvimento das plântulas, enquanto as proteínas têm como função armazenar, principalmente, nitrogênio e enxofre, essenciais para a síntese de proteínas, ácidos nucleicos e compostos secundários na plântula em crescimento (BUCKERIDGE *et al.*, 2004). A tabela 1 mostra os principais compostos de reserva de sementes e sua distribuição por função.

Acredita-se que a razão sacarose/ monossacarídeos (S/M) funciona como um marcador do estado fisiológico dos tecidos em desenvolvimento, sendo menor que um no período de divisão e crescimento celular e maior que um durante o processo de espessamento da parede. Assim, a presença de grandes quantidades de sacarose, geralmente, indica que há alguma fonte de energia importante em ação na planta, e isso é “interpretado” pelo metabolismo como um sinal para acumular reservas (BUCKERIDGE *et al.*, 2004).

Os principais compostos derivados de carboidratos que atuam como reserva em sementes são a sacarose e os oligossacarídeos da série rafínósica, o amido e os polissacarídeos de reserva de parede celular (BUCKERIDGE *et al.*, 2004).

Tabela 1 – Principais compostos de reserva e as características relevantes para as suas funções nas sementes.
 Fonte: BUCKERIDGE *et al.*, 2004

Composto de reserva	Função principal como reserva	Fase de utilização	Funções secundárias	Outras características
SACAROSE E SÉRIE RAFINÓSICA	Fonte de carbono	Germinação	Manutenção da integridade de membranas	Reserva de uso rápido para produção de energia
AMIDO	Fonte de carbono	Desenvolvimento da plântula	-	Alto empacotamento e menor solubilidade
POLISSACARÍDEOS DE PAREDE CELULAR	Fonte de carbono	Desenvolvimento da plântula	Controle da embebição e propriedades mecânicas de cotilédones	Alto empacotamento e maior solubilidade
LIPÍDEOS	Fonte de carbono	Germinação e desenvolvimento da plântula	-	Insolúvel em água, mas produz mais energia por molécula
PROTEÍNAS	Fonte de carbono e nitrogênio	Germinação e desenvolvimento da plântula	-	Alto empacotamento, já possui aminoácidos que podem ser transportados diretamente
FITINA	Fonte de minerais	Germinação e desenvolvimento da plântula	-	Reserva essencial altamente empacotada

Enquanto a sacarose é praticamente universal, os oligossacarídeos da série rafinósica ocorrem em um grande número de sementes de dicotiledôneas. Em sementes ortodoxas, o período de enchimento do grão é sucedido por um período característico de secagem. A sacarose, principal composto de transporte de carbono dos órgãos fotossintéticos até a semente em desenvolvimento, pode ser acumulada em quantidades apreciáveis ao final do processo. Acredita-se que os oligossacarídeos mencionados sejam compostos de reserva, pois são degradados logo no início da germinação, porém, sua principal função tem sido atribuída à propriedade das sementes ortodoxas de estabilizarem suas membranas e, com isso, poderem permanecer secas por um longo período, após o qual germinam normalmente (BUCKERIDGE *et al.*, 2004).

O amido é uma das mais importantes formas de reserva de carbono nas plantas em termos de quantidade, universalidade de sua distribuição e importância comercial. É composto por polímeros de glucose dispostos em uma estrutura tridimensional, semicristalina, denominada grânulo de amido. Dentre os constituintes, o amido pode ser fracionado quimicamente em dois tipos de polímeros de glucose: amilose e amilopectina (BUCKERIDGE *et al.*, 2004).

Porém outros polissacarídeos ocorrem em grandes quantidades nas sementes, como componentes da parede celular ou como reserva. As xiloglucanas extraídas de sementes são originárias, principalmente, de paredes secundárias, que desempenham preferencialmente a função de reserva e para as quais tem sido descrita a presença de xiloglucanas não-fucosiladas (OLIVEIRA JÚNIOR; BRAGA; BUCKERIDGE, 2006; BUCKERIDGE *et al.*, 1992). Podemos citar as xiloglucanas presentes em muitas espécies de leguminosas e não-leguminosas, fazendo parte de paredes espessas em leguminosas não-endospermicas (LIMA *et al.*, 1995).

Um dos polissacarídeos de reserva de parede celular mais abundante na natureza é a galactomanana (BUCKERIDGE; DIETRICH; LIMA, 2000). Há um grande número de espécies que acumulam galactomananas em suas sementes (predominantemente no endosperma), e sua distribuição pode ser apreciada, inclusive, do ponto de vista taxonômico. Eles estão presentes em Annonaceae, Asteraceae, Convolvulaceae, Palmae, Rubiaceae e Leguminosae, mas é nessa última família que há o maior número de espécies com sementes que armazenam grandes quantidades de galactomananas (BUCKERIDGE *et al.*, 2004).

1.3. Xiloglucanas

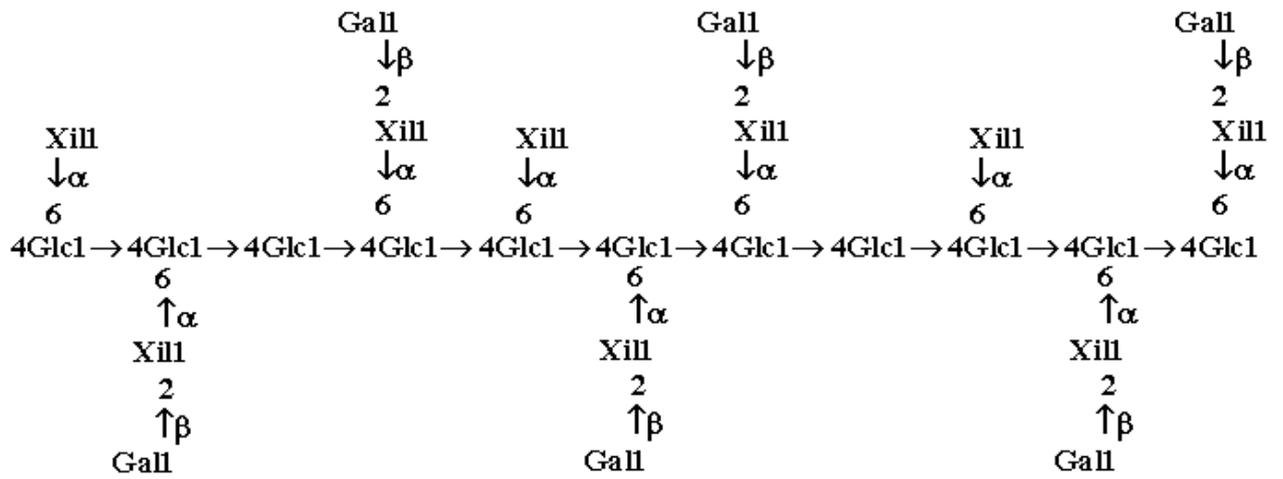
As xiloglucanas de sementes (figura 1), da mesma forma que a celulose, possuem uma cadeia principal formada por unidades de D-glucopiranoses $\beta(1\rightarrow4)$ ligadas, embora esse esqueleto seja substituído em O-6 por cadeias laterais de unidades de α -D-xilopiranoses, que modificam as propriedades físicas do polímero. Os resíduos xilosil podem ser substituídos em O-2 por resíduos β -D-galactopiranosil (HAYASHI; OGAWA; MITSUISHI, 1994). A xilosilação padrão, assim como a identidade e localização das cadeias laterais de açúcar, varia entre as espécies de plantas e, igualmente, entre populações da mesma espécie que se desenvolvem em ambientes distintos (HOFFMAN *et al.*, 2005; BUCKERIDGE *et al.*, 1992). Na parede primária, pode haver também resíduos de fucose ligados à galactose por meio de

ligações $\alpha(1\rightarrow2)$, o que caracteriza as xiloglucanas estruturais. Os resíduos de fucose não ocorrem, portanto, nas xiloglucanas de reserva (TINÉ, 2002).

O padrão de oligossacarídeos gerados por digestão com celulase, como já mencionado, varia de espécie para espécie, mas, geralmente, possui quatro glucoses na cadeia principal, três delas com ramificações de xilose, diferindo entre si pelo número e posição das ramificações de galactose (VICKEN; BELDMAN; VORAGEN, 1997). A xiloglucana de sementes de tamarindo (*Tamarindus indica*) é um exemplo já bem caracterizado desse padrão regular (YORK *et al.*, 1990). Após a descrição da xiloglucana de tamarindo, outras xiloglucanas foram também isoladas e descritas, como as de sementes de *Copaifera langsdorffii* (BUCKERIDGE *et al.*, 1992); de *Hymenaea courbaril* (LIMA *et al.*, 1993) e de *Mucuna sloanei* (TEIXEIRA, 2005).

Fry e colaboradores (1993) sugeriram uma nomenclatura para os oligossacarídeos livres relacionados às xiloglucanas, estabelecida através das unidades dos oligossacarídeos que não são substituídas da esquerda para a direita, designadas pelas letras G (glucose), X (xilose), L (galactose), F (fucose) e S (arabinose). Quando a unidade redutora de cada oligossacarídeo está sob a forma reduzida, acrescenta-se a terminação “ol” (figura 2).

A



B

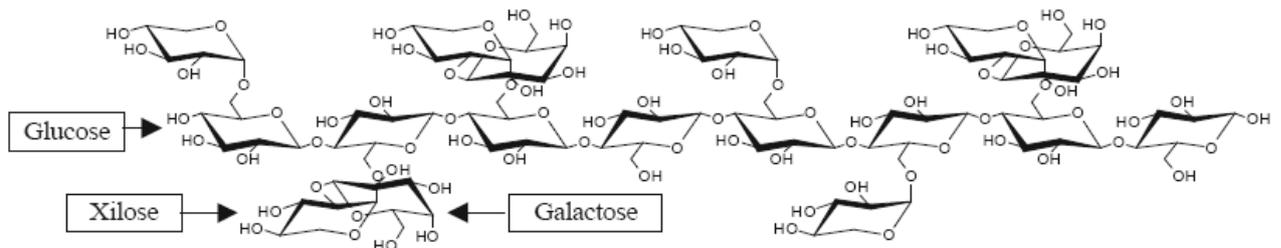


Figura 1 – Estrutura química parcial de uma xiloglucana de reserva de parede secundária (A); estrutura em cadeira (B).

ESTRUTURA	NOMENCLATURA	
	ATUAL	ANTIGA
$\begin{array}{c} \text{Glc} \rightarrow \text{Glc} \rightarrow \text{Glc} \bullet \\ \uparrow \quad \uparrow \\ \text{Xyl} \quad \text{Xyl} \end{array}$	XXG	-
$\begin{array}{c} \text{Glc} \rightarrow \text{Glc} \rightarrow \text{Glc} \rightarrow \text{Glc} \bullet \\ \uparrow \quad \uparrow \quad \uparrow \\ \text{Xyl} \quad \text{Xyl} \quad \text{Xyl} \end{array}$	XXXG	XG7
$\begin{array}{c} \text{Glc} \rightarrow \text{Glc} \rightarrow \text{Glc} \rightarrow \text{Glc} \bullet \\ \uparrow \quad \uparrow \quad \uparrow \\ \text{Xyl} \quad \text{Xyl} \quad \text{Xyl} \\ \quad \quad \quad \uparrow \\ \quad \quad \quad \text{Gal} \end{array}$	XXLG	XG8
$\begin{array}{c} \text{Glc} \rightarrow \text{Glc} \rightarrow \text{Glc} \rightarrow \text{Glc} \bullet \\ \uparrow \quad \uparrow \quad \uparrow \\ \text{Xyl} \quad \text{Xyl} \quad \text{Xyl} \\ \quad \quad \uparrow \quad \uparrow \\ \quad \quad \text{Gal} \quad \text{Gal} \end{array}$	XLLG	XG9n
$\begin{array}{c} \text{Glc} \rightarrow \text{Glc} \rightarrow \text{Glc} \rightarrow \text{Glc} \bullet \\ \uparrow \quad \uparrow \quad \uparrow \\ \text{Xyl} \quad \text{Xyl} \quad \text{Xyl} \\ \quad \quad \quad \uparrow \\ \quad \quad \quad \text{Gal} \\ \quad \quad \quad \uparrow \\ \quad \quad \quad \text{Fuc} \end{array}$	XXFG	XG9
$\begin{array}{c} \text{Glc} \rightarrow \text{Glc} \rightarrow \text{Glc} \rightarrow \text{Glc} \bullet \\ \uparrow \quad \uparrow \quad \uparrow \\ \text{Xyl} \quad \text{Xyl} \quad \text{Xyl} \\ \quad \quad \uparrow \quad \uparrow \\ \quad \quad \text{Gal} \quad \text{Gal} \\ \quad \quad \quad \uparrow \\ \quad \quad \quad \text{Fuc} \end{array}$	XLFG	-

Figura 2 - Estruturas simplificadas e nomenclatura para alguns oligossacarídeos relacionados às xiloglucanas. Nas estruturas, as setas indicam as ligações glicosídicas: \rightarrow , ligação β -(1 \rightarrow 4); \downarrow , ligação α -(1 \rightarrow 6); \uparrow , ligação (1 \rightarrow 2); \bullet , terminal redutor que pode estar sob a forma reduzida, sendo, então, acrescentado o sufixo ol. Fonte: FRY *et al.*, 1993.

Todas as xiloglucanas analisadas até o momento possuem resíduos de galactose 1,2- β -ligados a cadeias laterais particulares de resíduos xilosil, que estão 1,6- α -ligados a um esqueleto de 1,4- β -glucana. Essas unidades de galactose podem finalizar as cadeias laterais das xiloglucanas de reserva de sementes ou podem estar fucosiladas por resíduos de fucose 1,2- α -ligados no caso das xiloglucanas estruturais de paredes primárias de muitas dicotiledôneas (FAÏK *et al.*, 1997). Como os demais polissacarídeos componentes da matriz, as xiloglucanas são sintetizadas no complexo de Golgi por transglicosilação, requerendo, portanto, nucleotídeos-açúcares como doadores (GIBEAUT, 2000). Vários estudos concordam com que a formação do esqueleto de xiloglucana é resultado da ação coordenada e interdependente de glucosiltransferase (ou sintase) e xilosiltransferase (FAÏK *et al.*, 1997). A incorporação de galactose *in vivo* parece ocorrer logo em seguida ao alongamento da cadeia principal na cisterna trans-Golgi pela ação de uma β -galactosiltransferase (BRUMMELL; CAMIRAND; MACLACHLAN, 1990). A descoberta dessa enzima se deu através da caracterização do mutante *mur3* de *Arabidopsis thaliana*, feita por Madson e colaboradores (2003), que verificaram que os defeitos do mutante residiam na xiloglucana. O mutante perdia galactose no terceiro resíduo de xilose dentro do núcleo da estrutura -XXXG-, sugerindo, assim, que MUR3 poderia ser uma β -galactosiltransferase de xiloglucana.

As xiloglucanas têm sido usadas como espessantes, estabilizantes e agentes gelificantes em alimentos (GIDLEY *et al.*, 1991; GERARD; DAVIDSON, 1980).

1.3.1. Xiloglucana de *Copaifera langsdorffii* Desf.

Copaifera langsdorffii Desf., também conhecida como copaíba, bálsamo, pau d'óleo e óleo-de-copaíba, é uma árvore que atinge até 35 m de altura; distribui-se desde o Nordeste da Argentina até a Venezuela, sendo encontrada em todo o território brasileiro, principalmente nos estados de Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso do Sul e Paraná, tanto em áreas de cerrado aberto como em áreas de floresta (LORENZI, 1992; ALMEIDA *et al.*, 1998; MACHADO, 1990). As sementes maduras são exalbuminosas, tendo como reservas proteínas e óleos em abundância, armazenados nos cotilédones (CRESTANA; BELTRATI, 1988).

A xiloglucana de sementes de *Copaifera langsdorffii* é estruturalmente semelhante à de tamarindo (*T. indica*), pois sua composição é inteiramente formada por subunidades de Glc4: XXXG, XLXG, XXLG E XLLG (YORK *et al.*, 1990; BUCKERIDGE *et al.*, 1992).

Os polissacarídeos de sementes de copaíba de plantas crescidas em floresta possuem quantidade levemente maior de galactose que os de sementes de plantas do cerrado (vegetação

tipo savana). Ambos, porém, apresentaram maior número de ramificações de galactose que a xiloglucana de tamarindo. Isso indica diferença significativa na distribuição de resíduos das cadeias laterais e maior uniformidade na distribuição de unidades repetitivas (BUCKERIDGE *et al.*, 1992). A proporção Glc-Xyl-Gal obtida por Buckeridge e Dietrich (1990) foi de 4:3,0:1,8. Percebe-se que essa xiloglucana é altamente galactosilada, composta, principalmente, pelo oligossacarídeo XLLG (OLIVEIRA JÚNIOR; BRAGA; BUCKERIDGE, 2006).

Alcântara e colaboradores (1999), em estudos sobre a mobilização de xiloglucana de copaíba, concluíram que endo- β -glucanase, α -xilosidase, β -galactosidase e β -glucosidase estavam entre as enzimas responsáveis pela hidrólise *in vivo* da xiloglucana em cotilédones de *C. langsdorffii*.

1.3.2. Xiloglucana de *Hymenaea courbaril*

Hymenaea courbaril var. *stilbocarpa* é uma leguminosa nativa abundante nas florestas brasileiras do Nordeste ao Sul. Essa árvore pode atingir de 12 a 20 metros de altura, possui folhas compostas com um par de folíolos glabros e brilhantes, com tamanho variável entre 5–7,5 x 2,5-3,5cm. Os frutos são oblongos e cilíndricos (figura 3).

Kooiman (1960) foi o primeiro a sugerir a presença de xiloglucana nas sementes de *Hymenaea* com base na coloração feita com iodo/iodeto, a qual ficou restrita às paredes espessas do cotilédone. Todas as sementes dessa espécie, segundo Lima e colaboradores (1993), possuem 45% de xiloglucana (M_w 3.0×10^5 , $[\alpha]_D = +79.3$, $[\eta] = 850$ mL/g). Nessa análise, esses autores encontraram os mesmos tipos de ligações glicosídicas esperadas para uma molécula de xiloglucana “normal”. Por meio de hidrólise enzimática, foi possível observar que a xiloglucana de jatobá possui uma composição semelhante à de *Tamarindus indica* (LIMA, *et al.*, 1995). Porém, em 1997, Buckeridge e colaboradores descreveram que a xiloglucana das sementes de jatobá apresentava características estruturais únicas com base na composição de diferentes blocos oligossacarídicos. A proporção Glc-Xyl-Gal obtida foi de 4:3,4:1,2, verificando-se que a xiloglucana de jatobá possui uma proporção um pouco maior de xilose e um pouco menor de galactose em relação à xiloglucana de copaíba. A xiloglucana de jatobá tem, em sua composição, 50% de subunidades oligossacarídicas “normais” XXXG, XLXG, XXLG e XLLG, enquanto os 50% restantes são devidos a subunidades pertencentes a uma nova classe, baseada na estrutura XXXXG, e compreendendo tanto essa estrutura quanto aquelas derivadas dela por substituições β -galactosil. Essas características únicas da

xiloglucana de *H. courbaril* implicam mudanças conformacionais que, provavelmente, resultam em diferenças nas propriedades moleculares desse polímero, como a solubilidade em água, interações entre essas moléculas ou entre elas e a celulose.

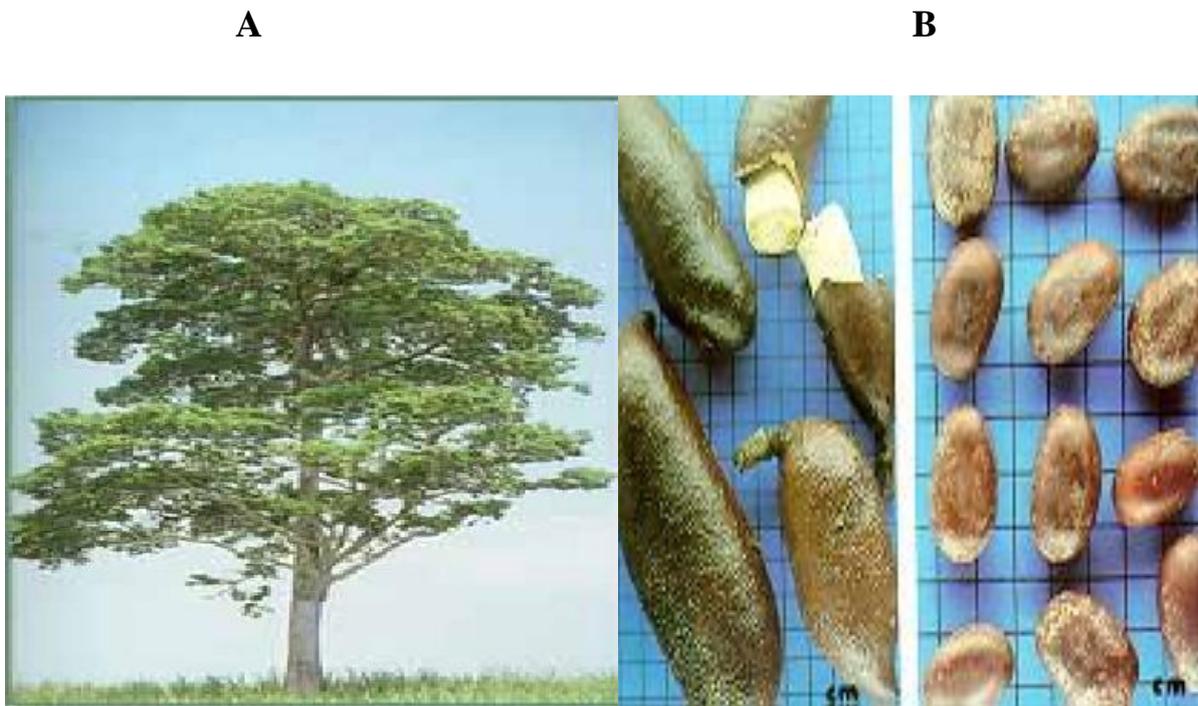


Figura 3 – Jatobá (*Hymenaea courbaril*). A: Aspecto geral da planta. B: Detalhe das vagens e das sementes. Fonte: www.plantarum.com.br

1.3.3. Xiloglucana de *Mucuna sloanei*

Mucuna sloanei Fawcett & Rendle, pertencente à família *Leguminosae* (*Fabaceae*), subfamília *Papilionoideae*, é encontrada no Nordeste do Brasil, sudeste dos Estados Unidos, nas Ilhas do Havaí, na Nigéria e alguns países da África (AJIWE; OKEKE; NNABUIKE, 1997). Essa espécie é uma erva trepadeira que produz muitos frutos por planta, possuindo cada fruto de 1 a 8 sementes (OKIGBO, 1978) (figura 4).

Teixeira (2005) observou que a principal hemicelulose presente na semente de *Mucuna sloanei* é a fração extraída com água, chegando a representar 30% do cotilédone, o que representa 22% do peso seco da semente, mas esse valor ainda é baixo quando comparado com a xiloglucana de semente de *Hymenaea courbaril* (jatobá). As análises feitas com o polissacarídeo derivado da extração aquosa evidenciaram a presença de uma xiloglucana de

reserva com uma estrutura básica semelhante à encontrada para xiloglucanas de reserva. Essa xiloglucana apresentou uma razão molar Glc-Xyl-Gal de 1,8:1,7:1,0 e massa molar de $1,6 \times 10^6$ g/mol. A análise dos oligossacarídeos após hidrólise enzimática mostrou a proporção de 8,98% de XXXG, 1,92% de XLXG, 27,96% de XXLG e 61,14% de XLLG. Essa proporção é semelhante à encontrada para xiloglucanas de sementes de *Copaifera langsdorffii* e *Tamarindus indica*, no entanto, com uma percentagem de XLXG mais baixa do que a anteriormente encontrada para xiloglucana de *Copaifera langsdorffii* e uma percentagem bem mais alta de XLLG (tabela 2).



Figura 4 – *Mucuna sloanei*. A: Detalhe das vagens verdes e folhas. B: Vagens contendo sementes. C: Sementes quiescentes inteiras, trituradas e farinha das sementes. Fonte: TEIXEIRA, 2005

Tabela 2: Proporção de oligossacarídeos derivados da digestão completa em xiloglucanas de diferentes espécies. *Fonte: LIMA, 2004, modificado por TEIXEIRA, 2005.

Oligossacarídeos	Fonte de xiloglucana		
	<i>M. sloanei</i>	<i>T. indica</i> *	<i>C.langsdorffi</i> *
XXXG	1,00	1,00	1,00
XLXG	0,21	0,30	0,80
XXLG	3,00	1,50	2,00
XLLG	6,81	1,30	4,00

1.4. Galactomananas

Galactomananas são polissacarídeos derivados do endosperma de sementes, que consistem em cadeias poliméricas de resíduos β -D-manopiranosil (1 \rightarrow 4) ligados, substituídos em O-6 por unidades de α -D-galactopiranosil (DEA; MORRISON, 1975) (figura 5). Esses polissacarídeos são característicos de sementes da família Leguminosae, que possuem endosperma e são classificados como gomas originárias de sementes (PANEGASSI; SERRA; BUCKERIDGE, 2000). Por terem como principal função a de reserva, durante o processo de germinação, as galactomananas são degradadas enzimaticamente e usadas como nutriente (DAAS; SCHOLS; JONGH, 2000).

Na natureza, o grau de ramificação das galactomananas varia de polímeros em que quase todas as unidades de manose apresentam ramificações com galactose a polímeros em que nenhuma galactose é detectada (BUCKERIDGE *et al.*, 2004). A razão manose/galactose e a distribuição estatística dos resíduos galactosil pelo esqueleto de manana variam de espécie para espécie (BAILEY, 1971) e podem variar numa mesma goma de acordo com o tipo de extração e análise do polímero (PANEGASSI *et al.*, 2000). O grau de ramificação por galactose em galactomananas provavelmente afeta a solubilidade desses polissacarídeos em água. Quanto menos ramificações existirem, mais insolúveis se tornam as moléculas de galactomananas, enquanto aquelas que possuem menos que 10% de galactose em sua composição irão precipitar (BUCKERIDGE; REID, 1994). Na família Leguminosae, não são encontradas mananas puras (pouco ramificadas) e o grau de ramificação é de, no mínimo, uma unidade de galactose a cada quatro unidades de manose (BUCKERIDGE *et al.*, 2004).

A molécula de galactomanana é montada pela ação de duas glicosiltransferases ligadas à membrana: uma sintase de manana GDP-manose-dependente, que catalisa sucessivas transferências de resíduos de manose da GDP-manose para um acceptor endógeno, alongando o esqueleto de manana; e uma galactomanana-galactosiltransferase, que catalisa a transferência de resíduos α -galactose da UDP-galactose para formar as cadeias galactosil laterais. Os resíduos de galactomanana podem ser transferidos somente para um resíduo acceptor de manose próximo ou na própria extremidade não-redutora da cadeia principal crescente (EDWARDS *et al.*, 1989). A biossíntese de galactomananas requer uma interação funcional específica entre a sintase de manana e a galactomanana-galactosiltransferase, sendo esta última bastante importante, pois determina a razão manose/galactose e a distribuição estatística dos resíduos galactosil ao longo do esqueleto de manana (EDWARDS *et al.*, 2002).

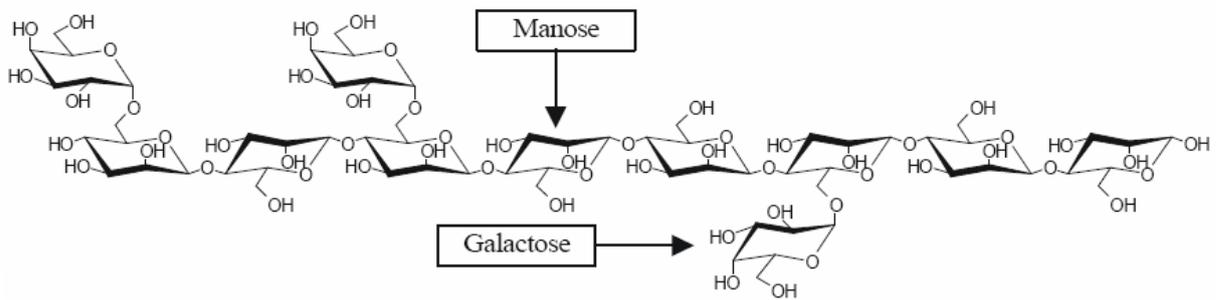


Figura 5 – Estrutura química parcial de uma galactomanana presente em endosperma de sementes.

As galactomananas são consideradas importantes aditivos alimentares devido às suas propriedades, como a capacidade de se ligar à água, o alto poder espessante, a estabilidade das soluções e a capacidade de interagir com outros polímeros para formar gel (NEUKOM, 1989). Por serem não-digeríveis, esses polissacarídeos são considerados fibras dietéticas nos alimentos (DEA; MORRISON, 1975). Das galactomananas conhecidas, guar (*Cyamopsis tetragonolobus* L.), tara (*Caesalpineia spinosa*) e caroba ou locusta (*Ceratonia siliqua*) são as gomas que predominam em escala industrial em produtos alimentícios (DANIEL *et al.*, 1994). As galactomananas também são bastante utilizadas nas indústrias de cosméticos, produtos de papel, tintas e explosivos (BAVEJA *et al.*, 1991).

1.4.1. Galactomanana de *Mimosa scabrella* Benth.

Mimosa scabrella, conhecida popularmente por bracinga, é uma leguminosa arbórea da família Mimosaceae, nativa e abundante no Paraná, Sudeste brasileiro (GANTER *et al.*, 1997). As sementes dessa planta são ricas em galactomanana, polissacarídeo que representa até 30% do peso seco da semente. A galactomanana de *M. scabrella* tem uma razão de manose/galactose de 1,1:1,0; $[\alpha]_{25}^D + 76.9$ e viscosidade intrínseca $[\eta] = 900$ mL/g (YORK *et al.*, 1990). A toxicidade oral dessa galactomanana foi testada por Ganter e colaboradores (1997) e a DL_{50} em ratos foi determinada (> 6000 mg/kg).

A goma de sementes de *M. scabrella* tem potencial aplicação em indústrias de alimentos e cosméticos na região metropolitana de Curitiba, como substituínte da goma de guar (SUGUI, 1994).

Essa galactomanana tem sido bastante utilizada para fins de pesquisa. Perissutti e colaboradores (2002) estudaram a interação entre a galactomanana de *M. scabrella* e as proteínas do leite. Alguns trabalhos relatam a elaboração de tabletes cuja matriz é composta por xantana e galactomanana de *M. scabrella* para a liberação controlada de drogas, como teofilina e diclofenaco sódico (VENDRUSCOLO *et al.*, 2005; UGHINI *et al.*, 2004).

1.4.2. Galactomanana de *Dimorphandra mollis* Benth.

Dimorphandra mollis é uma espécie nativa brasileira pertencente à família Caesalpiniaceae e popularmente conhecida por faveira, barbatimão-de-folha-miúda, barbatimão-falso, canafístula, faveiro ou fava d'anta. Esse vegetal possui porte arbóreo, podendo atingir de 8 a 14 m de altura (LORENZI, 1992; FÉRES *et al.*, 2006)). Seu fruto e casca são explorados comercialmente para extração de rutina, um composto do tipo flavonóide de importante aplicação farmacológica. Assim, *D. mollis* é uma espécie importante dos cerrados e caatingas brasileiras (TOMASSINI; MORS, 1966).

As sementes de *D. mollis* apresentam um alto teor de galactomanano, sendo 42% o rendimento do polissacarídeo, expresso em percentual do peso seco da semente (PANEGASSI *et al.*, 2000; BUCKERIDGE; DIETRICH, 1990). A razão manose/galactose obtida por Panegassi e colaboradores (2000) para o polissacarídeo foi de 2,7:1.

1.4.3. Galactomanana de *Stryphnodendron barbatiman*

Stryphnodendron barbatiman é uma planta conhecida popularmente por barba-de-timam, barbatimão, charãozinho-roxo, abaramotemo, ibatimô, uabatimó, casca do Brasil e casca-da-virgindade ou casca-da-mocidade. Essa espécie pertence à classe Magnoliatae, subclasse Rosidae, ordem Rosales, família Leguminosae (CAMARGO, 1985) e está distribuída nas regiões do cerrado brasileiro, do Pará até São Paulo, passando por Mato Grosso do Sul e Minas Gerais (CORREIA, 1984).

O barbatimão tem uso popular terapêutico bastante amplo, sendo empregado como cicatrizante, antiinflamatório, hemostático, anti-séptico, antidiarréico, no tratamento de úlceras, hemorragias vaginais e gonorréia. Os princípios ativos desse vegetal são: matéria corante vermelha, renina, mucilagem e substâncias tânicas (CAMARGO, 1985). O efeito tóxico das sementes de *S. barbatiman* foi relatado por Guerra (1980), visto que a

administração dessas sementes em ratas prenhes desde o primeiro ao oitavo dia de gestação causava efeito abortivo.

Ganter e colaboradores (1995) obtiveram o percentual de 25% de galactomanana de *S. barbatiman* em relação ao peso seco da semente. A razão manose/galactose nessa galactomanana é de 1,5:1 (GANTER *et al.*, 1993).

1.4.4. Galactomanana de *Adenantha pavonina*

A espécie arbórea *Adenantha pavonina* L., pertencente à família *Fabaceae* e subfamília *Mimosoideae*, é nativa da Ásia tropical, sendo popularmente conhecida como olho-de-dragão (FONSECA; PEREZ, 2003). Essa árvore (figura 6) é importante fonte fornecedora de madeira de boa qualidade para construções, e o cozimento de sementes e madeira dessa planta é utilizado no tratamento de infecções pulmonares, podendo o produto também ser aplicado externamente no tratamento de oftalmia crônica (BABURAJ; GUNASEKARAN, 1993).

Popularmente chamada carolina, essa planta apresenta-se no Nordeste do Brasil como uma árvore inerme e glabra, podendo alcançar até 15 m de altura. É comumente empregada na arborização de parques e jardins. As folhas são pecioladas e paripinadas; as flores, amarelópálidas ou raramente brancas, dispostas na forma de espigas. As vagens são compridas, estreitas, curvado-falconadas, com valvas que se enroscam na maturação, lançando as sementes a curta distância (BAILEY, 1954; BRAGA, 1976).

Segundo Tavares (1998), as sementes apresentam tegumento vermelho brilhante e endosperma gomoso e espesso. O endosperma representa 15% das sementes de *A. pavonina* e está fortemente aderido ao tegumento. O elevado grau de pureza da galactomanana obtida a partir desses endospermas é um fator favorável ao seu uso em nível de produção. A razão manose/galactose varia de 1,8:1 e 2,4:1 com um valor médio de $(2,1 \pm 0,3):1$. O rendimento total de galactomanana extraída em relação ao endosperma é de 79,9%, o que corresponde a 12% do peso seco das sementes.

A goma de *A. pavonina* foi utilizada para o isolamento e purificação da lectina galactose-ligante de *Artocarpus incisa* (MOREIRA *et al.*, 1998).

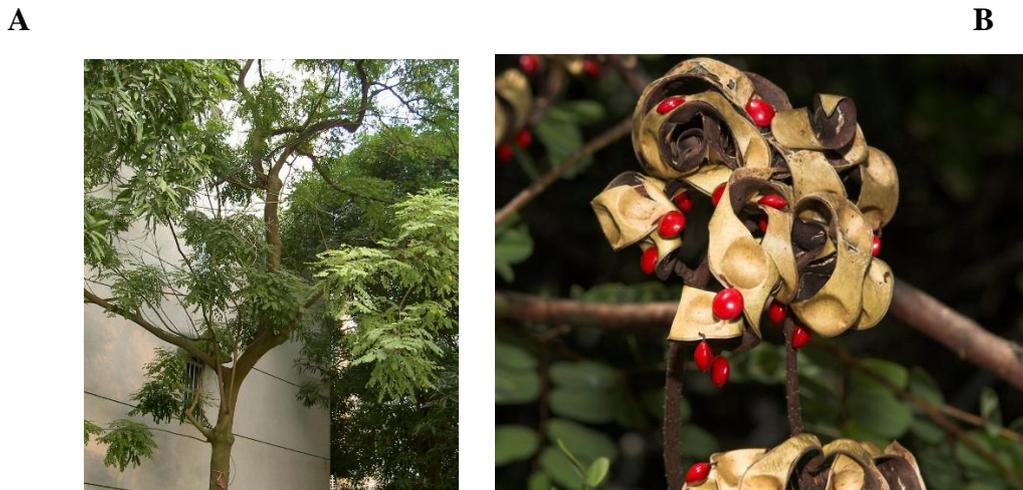


Figura 6 – *Adenanthera pavonina*. A – Árvore; B – Fruto e sementes.

1.5. Lectinas Vegetais

Na natureza, a ocorrência de proteínas com atividade hemaglutinante é conhecida desde o final do século XIX, porém, somente nos últimos anos, foi descoberta a especificidade por açúcar que essas proteínas possuem, sendo, assim, denominadas lectinas (do latim *legere*) (SHARON, 2007). De forma geral, lectinas de plantas constituem um grupo heterogêneo de proteínas classificadas com base na sua habilidade de ligar-se, de modo reversível, a açúcares simples e/ou carboidratos complexos (VAN DAMMEE *et al.*, 1998). Segundo Peumans e Van Damme (1995), a presença de pelo menos um domínio não-catalítico capaz de ligar carboidratos (mono- ou oligossacarídeos) de forma reversível é o único pré-requisito para uma proteína ser classificada como lectina.

A história científica das lectinas teve início em 1888, ano da publicação da tese de doutorado de Stillmark, intitulada “Über Ricin ein giftiges ferment aus den samen von *Ricinus communis* L. und einigen anderen Euphorbiaceen”. Stillmark descobriu que o extrato de sementes de mamona (*Ricinus communis*) causava a aglutinação de eritrócitos e mostrou que a fração ativa desse extrato era uma proteína que nomeou por ricina. O autor também observou que a fração protéica era capaz de aglutinar células epiteliais, células de fígado, leucócitos e relatou que essa fração reagia, de maneira distinta, com diferentes tipos de hemácias (STILLMARK, 1988). A descoberta da ricina foi um marco na bioquímica de plantas porque foi a primeira proteína vegetal a ter sua atividade biológica bem definida

(VAN DAMME *et al.*, 2001). Subseqüentemente, H. Hellin demonstrou a presença de uma hemaglutinina tóxica nos extratos de sementes de jequiriti (*Abrus precatorius*), que ficou conhecida por abrina (SHARON; LIS, 2004).

As lectinas estão amplamente distribuídas na natureza e já foram descritas em sementes, bactérias, vírus, vertebrados, cogumelos e venenos de serpentes (KILPATRICK, 2002; SHARON, 1993). Apesar de existir esse grupo de proteínas em todas as formas de vida, as lectinas mais amplamente estudadas são aquelas extraídas de plantas (JEYAPRAKASH *et al.*, 2003).

Entretanto, somente um número limitado de plantas superiores contém lectinas em níveis detectáveis. Dentre as plantas, as famílias que possuem o maior número de lectinas já isoladas são *Leguminosae* e *Solanaceae* (LIS; SHARON, 1998).

Grande parte das lectinas possui dois ou mais sítios de combinação, isto é, são di- ou polivalentes; por isso, quando estão em contato com células, como os eritrócitos, essas proteínas irão, não-somente ligar-se aos açúcares da superfície celular pelos quais têm afinidade, como também formar ligações cruzadas com as células e causar a precipitação das mesmas. A aglutinação de eritrócitos ou hemaglutinação causada por lectinas é o principal atributo dessas proteínas e é usada corriqueiramente para a sua detecção em extratos vegetais. Essa atividade pode ser facilmente inibida pelo açúcar ligante pelo qual a lectina possui especificidade (LIS; SHARON, 1998).

As lectinas representam um grupo heterogêneo de proteínas oligoméricas que variam quanto ao tamanho, estrutura, organização molecular e constituição do sítio de combinação (LIS; SHARON, 1998). De acordo com Peumans e Van Damme (1995), tendo por base a estrutura das lectinas antes das modificações pós-traducionais e após a maturação, essas proteínas podem ser classificadas em (figura 7):

Merolectinas: São proteínas pequenas, constituídas exclusivamente por um domínio simples de ligação a carboidratos. Devido a essa natureza monovalente, são incapazes de precipitar glicoconjugados ou aglutinar células. Pertencem a esse grupo a heveína, presente no látex de *Hevea brasiliensis*, e proteínas monoméricas de orquídeas ligantes de manose.

Hololectinas: Possuem dois ou mais domínios idênticos e homólogos de ligação a carboidratos. Assim, são capazes de aglutinar células e/ou precipitar glicoconjugados. A maioria das lectinas vegetais pertence ao subgrupo das hololectinas.

Quimerolectinas: Proteínas que possuem pelo menos dois domínios fundidos: um de ligação a carboidrato e um outro domínio não-relacionado, com atividade catalítica ou outra função biológica bem definida, que age de forma independente do domínio ligante de carboidrato.

Um bom exemplo de lectina pertencente a esse grupo é a ricina (RIP tipo II de *Ricinus communis*).

Posteriormente, Van Damme e colaboradores (1998) sugeriram um outro grupo de lectinas, as **superlectinas**, proteínas que possuem, no mínimo, dois sítios de ligação distintos com afinidade por carboidratos não relacionados. A lectina de tulipa pertence a esse grupo e possui um domínio de ligação a manose e um segundo domínio específico para N-acetilgalactosamina.

Mais recentemente, Monteiro-Moreira (2002) sugeriu um novo grupo, as **multilectinas**, que são proteínas com sítios idênticos de ligação a distintos carboidratos.

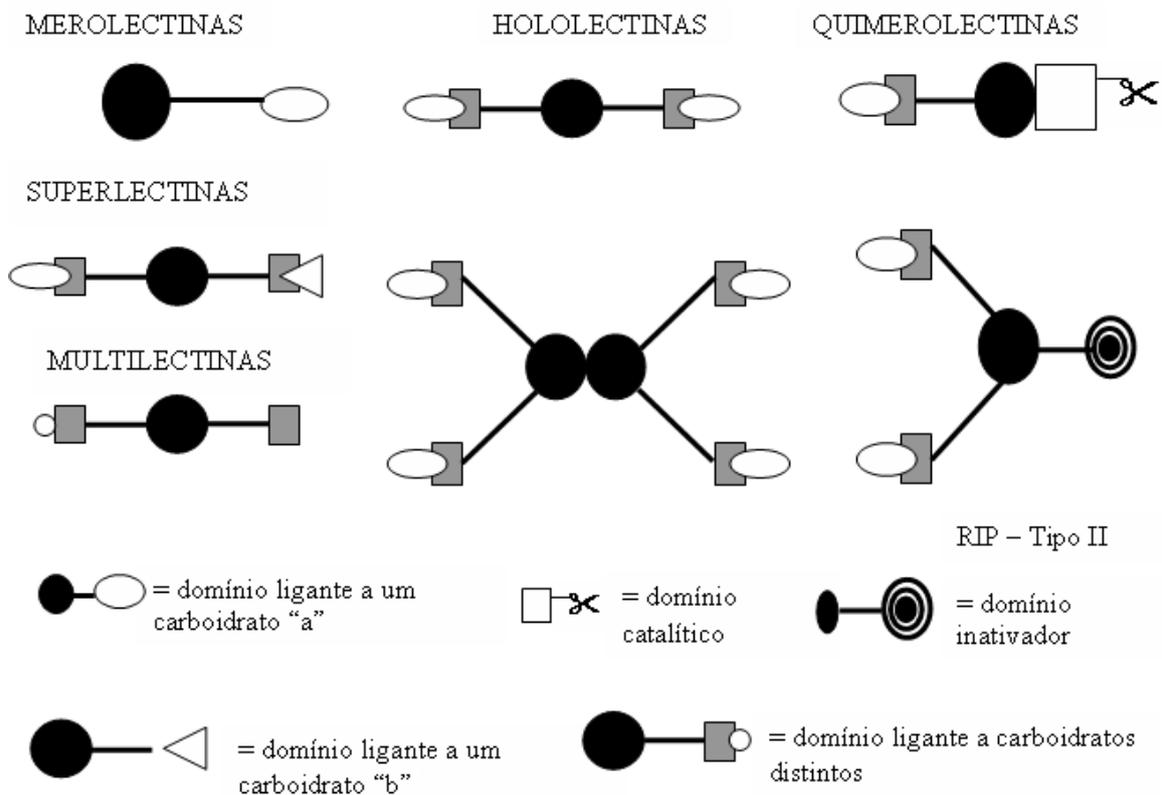


Figura 7 - Representação esquemática dos diferentes tipos de lectinas vegetais: merolectinas, hololectinas, quimerolectinas, multilectinas e superlectinas. Fonte: PEUMANS & VAN DAMME, 1995 modificado por TEIXEIRA, 2005.

1.5.1. Especificidade por Açúcar

Interações proteína-carboidrato são a base de numerosos processos biológicos, tanto normais, quanto patológicos (SHARON; LIS, 2003). As infecções causadas por vírus, bactérias, micoplasma e parasitas; a interação entre células e componentes solúveis; a fertilização; o processo de metástase (câncer) e o crescimento e diferenciação celular são exemplos de alguns desses processos (LORIS *et al.*, 1998). Dessa forma, as lectinas de plantas têm sido um sistema-modelo para o estudo do reconhecimento proteína-carboidrato, porque, individualmente, elas exibem elevada sensibilidade e, em grupo, ampla diversidade no reconhecimento de estruturas de açúcares (RAVAL *et al.*, 2004).

Lectinas vegetais ligantes de manose ou galactose são de interesse especial devido à capacidade que elas possuem de interagirem com diferentes moléculas endógenas envolvidas nas respostas inata e imune específica. Algumas lectinas de plantas podem mimetizar lectinas endógenas de mamíferos, induzindo à migração de neutrófilos e células mononucleares *in vivo* e *in vitro* (ALENCAR *et al.*, 2003; LAVASTRE *et al.*, 2004).

O reconhecimento e modificação de carboidratos também têm grande importância para a mediação do enovelamento e secreção de glicoproteínas. Esses processos envolvem proteínas residentes no retículo endoplasmático, como a calnexina e a calreticulina, que possuem domínios lectínicos cruciais para suas funções como chaperonas (SCHRAG *et al.*, 2003).

O fato de reconhecer e se ligar a carboidratos faz das lectinas de plantas proteínas possivelmente envolvidas no mecanismo de defesa vegetal. Provavelmente, essas lectinas desempenham papéis que vão além das funções de reserva de nitrogênio e fatores de reconhecimento específico, interagindo com glicoconjugados de outros organismos. O papel fisiológico desempenhado pelas lectinas está intimamente ligado aos receptores naturais para essas proteínas. Os receptores podem ser definidos como glicoconjugados que possuem uma porção glicídica com estrutura complementar àquela do sítio de ligação da lectina. Isso implica que glicoconjugados de diferentes naturezas (glicoproteínas, glicolipídeos e polissacarídeos), mas contendo a porção glicídica idêntica, ou estruturalmente semelhante, podem atuar como receptores para a mesma lectina (PEUMANS; VAN DAMME, 1995). Com exceção de algumas enzimas, como quitinases, glucanases e glicosidases, as lectinas são as únicas proteínas de plantas capazes de reconhecerem e se ligarem a glicoconjugados presentes na superfície de microrganismos (bactérias e fungos) ou expostos ao longo do trato intestinal de insetos e mamíferos herbívoros (PEUMANS; VAN DAMME, 1995).

Muitos monossacarídeos ocorrem na natureza como parte de grandes moléculas, como oligossacarídeos simples ou complexos, ou os polissacarídeos. A D-galactose é constituinte de vários oligossacarídeos: lactose, melibiose e rafinose. Polissacarídeos que liberam D-galactose na hidrólise incluem gomas e mucilagens (SZNAIDMAN, 1999).

A especificidade das lectinas pode ser definida em função dos monossacarídeos que inibem as reações de aglutinação/precipitação induzidas pela lectina (BOI *et al.*, 2006). Os componentes monossacarídicos podem ser classificados em dois grupos, com base no padrão de reconhecimento das lectinas, função e história evolucionária, porém, como é possível observar na figura 8, todos os açúcares, em ambos os grupos, na forma piranosídica, mostram um arranjo em comum da hidroxila do C-3, do oxigênio do anel e dos carbonos das posições 5 e 6 do anel. Um dos grupos é constituído por glucose, manose e N-acetilglucosamina (GlcNAc), que possuem o mesmo arranjo de grupos hidroxila equatoriais nas posições C-3 e C-4, enquanto o segundo grupo, constituído por galactose e N-acetilgalactosamina (GalNAc), é caracterizado pela presença de um grupo hidroxila axial na posição C-4. Dessa forma, os dois grupos podem ser distinguidos pela orientação do grupo hidroxila do C-4. Dentro de cada grupo, a orientação e substituição na posição 2 do anel varia (DRICKAMER, 1997).

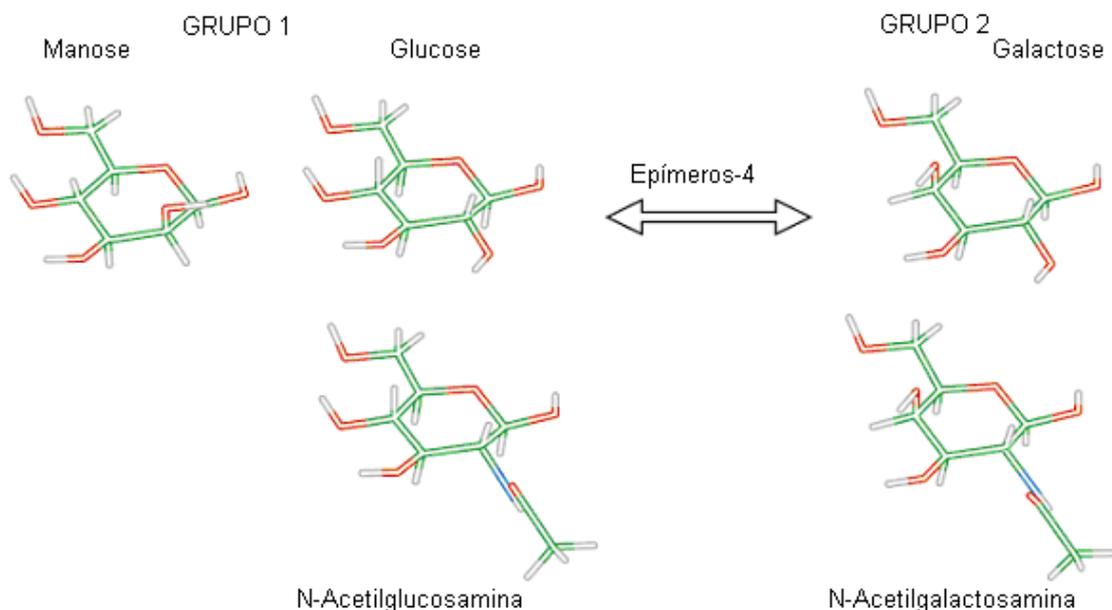


Figura 8 – Componentes monossacarídicos. Átomos são mostrados nas cores padrão.
Fonte: DRICKAMER, 1997 com modificações.

Então, as lectinas podem ser classificadas em cinco grupos, de acordo com os monossacarídeos pelos quais exibem maior afinidade: manose, galactose/N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina, fucose e ácido N-acetilneurâmico. Particularmente, lectinas específicas por galactose não reagem com glucose (seu epímero-4) ou manose (epímero-2 da glucose), nem aquelas lectinas específicas por manose ligam galactose (LIS; SHARON, 1998).

Além disso, quando o anel piranosídico é formado, dois isômeros configuracionais podem ser obtidos devido ao surgimento do centro anomérico em C-1 (SZNAIDMAN, 1999). O grupo hidroxila no carbono anomérico pode, então, assumir as posições α ou β (CARPITA; MCCANN, 2000). Certas lectinas, que possuem a mesma especificidade, combinam-se preferencialmente, ou, em alguns casos, exclusivamente, com um dos anômeros α ou β do monossacarídeo, enquanto outras perderam essa especificidade anomérica (LIS; SHARON, 1998). Algumas lectinas, portanto, reconhecem seqüências específicas de sacarídeos não somente pela ligação glicosídica inter-residual, mas também pela configuração anomérica desses açúcares (DE-SIMONE *et al.*, 2006).

1.5.2. Isolamento por cromatografia de afinidade

A cromatografia de afinidade é uma técnica cujo conceito foi introduzido por Cuatrecasas e colaboradores (1961). Atualmente, é uma ferramenta poderosa para a purificação de moléculas biologicamente ativas e é empregada em todos os campos da biologia, química, biologia molecular e biotecnologia (WILCHEK; MIRON, 1999).

De acordo com a União Internacional de Química Pura e Aplicada, a cromatografia de afinidade é definida como uma técnica cromatográfica líquida que faz uso de interações biológicas para a separação e análise de analitos específicos dentro de uma amostra, ou seja, essa técnica é baseada no reconhecimento molecular; tem por base o princípio simples de que todas as biomoléculas normalmente reconhecem outra molécula natural ou artificial, denominadas ligante ou alvo. Assim, se um dos ligantes é imobilizado em um carreador polimérico, pode ser usado para capturar seletivamente sua contraparte, simplesmente passando o extrato celular através da coluna sob condições favoráveis para que a ligação ocorra. O alvo retido pode ser eluído por mudanças das condições externas, como força iônica, pH, solvente e temperatura. Dessa forma, o complexo ligante-alvo se dissocia, e a molécula desejada será eluída em uma forma pura (WILCHEK; MIRON, 1999).

O ligante imobilizado é o fator-chave que determina o sucesso de um método cromatográfico. Como implica a própria definição apresentada anteriormente, a maioria dos ligantes é de origem biológica, embora, ao longo do tempo, colunas contendo ligantes seletivos de origem não-biológica tenham sido empregadas. Exemplos são boronatos, complexos de íons metálicos imobilizados e corantes sintéticos. Termos como “cromatografia de bioafinidade” e “adsorção bioespecífica” são usados ocasionalmente para especificar quando o ligante é realmente um composto biológico (HAGE, 1999).

Em colunas de cromatografia de afinidade, o suporte é usualmente um gel não-rígido de partículas de grande diâmetro (50 a 400 μm), como agarose, dextrana ou celulose. (HAGE, 1999). Conseqüentemente, um grande número de macro-partículas são materiais-suporte para a separação cromatográfica de afinidade e são comercialmente úteis. O suporte mais popular é a agarose. A literatura mostra que a agarose é usada, em 90% das vezes, como uma matriz de fase sólida para cromatografia de afinidade (WILCHEK; MIRON, 1999).

Nas últimas décadas, a cromatografia de afinidade foi empregada freqüentemente para o isolamento e/ou purificação de lectinas, na qual a matriz contém o açúcar ligante. Se necessário, a lectina obtida por esse método pode ser submetida a uma segunda cromatografia de afinidade ou purificação adicional por técnicas clássicas, como filtração em gel, troca iônica e interação hidrofóbica (MONTEIRO-MOREIRA, 2002).

Agrawal e Goldstein (1965) relataram o isolamento da Concanavalina A em Sephadex G-50. Essa lectina, glucose/manose ligante, foi isolada por cromatografia de afinidade em matriz comercial preparada a partir de uma glucana produzida por *Leuconostoc mesenteroides*, formada por unidades 1 \rightarrow 6 ligadas de α -D-glucose.

A busca de ligantes mais seletivos, robustos e/ou reproduzíveis tem sido uma constante (HAGE, 1999). A exploração da afinidade inerente a polissacarídeos por numerosas enzimas/proteínas e o uso desses açúcares em técnicas cromatográficas têm sido reportados (ROY; SARDAR; GUPTA, 2000; MOREIRA *et al.*, 1998; ROY; SARDAR; GUPTA, 2005; SORCI *et al.*, 2006). Esses materiais têm as vantagens de serem economicamente viáveis, de fácil uso e atóxicos; logo, o protocolo de separação é compatível com a aplicação da enzima/proteína alvo (ROY; SARDAR; GUPTA, 2005).

1.5.3. Sítios carboidrato-ligantes e interações lectina-carboidrato

Elgavish e Shaanan (1997) propuseram a classificação das proteínas ligantes de carboidratos de acordo com suas características topológicas no sítio de combinação. Dessa forma, essas proteínas seriam divididas em dois grupos principais: proteínas do grupo I como as proteínas de transporte periplásmico bacteriano e enzimas, que possuem um sítio de ligação enterrado e engolfa totalmente o ligante sobre o sítio, e proteínas do grupo II, que diferem das primeiras por possuírem um sítio raso, superficial, a maioria na forma de uma depressão na superfície protéica. Nesse segundo grupo, encontram-se as três clássicas famílias de lectinas (lectinas de legumes, lectinas tipo-C e galectinas), além de outras lectinas de plantas, proteínas virais, toxinas, anticorpos anticarboidrato e pentraxinas.

Estudos têm mostrado que, assim como as lectinas, os sítios de ligação de tais moléculas também são diversos, mesmo quando a especificidade é a mesma. Porém, dentro de uma mesma família de lectinas, os sítios podem ser semelhantes (SHARON, 1993; SHARON; LIS, 2003).

Complexos lectina-carboidrato são efêmeros, isto é, ambas as partes do complexo podem existir como entidades separadas. A ligação entre lectinas e carboidratos é caracterizada por baixas mudanças enérgicas, com constantes de dissociação que raramente excedem a gama de millimolar. Indubitavelmente, uma boa complementaridade de superfície é um dos requisitos para alcançar um empacotamento à interface de duas moléculas que estão interagindo (GARCÍA-HERNÁNDEZ; HERNÁNDEZ-ARANA, 1999). Os carboidratos interagem com lectinas primariamente através de pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas, mas, em alguns casos, podem ocorrer coordenação metálica e interações eletrostáticas (LIS; SHARON, 1998).

As pontes de hidrogênio estão extremamente envolvidas nas interações proteína-carboidrato, conferindo especificidade e contribuindo para a afinidade da lectina pelo açúcar. A disponibilidade de um grande número de grupos hidroxila nos açúcares capacita-os a participarem de redes complexas de pontes de hidrogênio, formadas usualmente por pontes de hidrogênio cooperativas, nas quais a hidroxila atua simultaneamente como doador eceptor de elétrons (SHARON; LIS, 2003). Tendo por base as estruturas dos monossacarídeos na forma piranosídica, as hidroxilas dos carbonos 4 e 6 são os grupos que formam, mais extensivamente, pontes de hidrogênio, embora a hidroxila em C-3 também esteja engajada em uma ponte de hidrogênio com um grupamento amida do esqueleto da lectina. Pontes de hidrogênio, normalmente, não envolvem a hidroxila em C-2, pois ela se posiciona fora da

superfície protéica. Na estrutura da galactose, os grupamentos hidroxilas das posições 3 e 4 estão envolvidos em uma série de pontes de hidrogênio (DRICKAMER, 1997).

Segundo Sharon e Lis (2003), as cadeias laterais dos aminoácidos da proteína participam das pontes de hidrogênio envolvendo, com maior frequência, os resíduos de aspartato e asparagina, além de glutamato, glutamina, arginina e serina. Hidrogênio e oxigênio dos grupos NH e CO da cadeia principal também contribuem para a formação de pontes, porém em uma menor extensão. Pontes de hidrogênio entre proteína e carboidrato podem ocorrer mediadas ou não por moléculas de água.

Apesar do caráter hidrofílico dos carboidratos, a disposição estérica dos grupos hidroxila cria regiões hidrofóbicas na superfície da molécula, que interagem com cadeias laterais hidrofóbicas da proteína. Assim, interações hidrofóbicas desempenham o principal papel de reconhecimento das moléculas de açúcar pelas lectinas (WEIS; DRICKAMER, 1996). Um exemplo desse tipo de interação é o empilhamento de um monossacarídeo na cadeia lateral do aminoácido aromático do sítio de ligação. Podemos destacar, principalmente, a interação entre resíduos aromáticos do sítio das lectinas galactose-ligantes e a molécula de galactose. Um resíduo de aminoácido aromático, geralmente Trp, mas em poucos casos, Tyr e Phe, possivelmente, é o componente-chave do sítio de ligação de diversas proteínas ligantes de carboidrato. Esse resíduo de aminoácido, provavelmente, assegura a orientação adequada do açúcar no sítio de ligação, pois orienta os átomos de hidrogênio apolares desse sacarídeo em direção ao anel aromático e mantém os átomos de oxigênio afastados desse anel. Os átomos de hidrogênio C3-H, C4-H, C5-H e C6-H da galactose interagem com o resíduo aromático em numerosas posições-orientações. Esses átomos de hidrogênio fazem interações com diferentes regiões do resíduo aromático nos diferentes complexos que podem ser formados (SUJATHA; SASIDHAR; BALAJI, 2004).

Sujatha e Balaji (2004) propuseram que a galactose tem a liberdade de se mover ao longo do plano do resíduo aromático para estabelecer interações ótimas com o sítio de ligação das proteínas galactose-ligantes. Após atingir a distância apropriada e a orientação favorável para a galactose em relação ao aminoácido aromático, esse sacarídeo estará posicionado de forma a otimizar também as interações com os demais resíduos do sítio de ligação.

Cátions divalentes, como Ca^{2+} e Mn^{2+} , estão envolvidos no reconhecimento do carboidrato no caso das lectinas de leguminosas modelando, indiretamente, o sítio de ligação (WEIS; DRICKAMER, 1996).

Como a lectina e o seu ligante, normalmente, estão em solução aquosa, é comum que a água atue como “argamassa” entre essas duas moléculas devido ao seu pequeno tamanho e

habilidade em formar pontes de hidrogênio. Tais pontes, denominadas pontes de água, podem envolver uma molécula de água ou cadeias de várias moléculas, mas, normalmente, envolvem a camada de solvatação do açúcar polihidroxilado e a camada de solvatação do sítio de ligação da lectina (SHARON; LIS, 2003).

É comum que as lectinas apresentem baixa afinidade por monossacarídeos e possuam uma afinidade maior por carboidratos ramificados. Acredita-se que a seletividade por um determinado ligante é aumentada várias ordens de magnitude por meio de ligantes múltiplos (mecanismos de ligação adicional em subsítios) e multivalência de subunidade (RINI, 1995; WEIS; DRICKAMER, 1996). Normalmente, um monossacarídeo terminal está ligado ao sítio de ligação primário com monossacarídeos adicionais ao longo da cadeia do açúcar, ligados ao subsítio secundário da lectina. Multivalência de subunidade, por outro lado, ocorre quando várias subunidades da mesma lectina se ligam a diferentes extensões de um carboidrato ramificado (ELGAVISH; SHAANAN, 1997). García-Hernández e colaboradores (2000), estudando a métrica da estereoquímica de 32 estruturas de complexos lectina-carboidrato de oito famílias de lectinas diferentes, elucidadas por raios-X, identificaram que as interações nos subsítios primários são mais eficientes que nos outros subsítios. Os subsítios primários constituem, geralmente, regiões com a hidropatia apropriada para interagir com a superfície do carboidrato, altamente polar.

Segundo Elgavish e Shaanan (1997), enquanto a seletividade definitiva das lectinas se deve, provavelmente, aos mecanismos de multivalência, o fator principal discriminatório no reconhecimento de carboidratos é a especificidade primária por monossacarídeos, que é também indicativo do carboidrato ramificado que está sendo reconhecido. Dessa forma, lectinas de leguminosas galactose-específicas requerem a presença de galactose, ou seus derivados amino-acetilados para se ligarem. A estereoquímica das pontes de hidrogênio formadas e a disposição preferencial dos resíduos aromáticos desempenham um papel-chave na elicitação da especificidade primária.

1.5.4. Propriedades Estruturais das lectinas de plantas

Como outras proteínas ligantes de carboidrato (enzimas, anticorpos anti-carboidrato, transportadores de açúcar...), as lectinas são estruturalmente diversas, diferindo quanto ao tamanho, estruturas terciária e quaternária, assim como quanto à estrutura do sítio de ligação (SHARON, 1993).

As lectinas vegetais podem ser divididas em classes com base no arranjo estrutural das suas subunidades, destacando-se os grupos de lectinas de leguminosas, lectinas em forma de β -prisma I, lectinas de monocotiledôneas manose-ligantes, lectinas em forma de trevo e lectinas com domínios heveínicos (BETTLER; IMBERTY; LORIS, 2007).

As estruturas das lectinas de leguminosas diferem quanto à glicosilação, quanto ao número de cadeias polipeptídicas em cada subunidade e quanto à estrutura quaternária. Porém, as subunidades, em todas elas, têm, essencialmente, a mesma estrutura terciária: um arranjo polipeptídico conhecido como “ β -sandwich” ou motivo “jelly roll”. Todas as estruturas estudadas até o momento são dímeros ou tetrâmeros formados por dímeros. Dessa forma, o primeiro passo na associação das subunidades dessas lectinas é a dimerização. Além disso, são o único grupo de lectinas vegetais com estrutura conhecida que possui uma dependência funcional de íons metálicos ligados (Ca^{2+} e Mn^{2+}) (BANERJEE *et al.*, 1996; WRIGHT *et al.*, 1997).

Resíduos em quatro loops 91-106, 125-135, 75-83 e 211-216 completam o bolso ligante de carboidrato em direção ao topo direito das subunidades nas lectinas desse grupo. O local mais invariável para interações com carboidrato em todas as lectinas de leguminosas são Asp83, Gly104 e Asn 127. Uma outra característica não-variante nos sítios açúcar-ligantes é a presença de um resíduo de aminoácido aromático. Essas características invariáveis pertencem ao primeiro dos três loops mencionados, enquanto interações envolvendo o loop 211-216, que exibe considerável variabilidade e parece ser, primariamente, responsável pela especificidade por açúcar de cada lectina de leguminosas. Esse loop é também altamente variável em termos de comprimento, seqüência e conformação (BANERJEE *et al.*, 1996).

Lectinas semelhantes à jacalina (lectina de *Artocarpus integrifolia*) geralmente são tetraméricas e a cadeia polipeptídica está arranjada em três subdomínios interrelacionados. As lectinas de Moraceae são típicas desse grupo. Cada subdomínio é uma folha- β antiparalela de quatro fitas que simula um motivo “Greek key” e, em conjunto, constituem o arranjo β -prisma I (WRIGHT, 1997).

As lectinas manose-específicas pertencem normalmente às famílias Amaryllidaceae, Orchidaceae, Alliaceae, Araceae e Liliaceae. Esse grupo é formado por lectinas extraídas de bulbos vegetais cujas estruturas são formadas por dímeros ou tetrâmeros, exibindo uma simetria interna de pseudo-trevo, ou simetria 222: três folhas β antiparalelas (subdomínios), formadas por quatro fitas cada, estão arranjadas na forma de um prisma triangular. (WRIGHT *et al.*, 1997).

Em um outro grupo de lectinas, freqüentemente diméricas, a cadeia polipeptídica é arranjada em dois domínios semelhantes, cada um com o motivo característico trevo- β (β -trefoil fold), remanescentes da cadeia-B das toxinas de plantas: ricina e abrina (WRIGHT *et al.*, 1997).

1.6. *Arachis hypogaea*

A aglutinina de amendoim (*Arachis hypogaea*), também chamada PNA, é uma proteína não-glicosilada homotetramérica, com peso molecular de 110 kDa, capaz de aglutinar eritrócitos humanos de todos os tipos de grupos sanguíneos, desde que tratados com neuraminidase (LOTAN *et al.*, 1975; BANERJEE *et al.*, 1996). Lotan e colaboradores (1975) foram os pioneiros na purificação dessa lectina e determinaram que a concentração dessa proteína a uma absorvância de 280 nm e célula de 1 cm ($A^{1\%, 1\text{cm}}$) seria de 7,7. PNA foi a primeira lectina a ter sua especificidade de ligação por T-antígeno (antígeno Thomsen-Friedenreich) relatada. Esse é um dissacarídeo Gal β 1,3GalNAc de origem não-oncofetal, geralmente expresso em 85% dos casos de carcinomas humanos. Dessa forma, proteínas que se ligam especificamente ao T-antígeno possuem um potencial valor diagnóstico (JEYAPRAKASH *et al.*, 2002).

As quatro subunidades na molécula têm essencialmente a mesma estrutura terciária. Banerjee e colaboradores (1996), estudando, por meio de difração de raio-X, a estrutura do complexo PNA-lactose com 2,25 Å de resolução, observaram que o arranjo terciário, em cada uma das quatro subunidades, é muito semelhante àquele em outras lectinas de leguminosas, exceto em relação aos loops. Como em outras lectinas de leguminosas, o esqueleto de cada uma das subunidades consiste de três folhas β , sendo uma folha plana de seis fitas (folha 1) no dorso da subunidade; uma folha curvada de sete fitas (folha 2) em direção à frente da subunidade e uma pequena folha de cinco fitas (folha 3), cujo principal papel é manter as duas outras folhas juntas. Os loops constituem 54% da estrutura. Eles interagem entre si e com a folha 2, e tais interações envolvem átomos tanto da cadeia principal quanto das cadeias laterais. O arranjo assumido por esses loops é tal, que origina um segundo núcleo hidrofóbico entre a folha 2 e os loops em adição àquele entre as folhas 1 e 2 (BANERJEE *et al.*, 1996).

Da mesma forma que nas outras lectinas de leguminosas, cada monômero da PNA possui um íon cálcio e um íon manganês. É surpreendente como essa região ligante de metais é totalmente conservada nessas lectinas. A distância cálcio-manganês varia entre 4.13 e 4.39 Å nas quatro subunidades (BANERJEE *et al.*, 1996).

Resíduos em quatro loops 91-106, 125-135, 75-83 e 211-216 completam o bolso ligante de carboidrato em direção ao topo direito das subunidades, como nas demais lectinas desse grupo. O resíduo de aminoácido aromático presente no sítio dessa lectina é a Tyr125, que empilha contra o anel do açúcar (BANERJEE *et al.*, 1996).

A molécula de PNA é um tetrâmero muito estável em pH fisiológico, mesmo em baixas concentrações. O tetrâmero, porém, se dissocia em dímeros quando submetido a baixo pH. Uma metade da molécula é naturalmente formada pelas subunidades 1 e 2, enquanto a outra metade é formada pelas subunidades 3 e 4. A formação dos dímeros de PNA envolve a associação “dorso-para-dorso” através de um contato extensivo entre as folhas β planas (folhas 1) de cada monômero. A região ligante correspondente à interface 3-4 é livre nas subunidades 1 e 2, enquanto a correspondente à interface 1-2 é livre nas subunidades 3 e 4. Dessa forma, o tetrâmero é uma estrutura aberta. A associação quaternária aberta na lectina de amendoim é estabilizada por interações hidrofóbicas, pontes de hidrogênio e interações mediadas pela água. O número de moléculas de água na camada de solvatação que envolve cada subunidade pode variar de 120 a 156 (BANERJEE *et al.*, 1996).

Segundo Loontjens (1983), a lectina de amendoim tem a habilidade de se ligar à estrutura de glicoconjugados não-sialilados que estão α -O-ligados a um resíduo de serina ou treonina em glicoproteínas. PNA parece possuir um extenso sítio de combinação, o que faz com que o T-antígeno, que é um dissacarídeo, se ligue 36 vezes melhor que metil- β -galactose e 14 vezes melhor que metil- β -lactose.

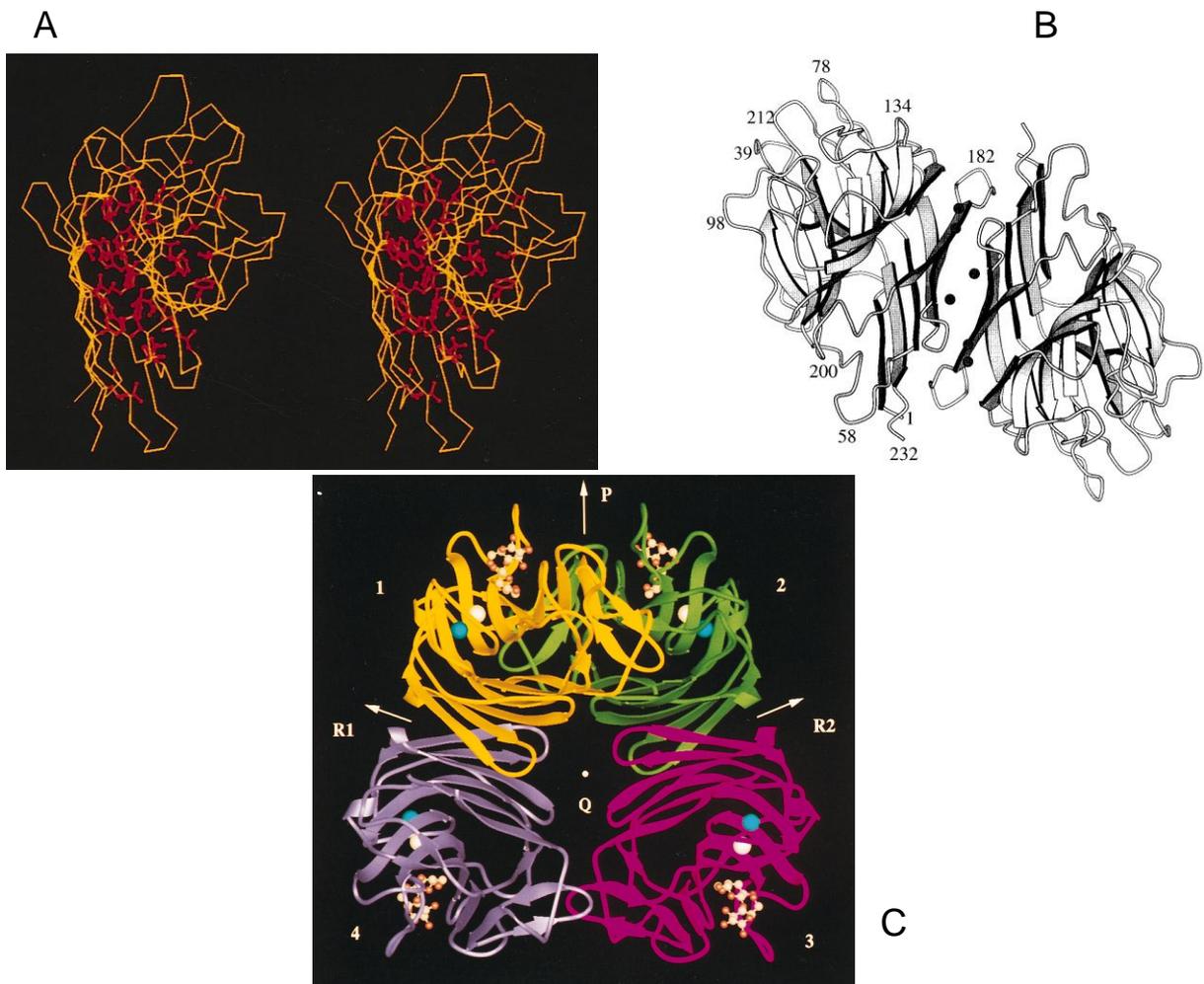


Figura 9 – Lectina de amendoim (*Arachis hypogaea*). A – Vista estérica da subunidade da lectina. Os resíduos hidrofóbicos estão evidenciados em vermelho e a cadeia principal em amarelo. B – Dímero de PNA, mostrando as moléculas de água (representadas por pequenas esferas) na interface. C – Estrutura quaternária da PNA. Fonte: BANERJEE *et al.*, 1996

1.7. *Artocarpus integrifolia*

A jacalina é uma lectina da semente de jaca (*Artocarpus integrifolia*), que possui especificidade de ligação por galactose e N-acetilgalactosamina. Seu peso molecular é de 66 kDa e é estruturalmente formada por duas cadeias originadas por proteólise pós-traducional (SANKARANARAYANAN *et al.*, 1996; YANG; CZAPLA, 1993).

Sureshkumar e colaboradores (1982) isolaram e caracterizaram, inicialmente, essa lectina, mostrando sua marcante especificidade por resíduos galactosil α -ligados. Essa proteína também se liga, específica e seletivamente, às formas α -ligantes do T-antígeno (SASTRY *et al.*, 1986). Hagiwara e colaboradores (1998) mostraram que a jacalina é uma

glicoproteína que, em SDS-PAGE, apresenta duas bandas, uma não-glicosilada de aproximadamente 15 kDa, e uma glicosilada de aproximadamente 18 kDa. Esses mesmos autores determinaram o valor de absorção a 280 nm e célula de 1 cm ($A^{1\%, 1\text{ cm}}$) de 12,1.

A jacalina foi a primeira lectina para a qual foi descrito o arranjo estrutural β -prisma I. Essa lectina é um tetrâmero com simetria 222, no qual cada uma das quatro subunidades é formada por uma cadeia α principal de 133 aminoácidos e uma cadeia β menor de 20 aminoácidos. A estrutura cristalina dessa proteína indica que cada subunidade exibe um dobramento simétrico na forma de β -prisma tipo I, compreendendo três sítios (Greek keys), que consistem de quatro folhas β padrão (SANKARANARAYANAN *et al.*, 1996).

A estrutura cristalina também mostra um sítio-ligante de carboidrato por subunidade. Os resíduos que formam o sítio de ligação emergem de diferentes loops (46-52; 76-82; 122-125) e do N-terminal da cadeia α (JEYAPRAKASH *et al.*, 2003). A arquitetura do sítio de ligação na estrutura cristalina sugere que a clivagem no loop, originada por proteólise pós-traducional, resultando em um grupo de aminoácidos livres, é uma característica-chave na criação de um contorno apropriado para formar um bolso de ligação (RAVAL *et al.*, 2004).

Uma análise completa das interações proteína-ligante, feita por Jeyaprakash e colaboradores (2003), mostrou que o sítio ligante da jacalina é composto por três subsítios: sítio primário de ligação e sítios secundários A e B.

Jeyaprakash e colaboradores (2002), estudando a interação da jacalina com o antígeno-T (Gal β 1-3galNAc), revelaram que o sítio primário de ligação a carboidrato da lectina está ocupado pelo motivo GalNAc do dissacarídeo (figura 10). As interações desse resíduo com a lectina são as mesmas em todas as subunidades e parecem envolver um forte componente eletrostático. O sítio de ligação da proteína contém um conjunto de cargas positivas formadas pelos resíduos Gly121N, Tyr122N e Trp123N. Por outro lado, os motivos galactose/N-acetilgalactosamina do T-antígeno são carregados positivamente numa face, denominada face B, e negativamente na face oposta a essa. O anel aromático, contendo elétrons π da Tyr78, empilha na face B, como em outras lectinas Gal/GalNAc específicas, enquanto a porção positiva do sítio de combinação interage com o lado negativamente carregado do carboidrato.

A estrutura é praticamente a mesma no complexo descrito e no complexo com metil- α -galactose. A principal diferença entre os complexos reside na orientação do anel aromático da Tyr122, causando a abertura do sulco formado pelos resíduos de Tyr78 e Tyr122 no complexo da jacalina com metil- α -galactose (JEYAPRAKASH *et al.*, 2002).

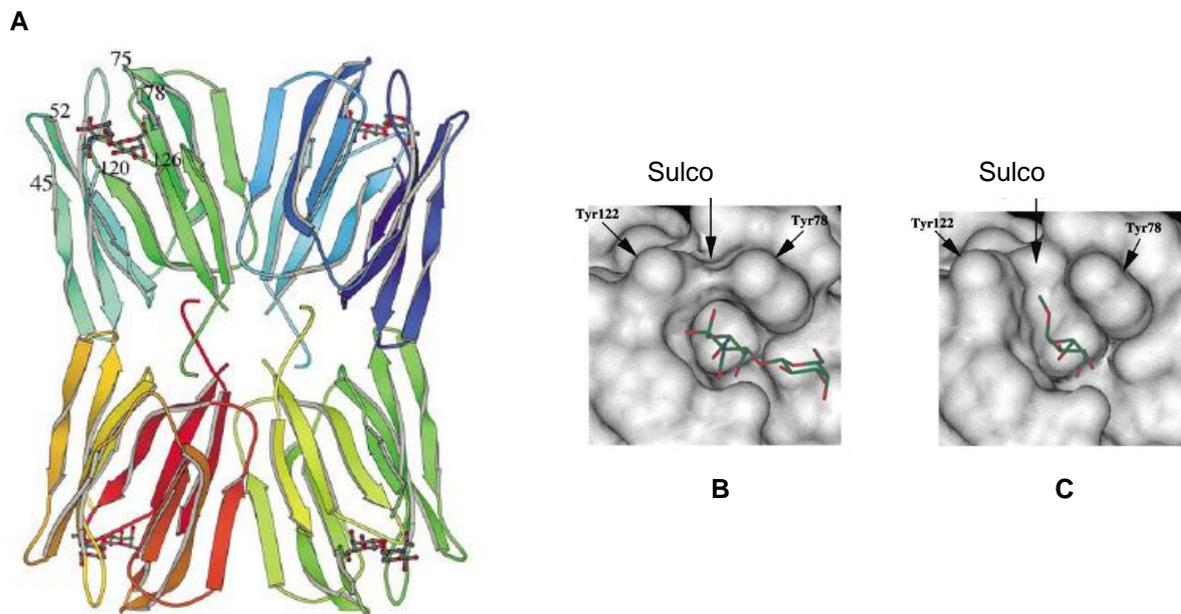


Figura 10 –Estrutura do complexo jacalina-T-antígeno. Os loops envolvidos na ligação com o açúcar estão numerados em uma das subunidades (A); Sulco do sítio de ligação do complexo jacalina-T-antígeno (B) e jacalina-metil- α -galactose (C).

Fonte: JEYAPRAKASH *et al.*, 2002.

Ao nível de monossacarídeos, a jacalina liga-se com maior afinidade à metil- α -galactose e à N-acetil-galactosamina que à galactose. A estrutura do complexo metil- α -galactose sofre interações estéricas favoráveis do grupo metil do ligante com resíduos aromáticos Phe47, Tyr78, Tyr122 e Trp123 (sítio secundário A), explicando, assim, a alta afinidade obtida pela substituição α -metil. A substituição metil no açúcar β -anomérico pode levar a colisões estéricas severas com o resíduo de Tyr122, causando uma afinidade da metil- β -galactose menor que a da galactose (JEYAPRAKASH *et al.*, 2002). Estudos calorimétricos realizados por Jeyaprakash e colaboradores (2005) revelaram que metil- α -galactose se liga à jacalina com afinidade 27 vezes maior que a galactose o faz. Além disso, foi observado também que o epímero 2,4 da galactose, a manose, é também capaz de ligar-se a essa lectina, revelando uma multi-especificidade de ligação, porém com afinidade 20 vezes menor. Evidências levaram esses mesmos autores a concluir que a jacalina é específica para O-glicanos em virtude da presença neles de galactose e que a sua afinidade por N-glicanos é bastante fraca ou inexistente.

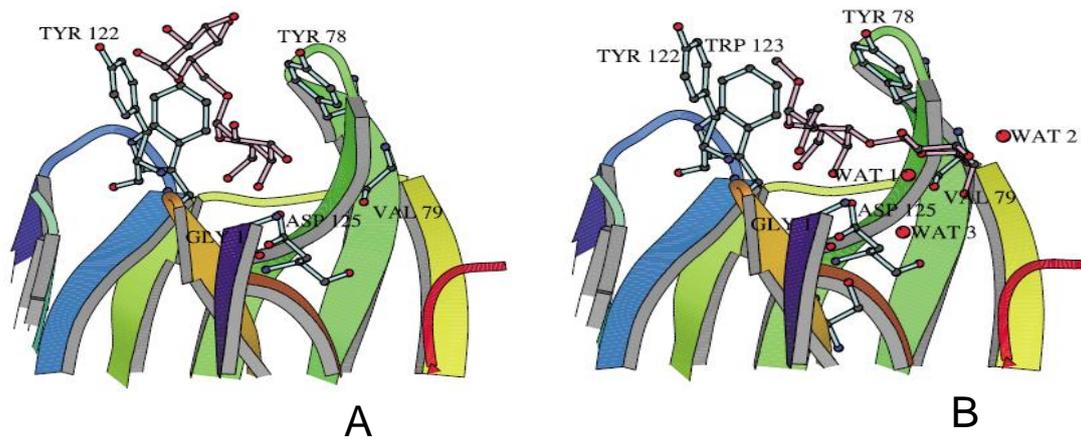


Figura 11 – Visão estérica do sítio ligante da jacalina com os ligantes (A) melibiose (Gal α 1-6Glc) e (B) metil- α -T-antígeno (Gal β 1-3GalNAc- α -O-me). Fonte: JEYAPRAKASH *et al.*, 2003

A jacalina tem recebido atenção considerável no que diz respeito à sua habilidade de ligar-se a numerosas glicoproteínas, incluído IgA₁, IgD, CD4⁺, hemopexina, plasminogênio, gonadotropina coriônica, proteína Z bovina, fator X de coagulação bovino, fetuína e asialofetuína. Todas elas possuem o dissacarídeo T-antígeno O-ligado ao cerne da proteína, muitas vezes em adição a glicanos N-ligados (JEYAAPRAKASH *et al.*, 2003).

1.8. *Artocarpus incisa* L.

Artocarpus incisa L. é uma planta comum, amplamente distribuída em regiões tropicais. Moreira e colaboradores (1998) descreveram o isolamento da lectina de *A. incisa* por meio de cromatografia de afinidade em coluna de galactomanana de *Adenantha pavonina*. Essa lectina, denominada frutalina, demonstrou-se capaz de aglutinar eritrócitos humanos do sistema ABO e eritrócitos de coelho mais fortemente que eritrócitos de vaca, cabra, porco e ovelha. A sua atividade hemaglutinante não foi inibida pelo açúcar galactose, embora tenha sido caracterizada como uma lectina galactose-ligante. Esses dados sugerem uma estrutura mais complexa para a especificidade a carboidrato. Além disso, a frutalina não é uma metaloproteína, já que sua atividade hemaglutinante não foi afetada pela diálise prolongada da lectina contra EDTA 0,2 M.

O conteúdo de carboidrato obtido para essa proteína foi de 2,1%. A composição de aminoácidos revelou um baixo conteúdo de aminoácidos sulfurados e um elevado conteúdo de aminoácidos ácidos e hidroxilados. A massa molecular relativa para a frutalina foi de aproximadamente 49 kDa, sugerindo uma estrutura tetramérica. Por SDS-PAGE, essa

proteína apresenta duas bandas com massa molecular aparente de 15,5 e 12 kDa. Essa lectina, quando dissolvida em NaCl 0,15 M, teve um valor de absorvitividade molar a 280 nm e 1 cm de célula ($A^{1\%, 1\text{ cm}}$) de 10,73. A presença de isoformas também foi sugerida. A estrutura da frutalina mostrou-se muito semelhante à da jacalina devido à presença de um dobramento simétrico na forma de β -prisma tipo I, compreendendo três sítios (Greek keys), que consistem de quatro folhas β padrão (MOREIRA *et al.*, 1998). Quando a seqüência dos 63 primeiros resíduos de aminoácidos da porção N-terminal da frutalina foi comparada com a da jacalina, foi observada uma identidade em torno de 97% entre as duas lectinas (MONTEIRO, 1998)

A frutalina mostrou interação específica com galacto-componentes de neutrófilos, induzindo a migração dessas células, quando injetada em cavidade pleural de rato. Além desse efeito migratório *in vivo*, a frutalina é capaz de ativar, diretamente, neutrófilos *in vitro*, induzindo quimotaxia e engatilhando o rompimento oxidativo. A frutalina induziu também uma rápida e expressiva alteração na dinâmica actina-citoesqueleto em neutrófilos e foi capaz de ativar vias tirosina-quinase dependentes (BRANDO-LIMA *et al.*, 2005).

Recentemente, mostrou-se que a frutalina é um potente ativador mitogênico de linfócitos humanos, visto que estimulou a proliferação dessas células *in vitro*. Dessa forma, essa lectina pode ser uma ferramenta útil no estudo de mecanismos intracelulares acompanhados de ativação de células T (BRANDO-LIMA *et al.*, 2006).

1.9. *Ricinus communis*

Ricina é uma proteína heterodimérica com massa molecular de aproximadamente 66 kDa, isolada de sementes de *Ricinus communis* (família Euphorbiaceae). É uma lectina tóxica, que consiste de duas cadeias polipeptídicas (cadeia A de 32 kDa e cadeia B de 34 kDa), ligadas por uma ponte dissulfeto (DESPEYROUX *et al.*, 2000). A cadeia B lectínica possui os sítios ligantes de carboidratos, específicos por galactose e N-acetilgalactosamina, enquanto a cadeia A enzimática é desprovida de tais sítios e responsável pela atividade RNA N-glicosilase e conseqüente interrupção da síntese protéica. Assim, a cadeia B é capaz de se ligar a resíduos de galactose β -1,4-ligados de glicolípídeos e glicoproteínas da superfície celular, facilitando o transporte da lectina tóxica para o interior da célula (SHARON; LIS, 2003; LORD *et al.*, 2003). De acordo com Ishiguro e colaboradores (1964), para estimar a concentração da ricina por medidas espectrométricas a 280 nm, uma solução contendo 1 mg de ricina por mL assume absorbância $A_{280} = 1,156$.

A ricina foi a primeira proteína inativadora de ribossomos a ter sua estrutura tridimensional resolvida por cristalografia de raios-X. A cadeia A da ricina é formada por 267 resíduos de aminoácidos e liga-se à cadeia B, de 262 resíduos, por meio de uma ponte dissulfeto. Na cadeia A, os resíduos Tyr⁸⁰, Tyr¹²³, Glu¹⁷⁷, Arg¹⁸⁰ e Trp²¹¹ formam o sítio de ligação à adenina. O anel da adenina posiciona-se entre a Tyr⁸⁰ e a Tyr¹²³. Existem ainda seis resíduos de aminoácidos (Asn⁷⁸, Arg¹³⁴, Gln¹⁷³, Ala¹⁷⁸, Glu²⁰⁸ e Asn²⁰⁹) que, embora não estejam envolvidos diretamente na atividade enzimática, são importantes na manutenção da conformação catalítica (VAN DAMME *et al.*, 2001).

A cadeia lectínica da ricina compreende dois domínios globulares interligados, cada um formado por três subdomínios (α , β , e γ). Quatro pontes dissulfeto estabilizam o enovelamento da cadeia B. Cada domínio possui um sítio de ligação a carboidratos, localizados nos subdomínios 1 α e 2 γ . Ambos os sítios ligam resíduos de galactose por meio de quatro (no domínio 1) ou três (no domínio 2) pontes de hidrogênio (VAN DAMME *et al.*, 2001). Mesmo formando uma ponte de hidrogênio a mais, o domínio 1 possui baixa afinidade, enquanto o domínio 2 possui alta afinidade de ligação por lactose. Além disso, somente o sítio do domínio 2 é capaz de acomodar N-acetil-galactosamina. Além das pontes de hidrogênio, ocorrem interações hidrofóbicas entre o anel piranosídico do açúcar e resíduos aromáticos ou hidrofóbicos do sítio (YAMASAKI; HATAKEYAMA; FUNATSU, 1985; HATAKEYAMA; YAMASAKI; FUNATSU, 1986). Ficou claro, em trabalho desenvolvido por Wu e colaboradores (2006), no qual foi relatada a inexistência de afinidade da ricina por glucose e manose, que a configuração dos carbonos 4 e 2 na galactose são essenciais para a ligação com essa lectina.

Wu e colaboradores (2006) demonstraram que oligossacarídeos que possuem galactose $\beta(1-4)/\beta(1-3)$ como ligantes fazem potentes ligações com os domínios da cadeia lectínica da ricina e que forças hidrofóbicas são importantes para a interação com a β -galactose. Nesse trabalho, os autores mostram também a afinidade da ricina pelo dissacarídeo Gal $\beta 1-3$ GalNAc (antígeno T). Segundo esses autores, o sítio carboidrato-ligante da ricina também é capaz de ligar o α -anômero da galactose, embora com menor afinidade que pelo β -anômero.

As sementes de *Ricinus communis* possuem, além da ricina, a aglutinina de ricinus, que consiste de quatro cadeias peptídicas. É uma lectina com massa molecular de 120 kDa que não possui atividade tóxica, mas é capaz de aglutinar eritrócitos espontaneamente. Essa proteína não é tão bem-caracterizada quanto a ricina (OLSNES; SALTVEDT; PIHL, 1974).

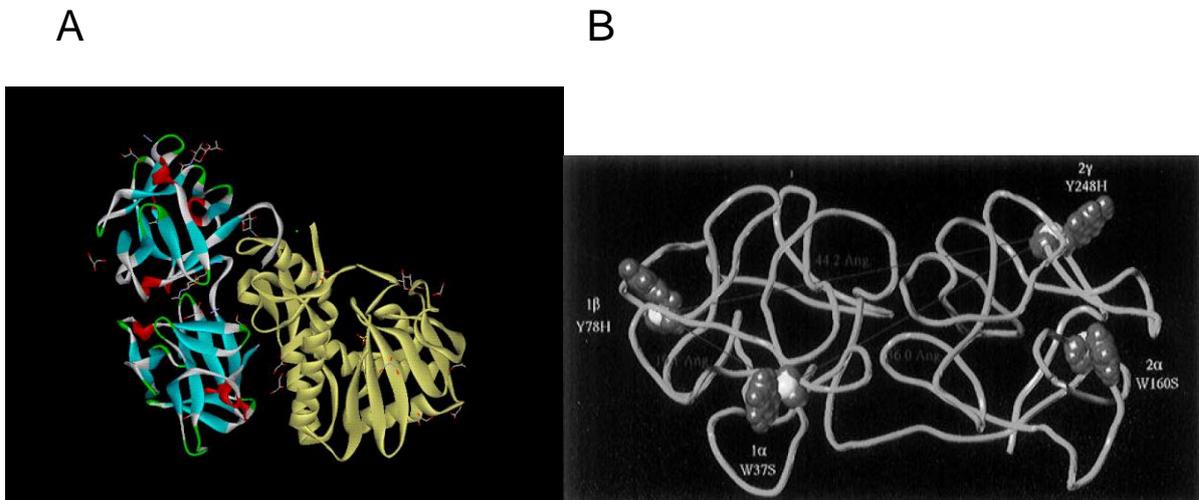


Figura 12 – Ricina (A); Cadeia B da ricina mostrando os sítios de ligação e a distância entre eles (B).
Fonte: BETTLER *et al.*, 2007; FRANKEL *et al.*, 1996.

2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi investigar a interação de lectinas D-galactose-ligantes com xiloglucanas e galactomananas de sementes, evidenciando a especificidade que essas lectinas possuem pelos anômeros α e β da galactose, a fim de propor o uso desses polissacarídeos como ferramenta no isolamento e determinação da especificidade anomérica de lectinas D-galactose-ligantes.

3. MATERIAIS

3.1. Sementes

As sementes de *Mucuna sloanei* foram coletadas no interior do Ceará, identificadas em comparação com uma exsicata catalogada sob o número 000024482 no Herbário Prisco Bezerra – EAC (UFC) e adequadamente estocadas. As sementes de *Artocarpus incisa* L., *A. integrifolia* e *H. courbaril* foram obtidas de árvores encontradas no município de Maranguape (Ceará). Sementes de *Adenantha pavonina* e *C. langsdorffii* foram colhidas na região metropolitana de Fortaleza e as sementes de *Arachis hypogaea* foram obtidas comercialmente na mesma cidade. As sementes de *R. communis* foram coletadas na praia do Presídeo (Ceará).

3.2. Polissacarídeos

Amostras de polissacarídeos de *Mimosa scabrella*, *Stryphnodendron barbatiman* e *Dimorphandra mollis* foram gentilmente cedidas pelos pesquisadores Dra. Fany Reicher, Dra. Carmen Lúcia de O. Petkowicz e Dr. Marcos Silveira Buckeridge.

3.3. Hemácias

Hemácias de coelho foram obtidas de animais provenientes do Biotério do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará.

3.4. Outros materiais

Kit de calibração de peso molecular baixo para eletroforese (PAGE-SDS) da Amersham Pharmacia Biotech. Epicloridrina, TEMED, acrilamida e metileno-bisacrilamida da Sigma chemical Co., St. Louis, USA.

Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

4. MÉTODOS

4.1. Isolamento dos polissacarídeos de sementes

4.1.1. Xiloglucana de sementes de *Mucuna sloanei*

A extração da xiloglucana de sementes de *M. sloanei* foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Teixeira (2005), com modificações (Figura 13). As sementes foram previamente quebradas para a retirada da casca e separação dos cotilédones. Em seguida, esses cotilédones foram triturados, e a farinha obtida nesse processo foi submetida a uma inativação enzimática, descrita por (ZAWADZKI-BAGGIO *et al*, 1992), substituindo metanol por etanol na proporção 4:1 v/v (etanol:água), sob refluxo de 30 minutos.

Após a etapa de inativação enzimática, o material foi centrifugado a 10.000 x g durante 30 minutos. O sobrenadante foi descartado, e o resíduo foi submetido à extração aquosa, por 1 hora, seguido de centrifugação a 10.000 x g durante 30 minutos. O sobrenadante obtido no processo (denominado sobrenadante 1) foi precipitado com etanol (1:3 v/v) e submetido à extração aquosa por 1 hora, seguido de centrifugação a 10.000 g durante 30 minutos. O sobrenadante obtido (sobrenadante 2) foi precipitado em etanol, desidratado em acetona P.A (*overnight*), secado a vácuo, macerado e triturado para a obtenção da xiloglucana pronta (em pó), a qual foi utilizada nos experimentos posteriores. Os resíduos obtidos nas centrifugações foram solubilizados em água destilada, centrifugados a 10.000 x g durante 30 minutos e precipitados em etanol (1:3 v/v), sendo, em seguida, desidratados em acetona P.A. (*overnight*), secados a vácuo, macerados e triturados para a obtenção da xiloglucana pronta.

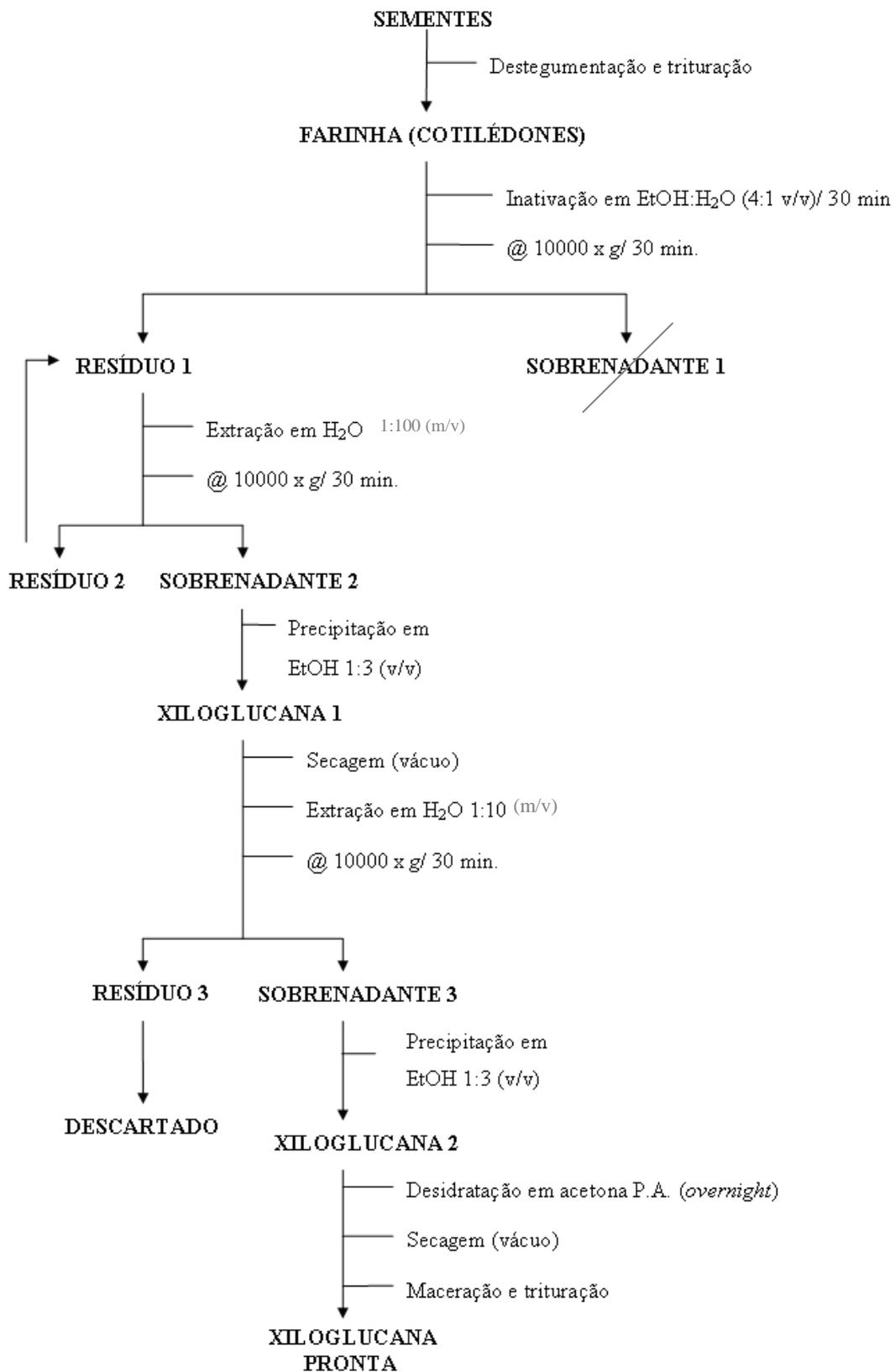


Figura 13 – Extração de xiloglucana de mucuna (*M. sloanei*).

4.1.2. Xiloglucanas de sementes de *Hymenaea courbaril* e *Copaifera langsdorffii*

A extração das xiloglucanas de sementes de jatobá (*Hymenaea courbaril*) e copaíba (*Copaifera langsdorffii*) foi realizada como mostra a Figura 14.

Visando à retirada do tegumento (destegumentação) e à inativação enzimática, as sementes foram submetidas a uma fervura por um período de 40-50 minutos. Ao final, os cotilédones destegumentados foram pesados.

Em seguida, os cotilédones foram colocados em um liquidificador, juntamente com água destilada na proporção 1:50 p/v e, então, triturados. Em seguida, esse material foi centrifugado a 6.000 x g, durante 20 minutos, 4°C. Ao final da centrifugação, duas frações foram obtidas: um resíduo, denominado resíduo 1, e um sobrenadante, denominado sobrenadante 1.

O sobrenadante 1 foi precipitado em etanol na proporção de 1:3 v/v. O polissacarídeo obtido foi secado a vácuo para a retirada do excesso de etanol. Em seguida, esse polissacarídeo foi pesado, ressolubilizado em água destilada (1:10 p/v) e centrifugado a 6.000 x g, por 20 minutos. O resíduo obtido (denominado resíduo 2) seguiu as mesmas etapas do resíduo 1, descritas a seguir. Já o sobrenadante obtido (denominado sobrenadante 2) foi precipitado em etanol (1:3 v/v), dando origem ao polissacarídeo final (xiloglucana), o qual foi desidratado em acetona P.A. (*overnight*), secado a vácuo, macerado e triturado. A xiloglucana foi armazenada para uso posterior.

O resíduo 1, obtido na primeira centrifugação, foi pesado, ressolubilizado em água destilada (na proporção 1:10 p/v) e centrifugado a 6.000 x g por 20 minutos. O resíduo obtido nesse processo foi descartado, e o sobrenadante obtido (denominado sobrenadante 3) foi submetido às mesmas etapas do sobrenadante 2 (descritas acima) para a obtenção da xiloglucana final.

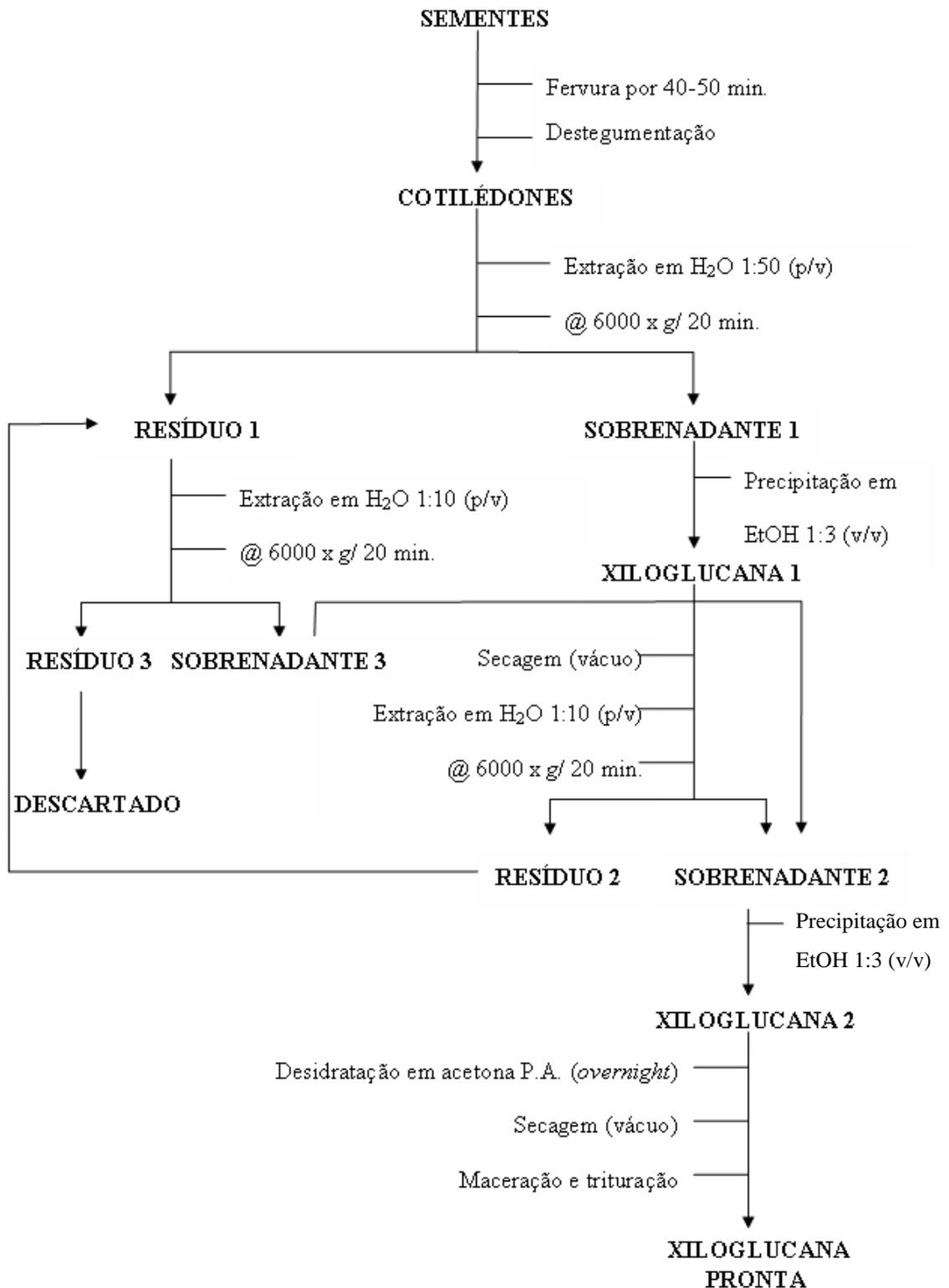


Figura 14 – Extração das xiloglucanas de sementes de jatobá (*H. courbaril*) e copaíba (*Copaifera langsdorffii*).

4.1.3. Galactomanana de sementes de *Adenantha pavonina*

A extração da galactomanana endospermica de carol (*Adenantha pavonina*) foi realizada como mostra a Figura 15.

Inicialmente, foi feita a retirada do tegumento (destegumentação) e a inativação enzimática; essas sementes foram submetidas a um aquecimento a 100 °C, em água destilada, por 20 minutos. Em seguida, permaneceram intumescendo em água destilada a 4 °C (*overnight*) e, após a separação mecânica, o endosperma foi triturado em liquidificador, juntamente com água destilada, na proporção 1:10 p/v. O material obtido foi centrifugado a 6.000 x g durante 20 minutos a 4°C.

Ao final da centrifugação, duas frações foram obtidas: um resíduo, o qual foi descartado, e um sobrenadante, o qual foi precipitado em etanol 95% na proporção de 1:3 (v/v). O polissacarídeo obtido (galactomanana 1) foi secado a vácuo para a retirada do excesso de etanol, sendo, em seguida, pesado, ressolubilizado em água destilada (1:10 p/v) e centrifugado a 6.000 x g por 20 minutos. O resíduo obtido foi descartado, e o sobrenadante (galactomanana 2) foi precipitado em etanol (1:3 v/v), desidratado em acetona P.A. (*overnight*) e secado a vácuo, dando origem ao polissacarídeo final (galactomanana), o qual foi utilizado nos experimentos posteriores.

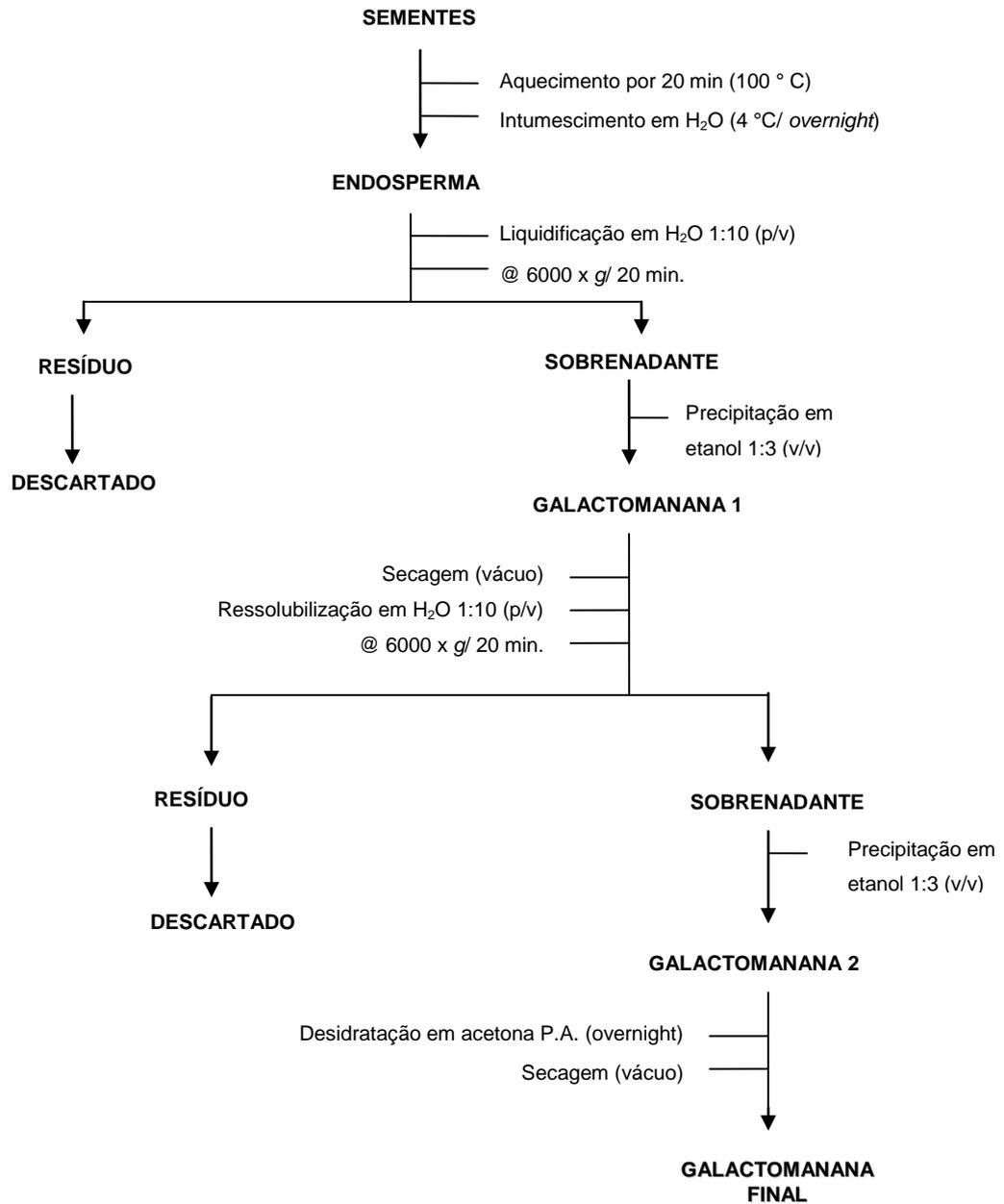


Figura 15 – Esquema de extração da galactomanana de sementes de carol (*A. pavonina*).

4.2. Determinação de proteínas solúveis

O conteúdo de proteína das amostras (50 mg/ 25 mL) de todos os polissacarídeos, inclusive os que foram cedidos para uso neste trabalho, foi estimado de acordo com o método de Lowry modificado por Hartree (1972), sendo as leituras feitas a 660 nm. O padrão utilizado foi albumina serica bovina (BSA) nas concentrações de 10-100 µg/mL.

4.3. Reticulação do polissacarídeo com epiclorigrina

Os polissacarídeos obtidos foram tratados com epiclorigrina na presença de NaOH, seguindo o mesmo procedimento que Appukutan e colaboradores (1977). A 0,5 g de cada um dos polissacarídeos foram adicionados 0,15 mL de epiclorigrina e 1,5 mL de NaOH 3 M. A mistura foi agitada manualmente, mantida em estufa por 24 horas a 40 °C e por mais 12 horas a 70 °C. Após esse período, o material foi lavado exaustivamente com água destilada, até que o pH ficasse neutro. O material foi homogeneizado e passado em peneira de aproximadamente 30 mesh, tendo as partículas finais sido retiradas por lavagem exaustiva com água destilada.

A partir do material reticulado, foram montadas sete colunas cromatográficas em seringas hipodérmicas. A montagem foi feita deixando-se o gel sedimentar por gravidade. Posteriormente, as colunas foram equilibradas com NaCl 0,15 M e, em seguida, foram feitas lavagens exaustivas com tampão glicina-HCl 0,1 M pH 2,6 contendo NaCl 0,15 M, para que todo o resquício de proteína presente nos polissacarídeos fosse retirado. Por fim, cada coluna foi novamente equilibrada com NaCl 0,15 M.

4.4. Isolamento das lectinas de *Arachis hypogaea* (PNA), *Artocarpus integrifolia* (jacalina), *Artocarpus incisa* (frutalina) e *Ricinus communis* (ricina).

4.4.1. Preparo dos extratos brutos

Farinhas de *Arachis hypogaea*, *Artocarpus integrifolia*, *Artocarpus incisa* e *Ricinus communis* foram obtidas pela trituração das sementes íntegras, livres de tegumento. A farinha de *R. communis* e *Arachis hypogaea* foram delipidadas *overnight* em hexano P.A. As farinhas obtidas foram acondicionadas em frascos fechados à temperatura ambiente.

A extração protéica, a partir das farinhas de *A. integrifolia* e *A. incisa*, foi feita suspendendo-se a farinha em solução de NaCl 0,15 M na proporção de 1:10 (m/v) e deixando a mistura em agitação contínua por trinta minutos à temperatura ambiente. Para as farinhas de *R. communis* e *A. hypogaea*, seguiu-se a mesma metodologia, diferindo somente quanto à proporção de farinha para a solução de NaCl 0,15 M, que foi de 1:20 (m/v). As suspensões obtidas foram centrifugadas a 9.000 x g por trinta minutos a 4° C. Os resíduos foram descartados e os sobrenadantes filtrados em papel de filtro (extrato total), aliquotados e acondicionados em frascos de vidro fechados a 4 °C.

4.4.2. Cromatografia de Afinidade

Para cada um dos extratos preparados foram feitas sete cromatografias de afinidade, sendo três em colunas de xiloglucanas (*H. courbaril*, *M. sloanei* e *C. langsdorffii*) e quatro em colunas de galactomananas (*S. barbatiman*, *A. pavonina*, *M. scabrella* e *D. mollis*). Cada coluna foi previamente equilibrada com solução de NaCl 0,15 M. O fluxo foi regulado para 30 mL/h. O extrato foi aplicado na coluna: 2 mL dos extratos de *A. integrifolia* ou *A. incisa*, ou 4 mL dos extratos de *A. hypogaea* ou *R. communis*. O extrato, então, permaneceu em contato com a coluna por um tempo de 15 minutos (para os extratos de *A. integrifolia* ou *A. incisa*) ou 1 hora (para os extratos de *A. hypogaea* ou *R. communis*). O material não retido (pico I) foi eluído com a solução de equilíbrio e a fração retida na matriz cromatográfica (pico II) foi eluída com tampão glicina-HCl 0,1 M pH 2,6 contendo NaCl 0,15 M. A concentração protéica foi monitorada por leitura de absorbância a 280 nm, e os perfis cromatográficos foram comparados.

4.5. Ensaio de atividade hemaglutinante

Os ensaios de atividade hemaglutinante foram realizados conforme metodologia descrita por Moreira e Perrone (1977). As placas de microtitulação receberam, inicialmente, 50 µL de tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,6 contendo NaCl 0,15 M em cada poço; em seguida, 50 µL das amostras foram acrescentados ao primeiro poço de cada fileira e diluídas duplo-seriadamente. Posteriormente, foi adicionado a essa diluição igual volume de uma suspensão de hemácias a 2% (diluída em NaCl 0,15 M). Para esse ensaio foram utilizados eritrócito não-tratados de coelho. As placas foram incubadas por 30 minutos a 37 °C, seguindo-se um repouso de 30 minutos à temperatura ambiente. Decorrido esse tempo, foi, então, procedido a

visualização dos aglutinados a olho nu. Os títulos de hemaglutinação foram calculados como sendo o inverso da maior diluição ainda capaz de provocar aglutinação das hemácias.

4.6. Ensaio de atividade tóxica

Para o ensaio de atividade tóxica foi utilizada uma dose letal, maior que a pré-estabelecida para a ricina (DL50= 8 µg/Kg de peso corpóreo) por Olsnes e Pihl (1973). Uma dose de aproximadamente 30 µg/Kg de peso corpóreo de ricina foi injetada na cavidade intraperitoneal de camundongos da raça swiss, sendo observadas as sintomatologias e o tempo de sobrevivência.

4.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE-SDS)

Os experimentos de eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS e β -mercaptoetanol foram realizados segundo a técnica de Laemmli (1970), usando-se um gel de aplicação de 3,5% de acrilamida em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 e um gel de separação a 15% em tampão Tris-HCl 3,0 M pH 8,8 e SDS 1%, adaptada para o uso em placas medindo 10 x 8 cm (Sistema Hoefer SE250 - Pharmacia Biotech). O tampão de corrida foi preparado com Tris 0,025 M, glicina 0,2 M e SDS 0,1% a pH 8,3. As amostras dissolvidas em tampão tris-HCl 0,0625 M, pH 8,3, contendo SDS 10%, com e sem β -mercaptoetanol, azul de bromofenol 0,02% e em seguida incubadas a 110 °C por 5 minutos. Para aumentar a densidade, facilitando a aplicação, foi adicionado ainda cristais de sacarose. Alíquotas de 10 µL das amostras tratadas foram aplicadas no gel, e então submetida a uma corrente de 40 mA durante aproximadamente uma hora e trinta minutos. Os padrões utilizados foram: fosforilse b (97kDa), albumina sérica bovina (66kDa), ovalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactalbumina (14,4 kDa). Os géis foram revelados com prata, segundo a metodologia descrita por Blum e colaboradores (1987).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O fato de as lectinas se ligarem de forma reversível aos carboidratos pelos quais possuem afinidade é uma característica que tem sido bastante explorada para o isolamento e /ou purificação dessas proteínas. A melhor maneira de isolar lectinas tem sido por meio de cromatografia de afinidade em matrizes contendo carboidratos (LIS; SHARON, 1998). Dessa forma, muitas matrizes cromatográficas foram desenvolvidas e/ou utilizadas para esse fim (DE-SIMONE; NETTO; SILVA, 2006; INA *et al.*, 2005; GARROS-ROSA; REICHER; PETKOWICZ, 2006; TEIXEIRA, 2007).

Os polissacarídeos de reserva de sementes (galactomananas e xiloglucanas) são polímeros que, naturalmente, possuem resíduos de D-galactose expostos na estrutura. Essa é uma característica que já tem sido explorada, principalmente nas galactomananas, para o isolamento de lectinas galactose-ligantes (MOREIRA *et al.*, 1998; GARROS-ROSA; REICHER; PETKOWICZ, 2006). Porém, xiloglucanas e galactomananas diferem quanto ao carbono anomérico dos resíduos de galactose que estão expostos. O fato de os resíduos de galactose serem α -ligados em galactomananas e β -ligados em xiloglucanas se deve às enzimas (galactosiltransferases) que adicionam esses resíduos nas moléculas. Essa característica é uma grande vantagem das matrizes formadas a partir dos polissacarídeos vegetais em relação às matrizes comerciais sintéticas, cujos resíduos de galactose expostos são uma mistura dos anômeros.

De acordo com o que foi descrito na literatura, pode-se perceber quão distintas são as lectinas utilizadas neste trabalho. Embora sejam D-galactose-ligantes, jacalina, frutalina, ricina e PNA apresentam estruturas diversas e sítios de ligação bastante diferentes. Isso faz com que essas lectinas possuam afinidades também distintas quanto aos anômeros α e β da galactose e pode ser uma razão para diferentes interações frente às matrizes utilizadas.

5.1. Extração dos polissacarídeos e determinação de proteínas solúveis

Inicialmente, foi realizada a extração dos polissacarídeos de *H. courbaril*, *C. langsdorffii* e *M. sloanei*, como descrito na metodologia. Após a obtenção dos polissacarídeos, uma alíquota (50 mg de polissacarídeo/ 25 mL de água destilada) de cada material foi utilizada para a determinação de proteínas solúveis pelo método de Lowry modificado por Hartree (1972). O resultado obtido, ilustrado na tabela 3, indica que a

quantidade de proteínas solúveis está dentro dos valores esperados, sendo inferior a 5% para todas as amostras, demonstrando a pureza dos polissacarídeos.

Tabela 3 – Determinação de proteínas solúveis pelo método de Lowry, modificado por Hartree (1972), das amostras dos polissacarídeos de *A. pavonina*, *S. barbatiman*, *M. scabrella*, *D. mollis*, *C. langsdorffii*, *H. courbaril* e *M. sloanei*.

Amostras	Proteína (%)
<i>A. pavonina</i>	1,2
<i>S. barbatiman</i>	2,8
<i>M. scabrella</i>	3,2
<i>D. mollis</i>	2,9
<i>C. langsdorffii</i>	0,9
<i>H. courbaril</i>	2,4
<i>M. sloanei</i>	3,9

Resultados semelhantes foram obtidos por Oliveira Júnior e colaboradores (2006), quando a extração da xiloglucana de copaíba resultou em um rendimento de 46,7% do peso de pó seco da semente, contendo 0,4% de proteínas como contaminantes, indicando, portanto, que o polissacarídeo obtido apresentou um grau de pureza bastante elevado.

5.2. Preparação das matrizes de afinidade

Uma vez verificada a pureza destes polissacarídeos, os mesmos foram utilizados para a preparação de matrizes para cromatografias de afinidade. Para tal, 0,5 g de cada polissacarídeo foram reticulados, como descrito na metodologia e, posteriormente, as matrizes foram montadas. Em seguida, verificou-se o volume de cada uma das matrizes, como pode ser visto na tabela 4 a seguir.

Tabela 4 – Parâmetros das matrizes de afinidade preparadas a partir de galactomananas e xiloglucanas.

Matriz	Massa de goma antes da reticulação (mg)	Massa da matriz após reticulação (mg)	Volume da coluna (mL)
<i>A. pavonina</i>	500	433,6	6,0
<i>M. scabrella</i>	500	286,2	7,6
<i>D. mollis</i>	500	309,3	8,9
<i>S. barbatiman</i>	500	358,1	4,2
<i>M. sloanei</i>	500	440,4	8,0
<i>H. courbaril</i>	500	330,3	7,1
<i>C. langsdorffii</i>	500	391,6	8,1

5.3. Preparação dos extratos protéicos

Os extratos de *A. integrifolia*, *A. incisa*, *A. hypogaea* e *R. communis*, foram preparados de acordo com a metodologia apresentada. Esses extratos foram aliquotados e armazenados em frascos de vidro em congelador para posterior uso em cromatografia de afinidade.

5.4. Cromatografias de afinidade

Para avaliar a interação lectina-polissacarídeo, os extratos protéicos obtidos (item 5.3) foram submetidos a cromatografias de afinidade em colunas montadas com matrizes de galactomananas de sementes de *A. pavonina*, *M. scabrella*, *D. mollis* e *S. barbatiman* e xiloglucanas de sementes de *C. langsdorffii*, *H. courbaril* e *M. sloanei*.

5.4.1. Interação da jacalina com galactomananas e xiloglucanas

Para avaliar a interação da jacalina, lectina D-galactose-ligante de *A. integrifolia*, com galactomananas e xiloglucanas, foram feitas cromatografias de afinidade utilizando-se colunas, cujas matrizes foram montadas com os polissacarídeos reticulados. Todas as colunas foram saturadas com lectina para garantir que a capacidade de retenção total da coluna fosse obtida. Os perfis cromatográficos obtidos estão ilustrados na figura 16.

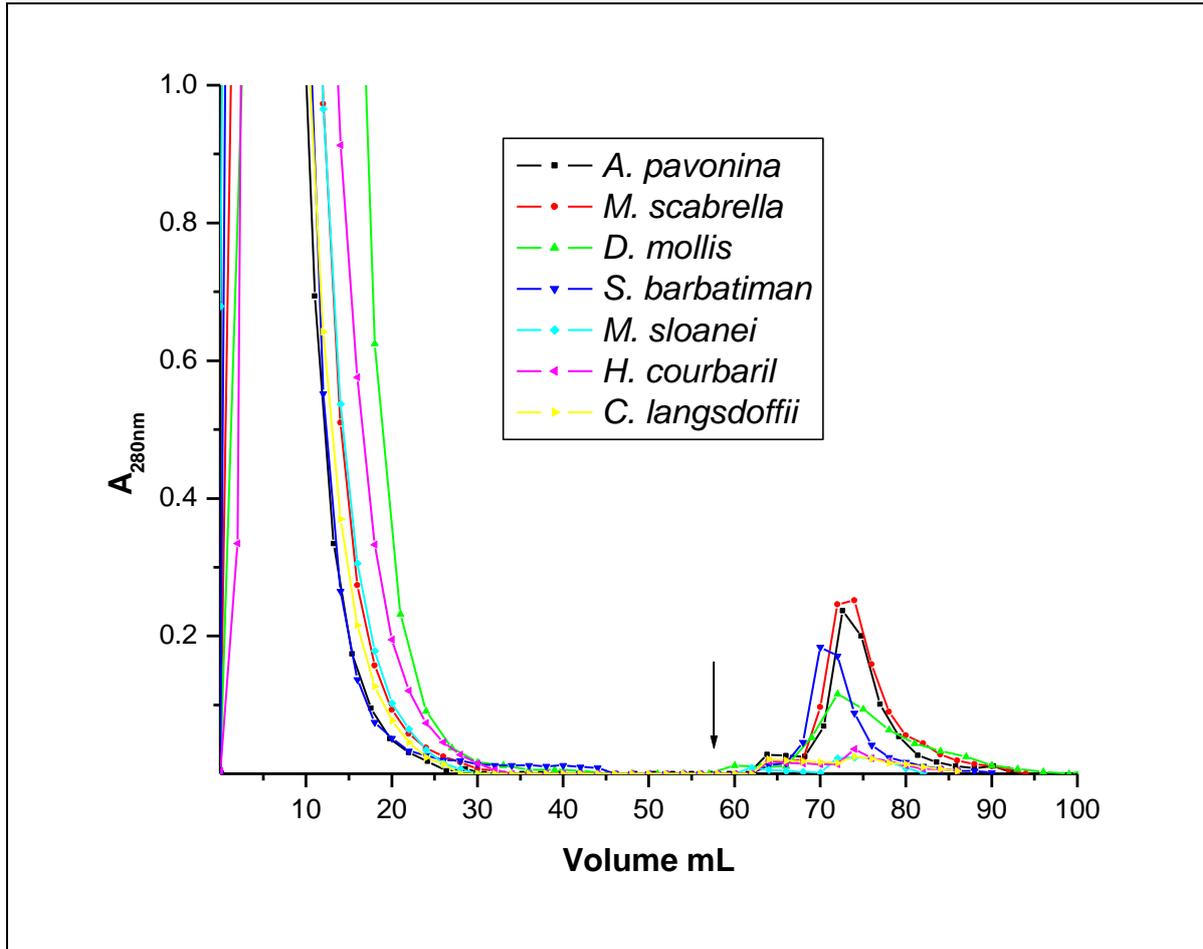


Figura 16 – Perfis cromatográficos da lectina de *A. integrifolia* (jaca) em colunas de galactomananas e xiloglucanas.

Foi realizada atividade hemaglutinante tanto do PI (fração não-retida do extrato), quanto do PII (jacalina). Além disso, amostras de todos os picos foram utilizadas em corridas eletroforéticas (SDS-PAGE). Por meio desses ensaios, pôde-se comprovar que as colunas estavam sendo realmente saturadas, pois na eletroforese das frações não retidas do extrato de *A. integrifolia* (Figura17), são observadas bandas de 15 e 18 kDa referentes à jacalina e estas mesmas frações foram capazes de aglutinar eritrócitos de coelho.

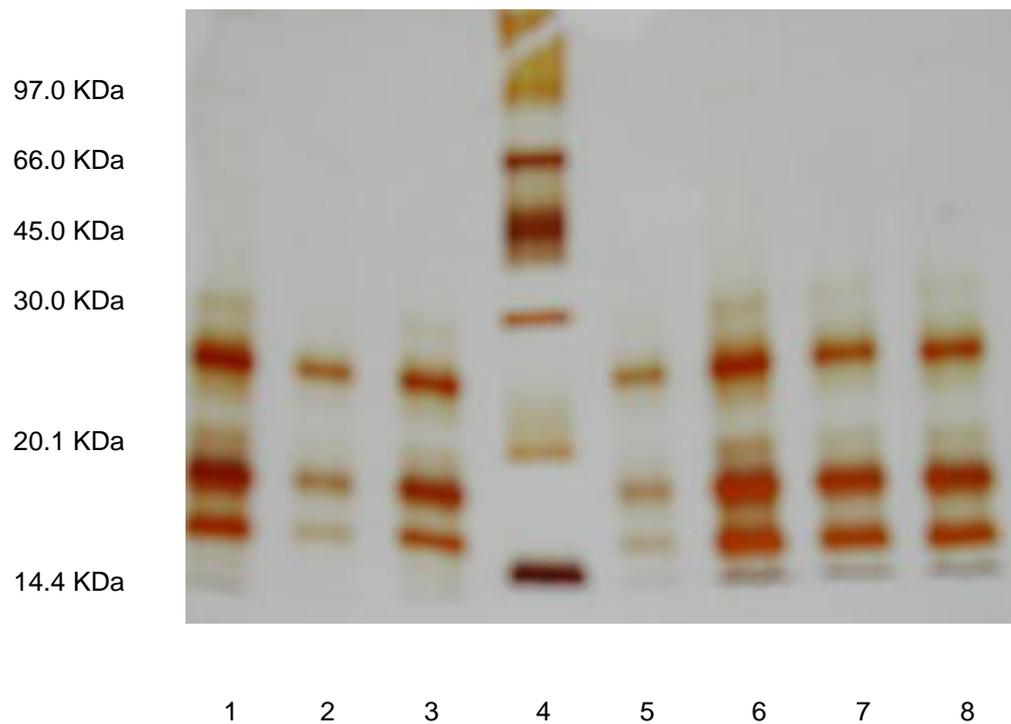


Figura 17 – Eletroforese (SDS-PAGE) das frações não-retidas (PI) do extrato total de *Artocarpus integrifolia*. Raias 1, 2 e 3 - 15 µg de PI em colunas de *A. pavonina*, *S. barbatiman* e *M. scabrella*; Raia 4 – Padrão de peso molecular; Raias 5, 6, 7 e 8 - 15 µg de PI em colunas de *D. mollis*, *C. langsdorffii*, *H. courbaril*, *M. sloanei*.

A partir dos dados obtidos com as cromatografias de afinidade (tabela 5 e figura 18), podemos observar que todas as galactomananas testadas foram capazes de reter muito bem a lectina de *A. integrifolia* com diferentes afinidades, em contraste com as xiloglucanas, com as quais a interação da jacalina foi extremamente baixa.

Tabela 5 - Massa retida de jacalina em matrizes cromatográficas de galactomananas e xiloglucanas.

Matriz	Massa da matriz após reticulação (mg)	Razão manose/galactose	Proporção Glc:Xyl:Gal	Massa de jacalina retida (mg) por massa de gel (g)
<i>M. scabrella</i>	286,2	1,1:1	-	6,24
<i>S. barbatiman</i>	358,1	1,5:1	-	2,90
<i>A. pavonina</i>	433,6	2,1:1	-	3,42
<i>D. mollis</i>	309,3	2,7:1	-	3,96
<i>M. sloanei</i>	440,4	-	1,8:1,7:1,0	0,46
<i>C. langsdorffii</i>	391,6	-	4:3,0:1,8	0,80
<i>H. courbaril</i>	330,3	-	4:3,4:1,2	0,93

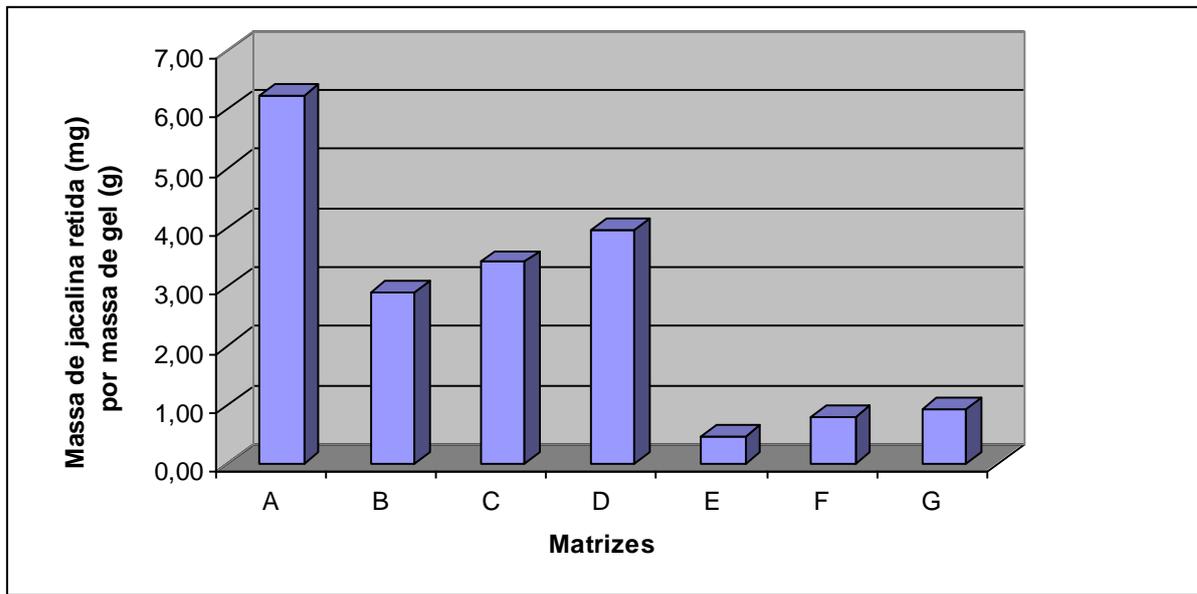


Figura 18 – Massa retida de jacalina (mg) em um grama de matriz de afinidade de galactomananas e xiloglucanas. Matrizes das colunas cromatográficas utilizadas: *Mimosa scabrella* (A), *Stryphnodendron barbatiman* (B), *Adenanthera pavonina* (C), *Dimorphandra mollis* (D), *Mucuna sloanei* (E), *Copaifera langsdorffii* (F), *Hymenaea courbaril* (G).

Segundo Jeyaprakash e colaboradores (2003), em complexos com monossacarídeos, o sítio primário de ligação da jacalina fica ocupado por galactose, N-acetil-galactosamina ou manose, com o átomo de carbono anomérico apontando em direção ao sítio secundário A. Em resíduos α -substituídos, esse arranjo não é danificado. De acordo com esses autores, os açúcares α -substituídos interagem primariamente de forma hidrofóbica com o sítio secundário A, que possui geometria variável. Na presença do grupo α -ligado, a cadeia da Tyr122 move-se para acomodar o grupo, criando um sulco envolvendo as cadeias laterais da Tyr78 e Tyr122, e o grupo α -ligado aninha-se entre as cadeias laterais de Tyr78, Tyr122 e Trp123. Porém, resíduos β -substituídos levam a uma colisão estérica inaceitável com a proteína. Por isso, em dissacarídeos β -substituídos, o açúcar redutor liga-se ao sítio primário com a extremidade não-redutora localizada no sítio secundário B. A Figura 11 (na introdução) mostra a disposição de substituintes α e β no sítio ligante da jacalina. A partir daí, podemos concluir que a afinidade da jacalina é muitas ordens de magnitude maior por resíduos de galactose α -ligados do que por resíduos β -ligados. Esses resultados podem ser evidências da pouca afinidade da jacalina pelas matrizes de xiloglucana. Segundo esses autores, a natureza das ligações determina o modo de associação do açúcar com a jacalina.

A razão manose/galactose de cada uma das galactomananas, de acordo com a literatura, está descrita na tabela abaixo. Essa grande variação na relação manose/galactose das galactomananas tem uma aplicação muito interessante dessas gomas como matrizes cromatográficas para o isolamento de lectinas.

Tabela 6 – Razão manose/galactose das galactomananas utilizadas.

<i>Semente</i>	<i>Razão manose/galactose de galactomananas</i>
<i>M. scabrella</i>	1,1:1,0 (YORK <i>et al.</i> , 1990)
<i>S. barbatiman</i>	1,5:1,0 (GANTER <i>et al.</i> , 1993)
<i>A. pavonina</i>	2,1:1,0 (TAVARES, 1998)
<i>D. mollis</i>	2,7:1,0 (PANEGASSI <i>et al.</i> , 2000)

A estrutura clássica de galactomananas, descrita por Dea e Morrison (1975), consiste de cadeias poliméricas de resíduos β -D-manopiranosil (1 \rightarrow 4) ligados, substituídos em O-6 por unidades de α -D-galactopiranosil. Essas gomas, embora mostrem estruturas básicas bastante similares, podem ter estruturas finas diferentes, levando em consideração o padrão de distribuição das cadeias laterais. Essa estrutura fina pode ser resolvida somente por espectroscopia de ressonância magnética, difração de raios-X e estudos enzimáticos (SRIVASTAVA & KAPOOR, 2005).

Apesar da razão manose/galactose das galactomananas de *M. scabrella* e *S. barbatiman* serem as mais próximas dentre as matrizes testadas, percebe-se que, enquanto a matriz de *M. scabrella* apresentou a retenção da maior massa de jacalina dentre as galactomananas, *S. barbatiman* mostrou-se como a matriz que interage menos com essa lectina.

Ganter e colaboradores (1995) estudaram a distribuição de D-galactose ao longo do esqueleto de D-manana de *M. scabrella* e *S. barbatiman* por meio da caracterização da estrutura dos oligossacarídeos formados no processo de hidrólise parcial levemente ácida. Através desse método, ocorre uma menor liberação de monossacarídeos e uma produção máxima (rendimento maior que 80%) de oligossacarídeos. Na comparação do percentual de oligossacarídeos obtidos dessas duas galactomananas, foi possível observar que, dos dissacarídeos formados (G-M e M-M), *M. scabrella* apresentou 61,5% de dissacarídeos galactosilados (G-M), enquanto *S. barbatiman*, apenas 30,6%. Dos três trissacarídeos

obtidos, o percentual de maior galactosilação foi maior nos trissacarídeos de *M. scabrella*, enquanto o trissacarídeo manotriose (M-M-M) foi bem representativo (31,4%) em *S. barbatiman*. Os demais oligossacarídeos (com 4, 5 e 6 unidades) sempre apresentaram polímeros não-galactosilados em maior percentual na galactomanana de *S. barbatiman*.

Percebe-se, portanto, que a proporção de galactose para manose na galactomanana de *M. scabrella* é quase a mesma, o que faz com que, praticamente todo o polímero seja ramificado. Isso favoreceu a interação da matriz de mimosa com a jacalina. Por outro lado, as ramificações encontram-se bem mais espaçadas na galactomanana de *S. barbatiman*. Essa distribuição bastante irregular dos resíduos de D-galactose na galactomanana de *S. barbatiman* pode ser o motivo de uma interação fraca da matriz desse polímero com a jacalina. Outros fatores podem ser sugeridos como responsáveis pelo resultado obtido. Durante a reação do polissacarídeo com epícloridrina, por exemplo, na formação das ligações cruzadas, os resíduos de D-galactose nessa goma talvez sejam mais facilmente “escondidos” dentro da rede formada, não estando tão expostos quanto nas demais galactomananas. Dessa forma, ocorre impedimento estérico e o sítio da lectina interage menos com a matriz. Outro motivo seria, simplesmente, uma melhor distribuição dos resíduos nas galactomananas de *A. pavonina* e *D. mollis*, que tiveram uma capacidade de retenção da jacalina maior que a galactomanana de *S. barbatiman*, sendo necessários estudos posteriores para verificar como a distribuição dos resíduos de galactose estão presentes no gel formado pelas galactomananas dessas duas sementes.

Para comprovar a pureza da lectina isolada em todas as cromatografias, foi realizada eletroforese (em condições desnaturantes) das frações retidas nas matrizes. Podemos observar que as matrizes de galactomananas foram eficientes no isolamento da lectina de *A. integriflora*, visto que a banda referente ao peso molecular da jacalina aparece no gel livre de contaminantes (figura 19). Essas frações também mostraram-se ativas, pois foram capazes de aglutinar eritrócitos de coelho. Uma comprovação da baixa interação da jacalina com as colunas de xiloglucanas é que nenhuma banda apareceu na eletroforese (resultado não mostrado), embora fossem capazes de causar uma fraca hemaglutinação.

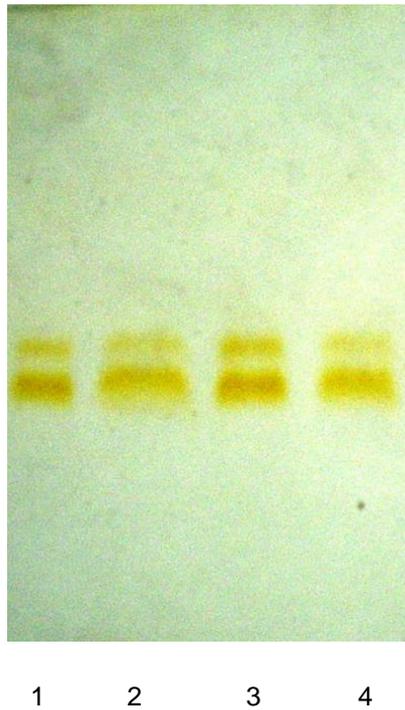


Figura 19 - Eletroforese (SDS-PAGE) das frações retidas do extrato total de *A. integrifolia*. Raias 1, 2, 3, 4– 0,7 µg de pico 2 em columnas de *S.barbatiman*, *A. pavonina*, *M. scabrella*, *D. mollis*.

5.4.2. Interação da futralina com galactomananas e xiloglucanas

Para avaliar a interação da futralina, lectina D-galactose-ligante de *A. incisa*, com galactomananas e xiloglucanas, foram feitas cromatografias de afinidade utilizando-se as mesmas matrizes de galactomananas e xiloglucanas. A futralina, como descrito na literatura (MOREIRA *et al.*, 1998), possui a estrutura muito semelhante à da jacalina e, de acordo com os resultados obtidos, apresentou perfis cromatográficos muito semelhantes aos dessa lectina (Figura 20).

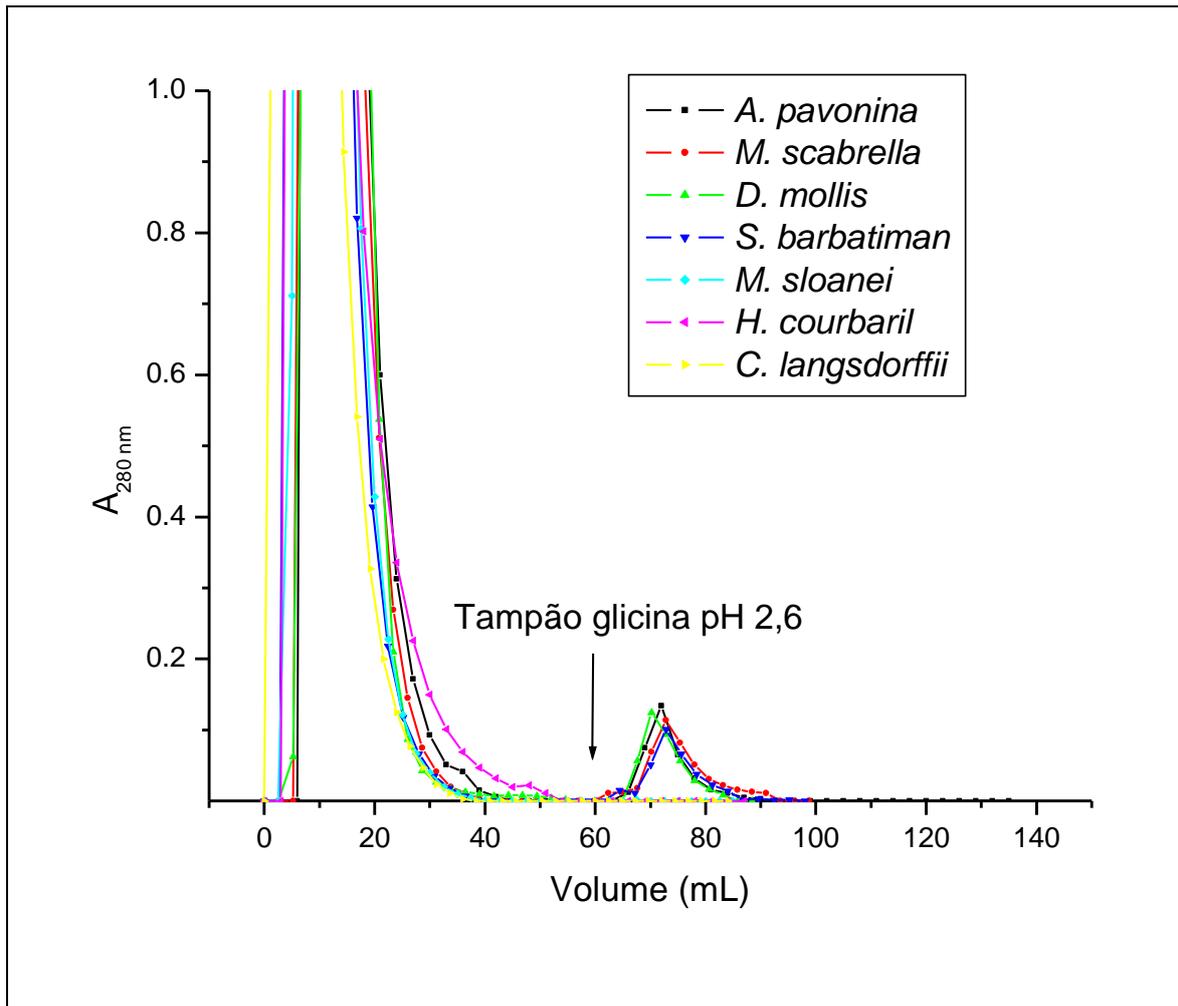


Figura 20 – Perfis cromatográficos da lectina de *A. incisa* (fruta-pão) em colunas de galactomananas e xiloglucanas.

Fazendo um comparativo entre as interações da jacalina e da frutalina com as matrizes (tabela 7 e figura 21), pode-se verificar perfis de retenção bem semelhantes para essas lectinas, embora a jacalina tenha apresentado maior afinidade que a de frutalina em todas as matrizes de galactomananas, principalmente em relação à matriz de *M. scabrella*. A frutalina, no entanto, não interagiu de forma alguma com as xiloglucanas, não ficando retida em nenhuma dessas colunas.

Por meio de SDS-PAGE a partir das frações não-retidas (PI) do extrato de *A. incisa* nas matrizes cromatográficas de galactomananas e xiloglucanas, comprova-se a saturação dessas matrizes (Figura 22), como fica claro pela observação das bandas referentes à frutalina (12 e 15, 5 kDa) no gel.

Tabela 7 – Massa de lectina (jacalina e frutalina) retida (mg) por um grama de gel nas colunas de galactomananas e xiloglucanas.

Matriz	Massa da matriz após reticulação (mg)	Massa de jacalina retida (mg) por massa de gel (g)	Massa de frutalina retida (mg) por massa de gel (g)
<i>M. scabrella</i>	286,2	6,24	3,81
<i>S. barbatiman</i>	358,1	2,90	2,38
<i>A. pavonina</i>	433,6	3,42	2,28
<i>D. mollis</i>	309,3	3,96	3,04
<i>M. sloanei</i>	440,4	0,46	0
<i>C. langsdorffii</i>	391,6	0,80	0
<i>H. courbaril</i>	330,3	0,93	0

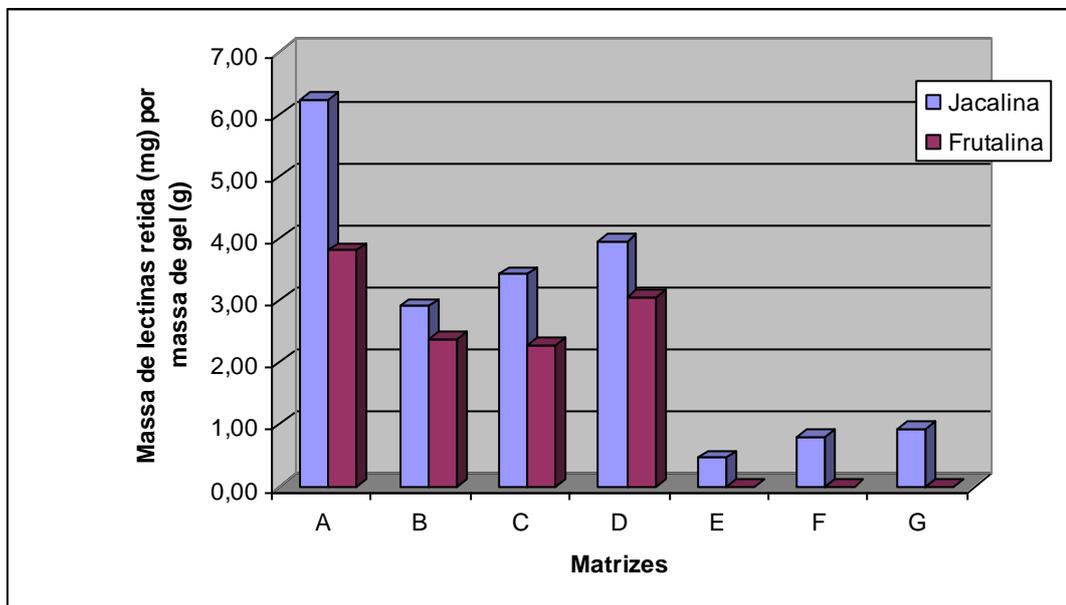


Figura 21 – Análise comparativa da retenção das lectinas de *A. integrifolia* e *A. incisa* em colunas de galactomananas e xiloglucanas. Matrizes das colunas cromatográficas utilizadas: *Mimosa scabrella* (A), *Stryphnodendron barbatiman* (B), *Adenanthera pavonina* (C), *Dimorphandra mollis* (D), *Mucuna sloanei* (E), *Copaifera langsdorffii* (F), *Hymenaea courbaril* (G).

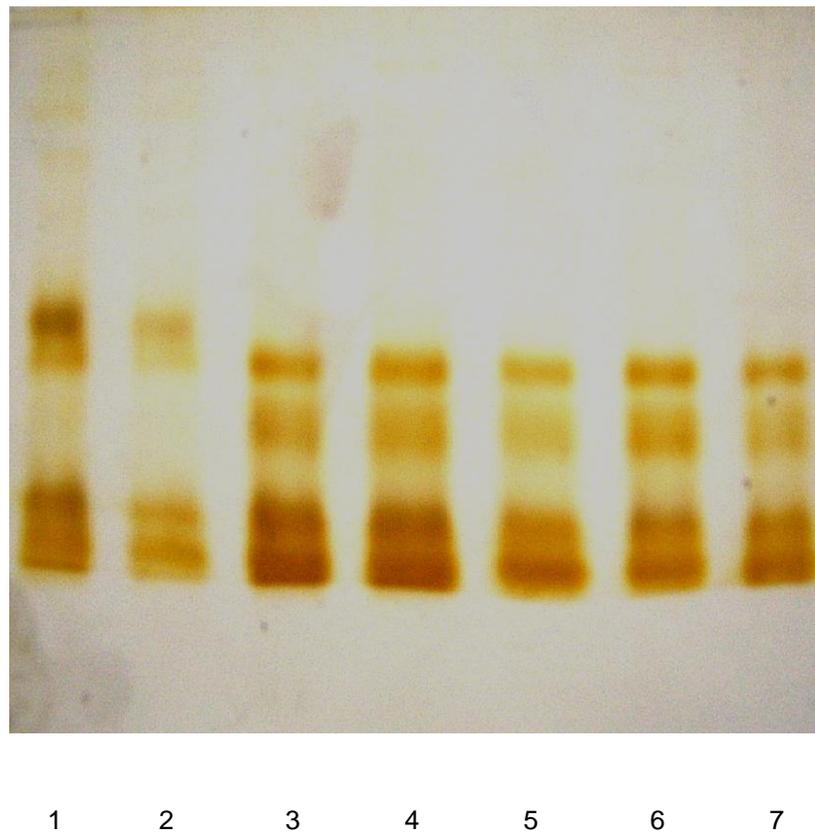


Figura 22 - Eletroforese (SDS-PAGE) da fração não-retida (PI) do extrato total de *A. incisa*. Raias 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 - 1 μ g de PI, em tampão de amostra sem β -mercaptoetanol, das cromatografias em colunas de *A. pavonina*; *S. barbatiman*, *M. scabrella*, *D. mollis*, *C. langsdorffii*, *H. courbaril* e *M. sloanei*.

Na figura 23, pode-se observar a pureza da frutalina retida nas matrizes de galactomananas, pois as bandas referentes à lectina aparecem livres de contaminantes. As frações referentes a PII das matrizes de xiloglucana não mostraram banda alguma no gel (resultado não ilustrado).

Com o objetivo de comprovar a integridade da frutalina obtida em cada coluna, foi realizado o ensaio de atividade hemaglutinante, e, dessa forma, foi possível observar que todas as frações referentes a PII das colunas de galactomananas estavam ativas.

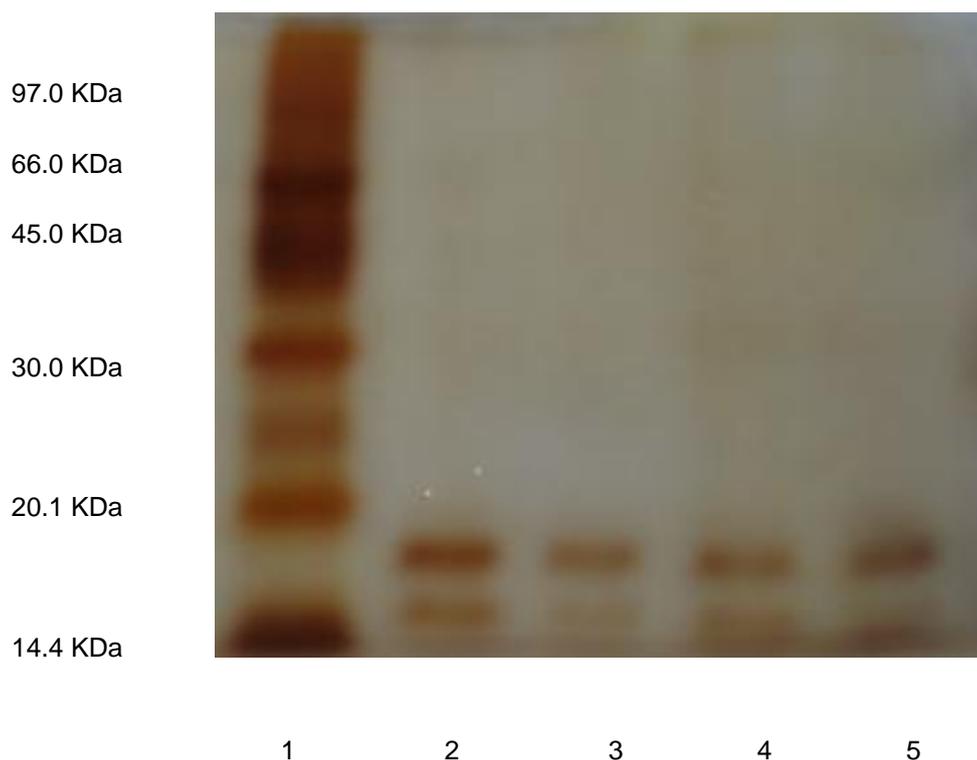


Figura 23 - Eletroforese (SDS-PAGE) da fração retida do extrato total de *A. incisa*. Raia 1 – padrão de peso molecular; Raias 2, 3, 4 e 5 – 3,5 µg de PII, em tampão de amostra sem β-mercaptoetanol, das cromatografias em colunas de *A. pavonina*; *S. barbatiman*, *M. scabrella* e *D. mollis*.

5.4.3. Interação da ricina com galactomananas e xiloglucanas

Para avaliar a interação da ricina, lectina D-galactose-ligante de *R. communis*, com galactomananas e xiloglucanas, foram feitas cromatografias de afinidade utilizando-se colunas de galactomananas e xiloglucanas.

As sementes de *Ricinus communis* possuem duas diferentes lectinas estruturalmente relacionadas: ricina, uma forte citotoxina e fraca hemaglutinina; e a aglutinina de ricinus (NICOLSON *et al.*, 1974). Essas proteínas apresentam 93% de similaridade de seqüência entre as suas cadeias A e 84% de similaridade entre as cadeias B (ROBERTS *et al.*, 1985).

O domínio lectínico da ricina tem preferência pelo anômero β da galactose nos terminais não-redutores de oligossacarídeos com a ordem de afinidade: galactose $\beta(1-4)$ ligada \geq galactose $\beta(1-3)$ ligada $>$ galactose $\beta(1-6)$ ligada (WU *et al.*, 2006). Dessa forma, quando a interação da lectina com cada uma das colunas foi analisada, os resultados foram condizentes com a literatura, uma vez que, de forma geral, houve uma maior interação da ricina com xiloglucanas que com galactomananas.

Analisando as figuras 24 e 25 e a tabela 8, podemos observar que, das colunas de xiloglucanas, apenas a de *H. courbaril* não interagiu tão fortemente, de forma que todas as galactomananas, com exceção da galactomanana de *S. barbatiman*, cuja baixa eficiência na retenção já foi anteriormente discutida para jacalina e frutalina, tiveram uma melhor capacidade de retenção da ricina.

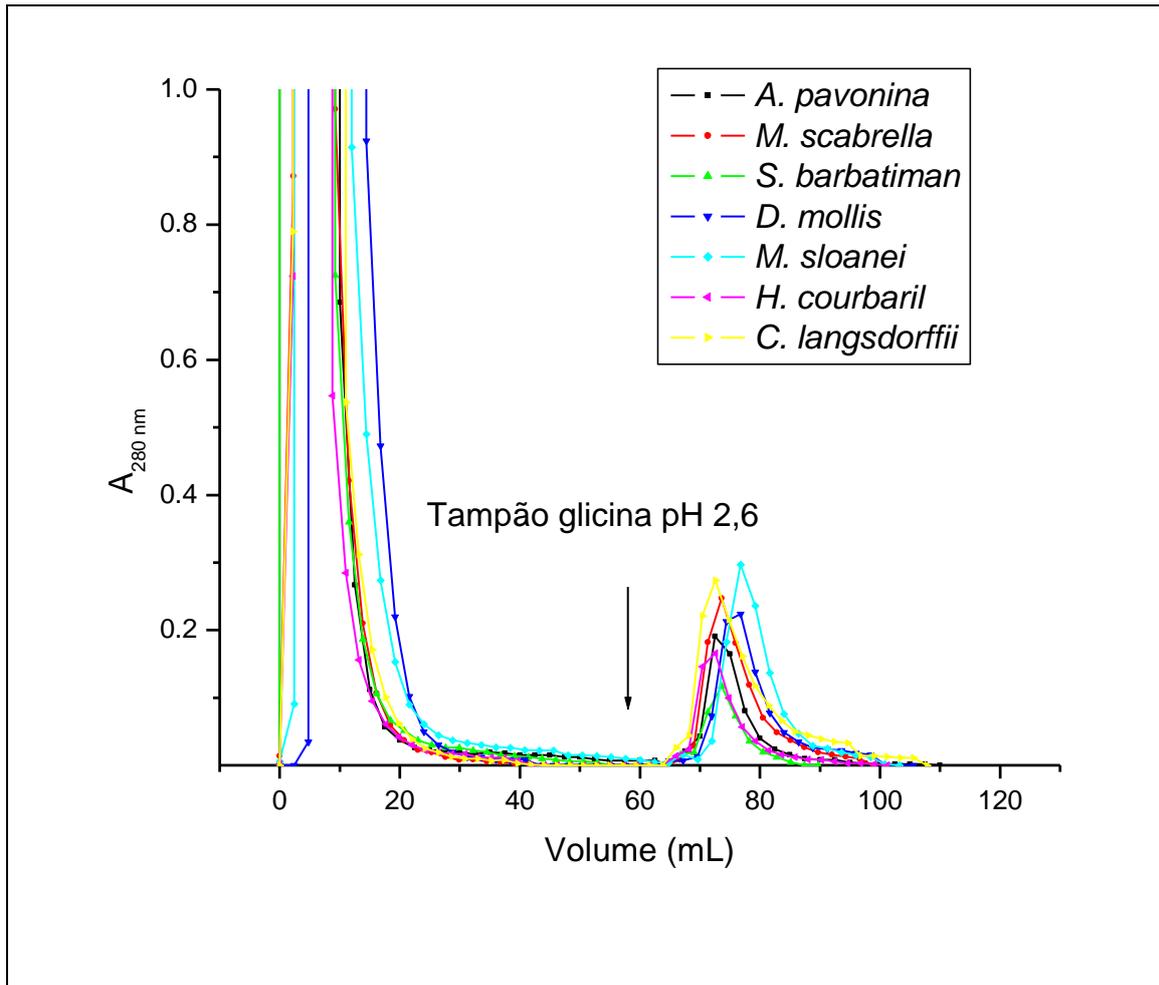


Figura 24 – Perfis cromatográficos da lectina de *Ricinus communis* (ricina) em colunas de galactomananas e xiloglucanas.

Tabela 8 – Massa de ricina retida nas matrizes de galactomananas e xiloglucanas.

Matriz	Massa da matriz após reticulação (mg)	Razão manose/galactose	Proporção Glc:Xyl:Gal	Massa de ricina retida (mg) por massa de gel (g)
<i>M. scabrella</i>	363,5	1,1:1	-	5,51
<i>S. barbatiman</i>	430,2	1,5:1	-	1,74
<i>A. pavonina</i>	429,1	2,1:1	-	3,13
<i>D. mollis</i>	295,2	2,7:1	-	6,64
<i>M. sloanei</i>	457,8	-	1,8:1,7:1,0	5,21
<i>C. langsdorffii</i>	438,2	-	4:3,0:1,8	6,43
<i>H. courbaril</i>	463,1	-	4:3,4:1,2	2,56

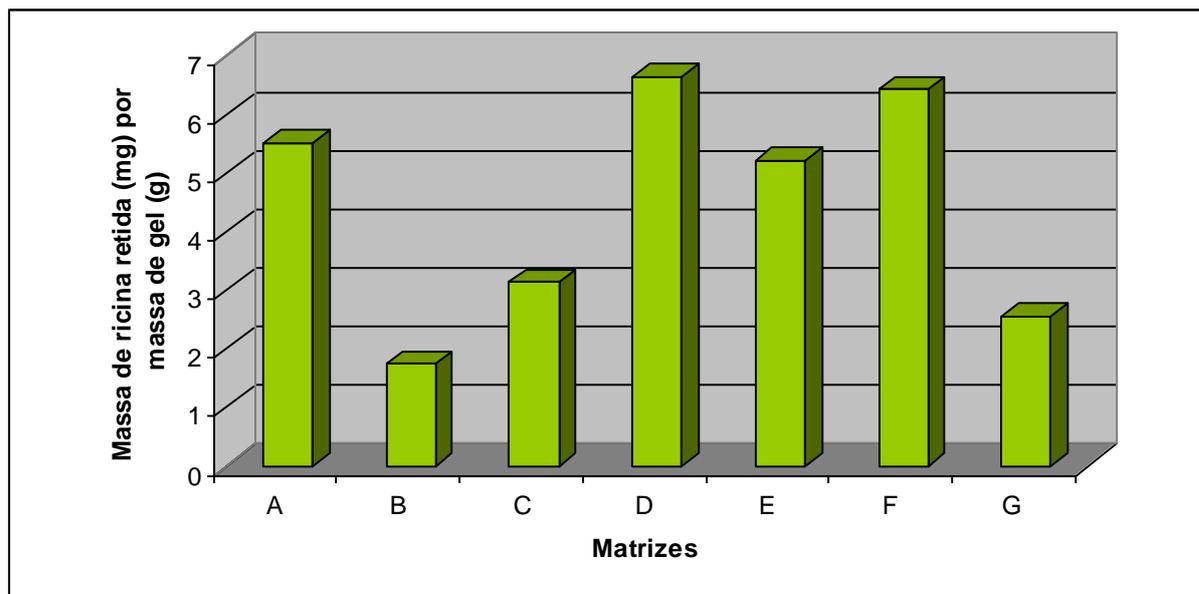


Figura 25 – Massa de ricina retida nas matrizes cromatográficas de galactomananas e xiloglucanas. Matrizes das colunas cromatográficas utilizadas: *Mimosa scabrella* (A), *Stryphnodendron barbatiman* (B), *Adenanthera pavonina* (C), *Dimorphandra mollis* (D), *Mucuna sloanei* (E), *Copaifera langsdorffii* (F), *Hymenaea courbaril* (G).

Oliveira Júnior e colaboradores (2006), estudando a hidrólise da xiloglucana de copaíba (*C. langsdorffii* Desf.) com celulase e analisando os oligossacarídeos obtidos por cromatografia líquida de alta resolução, concluíram que os oligossacarídeos extraídos dessa xiloglucana são predominantemente galactosilados (XLLG), e a proporção Glc:Xyl:Gal é de 4:3,0:1,8. Segundo Teixeira (2005), a proporção Glc:Xyl:Gal na xiloglucana de *M. sloanei* é

de 1,8:1,7:1,0 e os percentuais de oligossacarídeos XLLG e XXLG nessa xiloglucana são maiores que os encontrados em *C. langsdorffii*, embora o percentual de XLXG tenha sido menor.

Embora o número de resíduos de galactose seja menor na xiloglucana de copaíba do que na xiloglucana de mucuna, a matriz de copaíba foi capaz de interagir melhor com a ricina do que a matriz de mucuna, apresentando maior massa retida da lectina. Dessa forma, sugere-se que os resíduos de β -D-galactose, embora estejam presentes em menor número, estejam distribuídos de uma maneira mais espaçada no polissacarídeo de *C. langsdorffii*, permitindo uma interação maior com a ricina.

A coluna de *Hymenaea courbaril* interagiu muito pouco com a lectina de *R. communis*, em relação às demais colunas de xiloglucana. Sua capacidade de retenção, inclusive, foi menor que a das galactomananas de *Mimosa scabrella*, *Dimorphandra mollis* e *Adenanthera pavonina*. A proporção Glc-Xyl-Gal no polissacarídeo de jatobá é de 4:3,4:1,2 (BUCKERIDGE *et al.*, 1990), inferior às dos polissacarídeos de copaíba e mucuna. Além desse menor conteúdo de cadeias laterais constituídas por resíduos de β -D-galactose, Tiné e colaboradores (2006) mostraram que a distribuição desses resíduos ao redor da cadeia principal de glucose não é muito uniforme.

Através de eletroforese em gel de poliacrilamida, utilizando como amostras as frações não retidas do extrato de *R. communis* nas matrizes cromatográficas, podemos verificar que as colunas foram realmente saturadas, devido à apresentação da banda referente à ricina (aproximadamente 66 kDa) no gel, como pode ser visto na figura 26.

Porém, no que se refere à fração retida (PII) em todas as cromatografias, verificou-se que somente esse passo cromatográfico foi insuficiente para o fornecimento da ricina totalmente pura. Esse fato pode ser confirmado porque, nos géis ilustrados nas figuras 27 e 28, uma banda superior (topo do gel) corresponde à aglutinina de ricinus. Segundo Olsnes e colaboradores (1974), essa é uma forma de determinar a contaminação da amostra com a aglutinina de ricinus, uma vez que a banda correspondente à aglutinina não se move no gel, quando na ausência de β -mercaptoetanol. Na presença desse agente redutor, a aglutinina de ricinus separa-se em bandas correspondentes ao peso de 31 e 34 kDa, mas, nesse caso, essas bandas se confundem com as bandas da ricina, que possuem pesos moleculares aproximados (32 e 34 kDa).

Além disso, a atividade hemaglutinante, ilustrada na tabela 9, revelou valores muito altos. Como se sabe, a aglutinina de ricinus é responsável por essa maior aglutinação, visto que a ricina tem baixa capacidade de aglutinar células. A aglutinina de ricinus, no entanto, é

capaz de aglutinar eritrócitos espontaneamente, mesmo em baixas concentrações (OLSNES *et al.*, 1974).

A banda referente à ricina na ausência (~64 kDa) ou presença de β -mercaptoetanol (32 kDa, referente à cadeia A e 34 kDa, referente à cadeia B) é notável nos géis das figuras 27 e 28 e a presença e integridade da ricina nas amostras obtidas foram confirmadas por meio de atividade tóxica intraperitoneal em camundongos da raça swiss ($DL_{50}=8 \mu\text{g}/\text{kg}$), onde as frações retidas em todas as matrizes cromatográficas mostraram-se tóxicas.

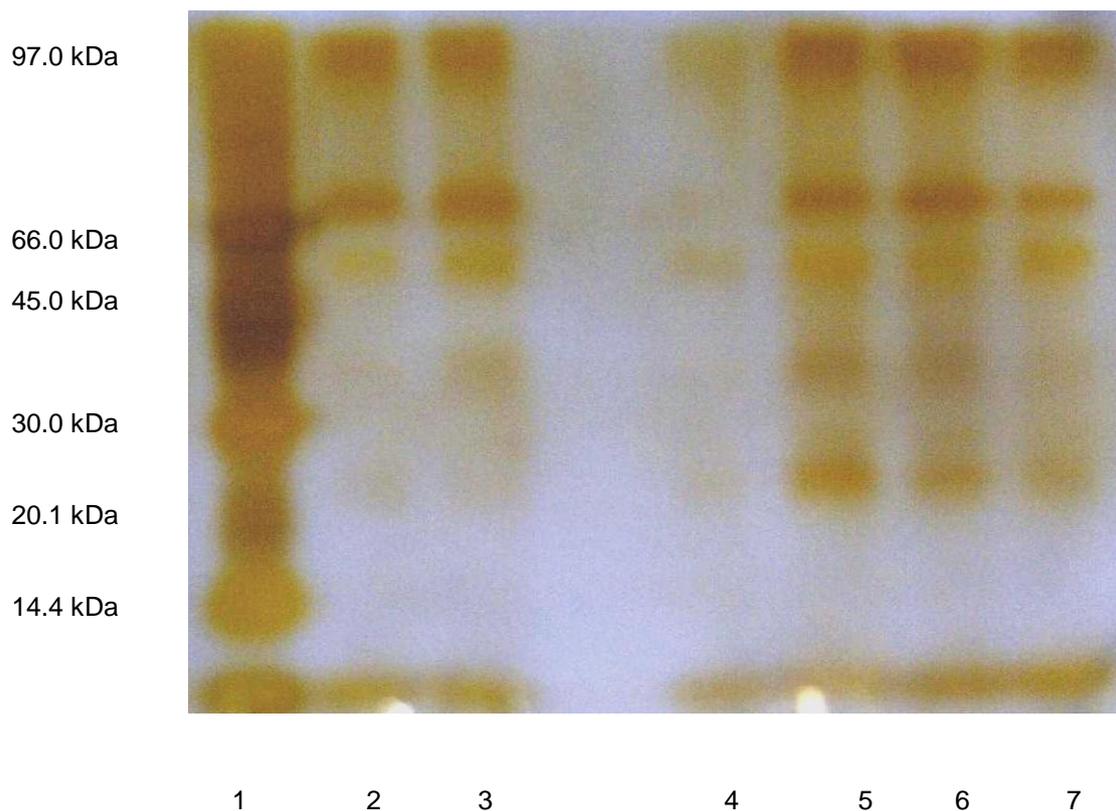


Figura 26 - Eletroforese (SDS-PAGE) da fração não-retida (PI) do extrato total de *Ricinus communis*. Raia 1 – Marcador de peso molecular; Raias 2, 3, 4 - 2 μg de PI em colunas de *A. pavonina*, *S. barbatiman*, *M. scabrella*, *C. langsdorffii*, *H. courbaril* e *M. sloanei*.

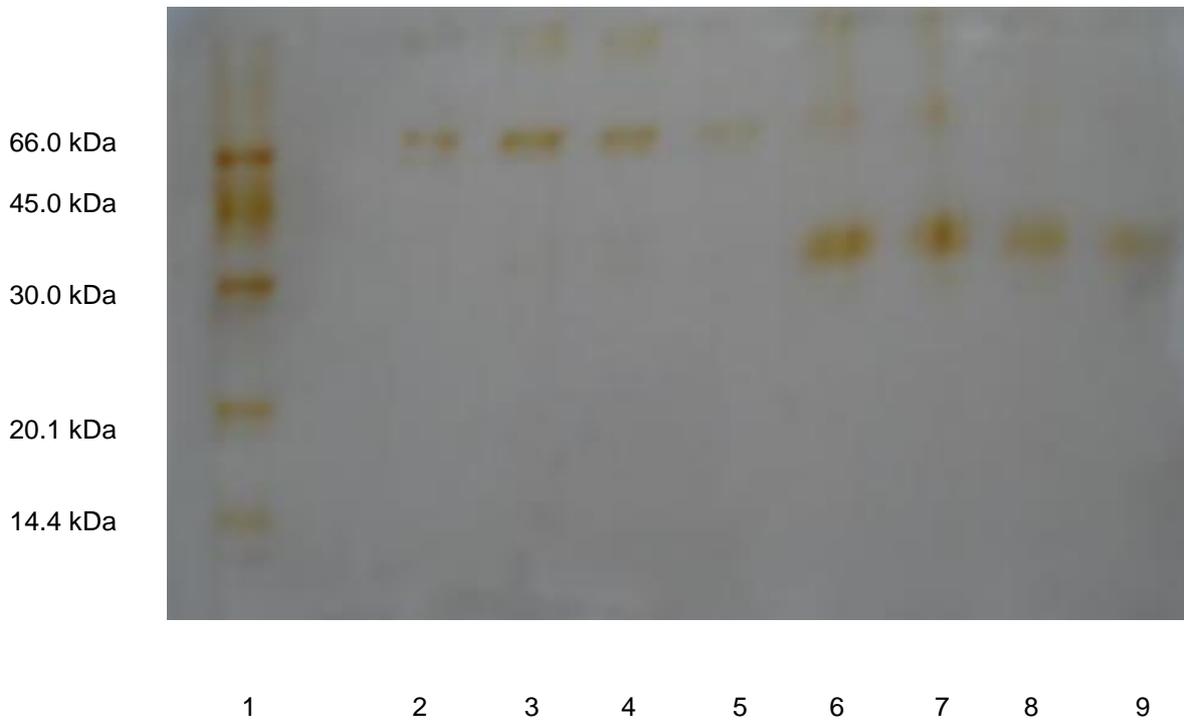


Figura 27 - Eletroforese (SDS-PAGE) da fração retida (PII) do extrato total de *Ricinus communis*. Raia 1- Marcador de peso molecular; Raias 2, 3, 4 e 5 - 2 μ g de PII, em tampão de amostra sem β -mercaptoetanol, das colunas de *A. pavonina*, *M. sacabrella*, *D. mollis* e *S. barbatiman*. Raias 6, 7, 8 e 9 as mesmas amostras anteriores em tampão de amostra contendo β -mercaptoetanol.

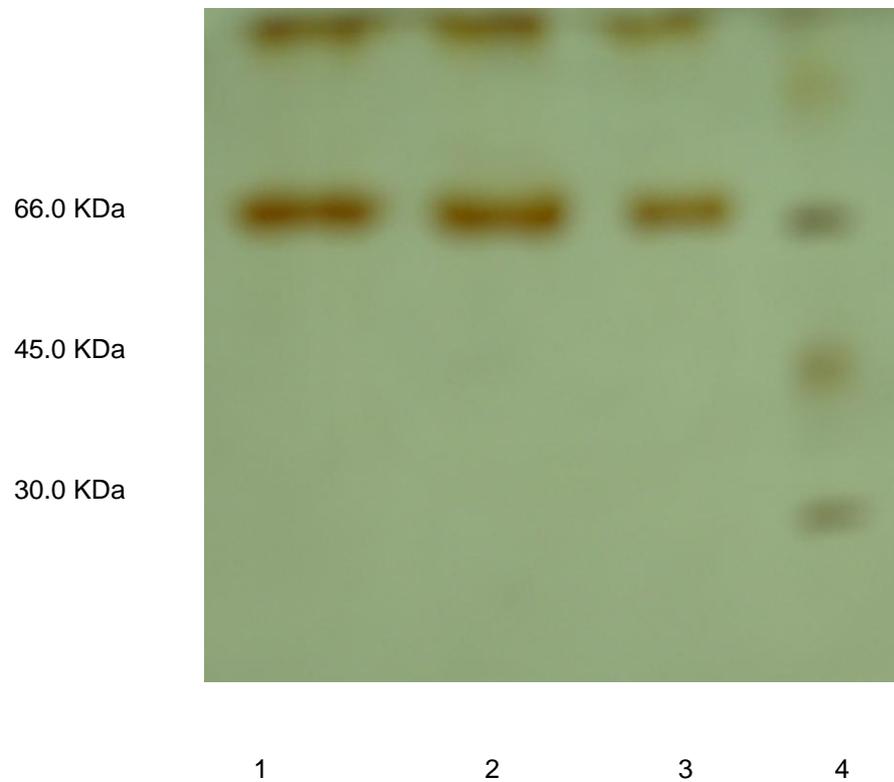


Figura 28 - Eletroforese (SDS-PAGE) da fração retida (PII) do extrato total de *Ricinus communis*. Raias 1, 2 e 3, - 2 µg de (PII) em tampão de amostra sem β-mercaptoetanol das colunas de *C. langsdorffii*, *M. sloanei* e *H. courbaril*. Raia 4 - Marcador de peso molecular.

Tabela 9 – Atividade hemaglutinante da fração retida (PII) de *R. communis* em matrizes de xiloglucanas e galactomananas.

<i>Matriz</i>	<i>Tubo maior absorbância</i>	<i>UH</i>
<i>A. pavonina</i>	0,191	387,8
<i>M. scabrella</i>	0,247	299,1
<i>S. barbatiman</i>	0,117	316,8
<i>D. mollis</i>	0,224	329,9
<i>Jatobá</i>	0,166	444,4
<i>Copaíba</i>	0,274	270,0
<i>Mucuna</i>	0,297	996,1

5.4.4. Interação da aglutinina de *Arachis hypogaea* com galactomananas e xiloglucanas

Para avaliar a interação da PNA, lectina D-galactose-ligante de *A. hypogaea*, com galactomananas e xiloglucanas, foram feitas cromatografias de afinidade. Por meio das cromatografias realizadas, observou-se que a lectina de *A. hypogaea* interage fracamente tanto com as matrizes cromatográficas de galactomananas quanto com as de xiloglucanas. Os perfis cromatográficos da PNA estão ilustrados na figura 29.

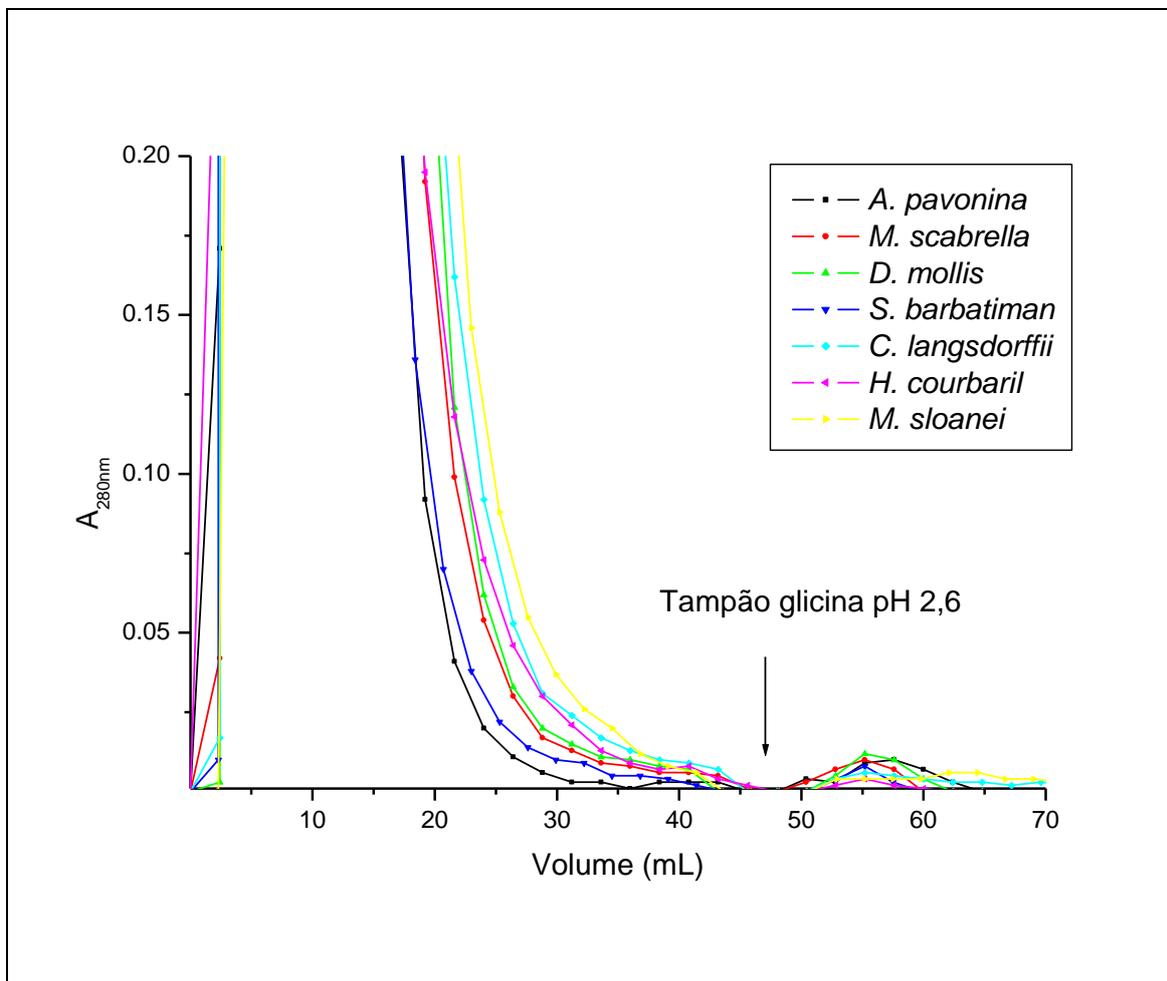


Figura 29 – Perfis cromatográficos da lectina de *Arachis hypogaea* (amendoim) em colunas de galactomananas e xiloglucanas.

Lotan e colaboradores (1975) investigaram a afinidade da PNA por meio de inibição da atividade hemaglutinante por açúcares. Segundo esses autores, entre os galactosídeos que diferem somente quanto à configuração anomérica do C-1, parece haver uma leve preferência pelos anômeros α , exceto para a melibiose, que é menos ativa que a lactose e a galactose. Esses autores relataram, ainda que para essa lectina, a configuração do C-4 é muito importante para a ligação, uma vez que não houve afinidade por glucose, e que a hidroxila livre em C-6 também é um requerimento para a ligação. A observação de que o dissacarídeo Gal β (1 \rightarrow 3)GalNAc inibiu muito melhor a hemaglutinação que a galactose, sugere, segundo esses autores, que a aglutinina reconheça todo o polímero, o que indica que essa lectina possui um sítio de combinação extenso.

A partir da tabela 10 e da figura 30, que descrevem a massa retida da lectina de *A. hypogaea* (mg) por grama de gel (g), podemos verificar que, não existe uma interação maior dessa lectina por galactomananas ou xiloglucanas, isto é, a PNA foi capaz de interagir indistintamente com os dois polímeros. Devido aos valores de massa retida serem muito pequenos, não é possível afirmar exatamente com qual matriz houve uma maior interação. O fato de a PNA ser uma proteína maior (110 kDa) que as demais e, ainda, de ela possuir um sítio de ligação extenso, característica não relatada para as demais lectinas utilizadas, podem ser características importantes para a interação dessa lectina com os polissacarídeos.

Tabela 10 – Massa retida da lectina de *A. hypogaea* nas matrizes cromatográficas de galactomananas e xiloglucanas.

Matriz	Massa da matriz após reticulação (mg)	Razão manose/galactose	Proporção Glc:Xyl:Gal	Massa de PNA retida (mg) por massa de gel (g)
<i>M. scabrella</i>	363,5	1,1:1	-	0,23
<i>S. barbatiman</i>	430,2	1,5:1	-	0,10
<i>A. pavonina</i>	429,1	2,1:1	-	0,26
<i>D. mollis</i>	295,2	2,7:1	-	0,33
<i>M. sloanei</i>	457,8	-	1,8:1,7:1,0	0,25
<i>C. langsдорffii</i>	438,2	-	4:3,0:1,8	0,23
<i>H. courbaril</i>	463,1	-	4:3,4:1,2	0,06

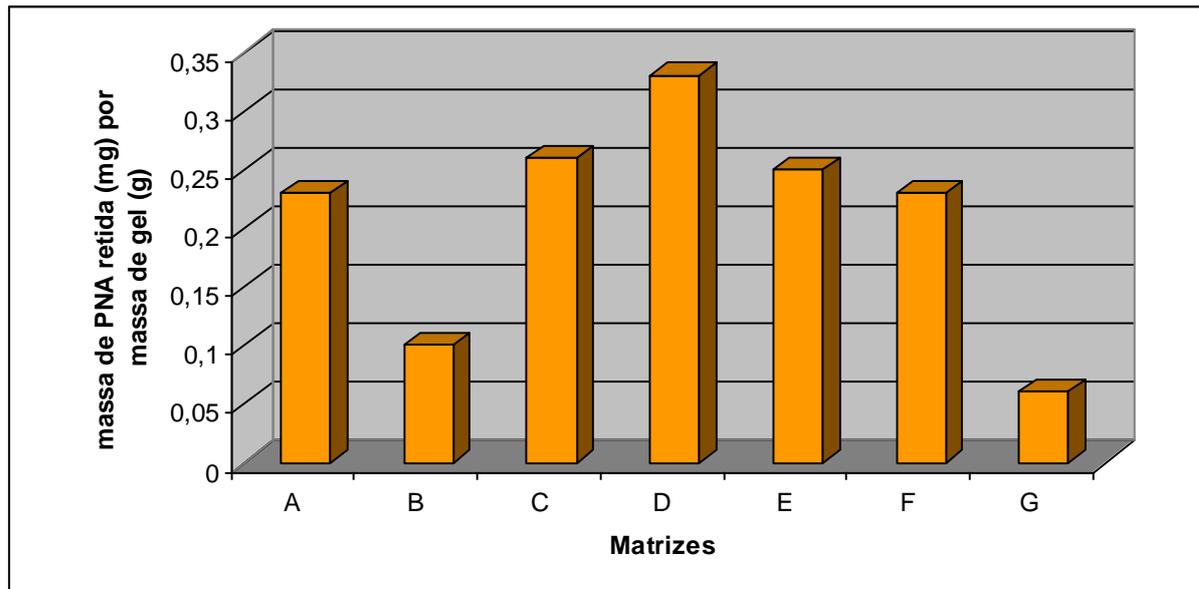


Figura 30 – Massa retida da lectina de *A. hypogaea* nas matrizes cromatográficas de galactomananas e xiloglucanas. Matrizes das colunas cromatográficas utilizadas: *Mimosa scabrella* (A), *Stryphnodendron barbatiman* (B), *Adenantha pavonina* (C), *Dimorphandra mollis* (D), *Mucuna sloanei* (E), *Copaifera langsdorffii* (F), *Hymenaea courbaril* (G).

A figura 31 ilustra que a capacidade de retenção máxima das colunas foi utilizada, visto que a banda referente à PNA pode ser vista nas frações não retidas (PI) do extrato de *A. hypogaea*.

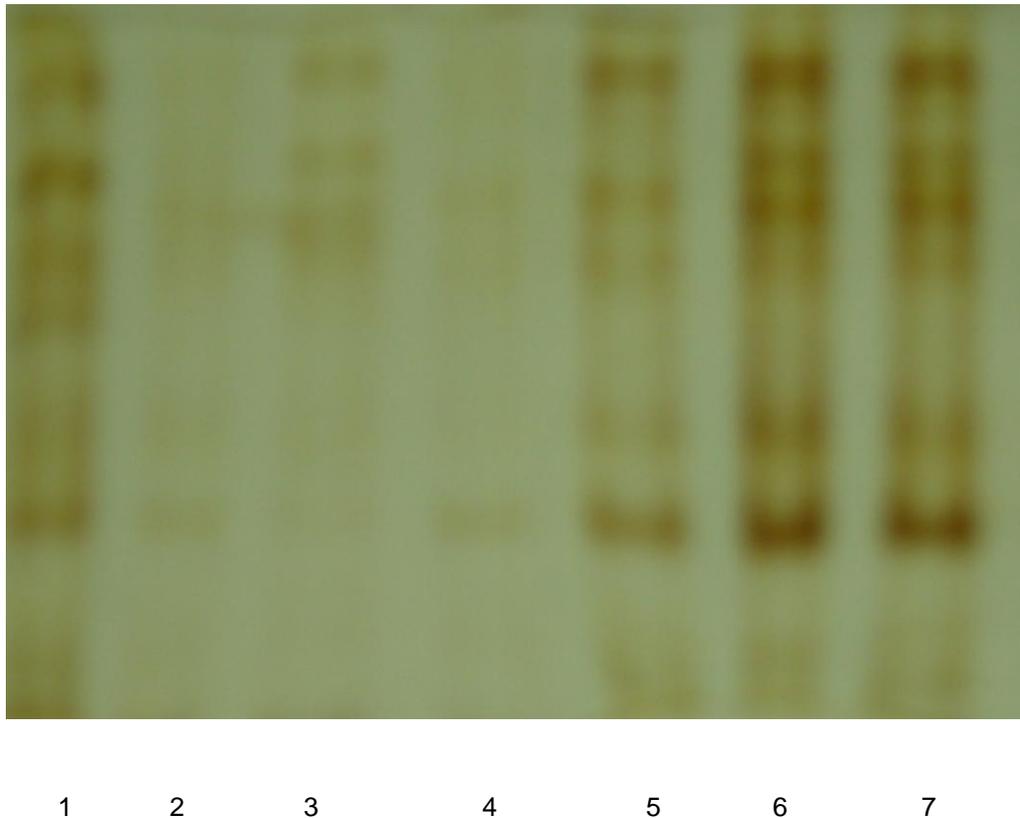


Figura 31 - Eletroforese (SDS-PAGE) da fração não-retida (PI) do extrato total de *Arachis hypogaea*. Raias 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 – 5,7 µg de PI em tampão de amostra sem β-mercaptoetanol nas colunas de *A. pavonina*, *M. scabrella*, *D. mollis*, *S. barbatiman*, *M. sloanei*, *H. coubaril* e *C. langsdorffii*.

Nas figuras 32 e 33, que ilustram a eletroforese das frações retidas nas matrizes (PII), pode-se observar as bandas correspondentes à lectina de *A. hypogaea*. Esse resultado está em acordância com os dados apresentados por Lotan e colaboradores (1975), que descrevem a banda de peso molecular aparente de 27 kDa em eletroforese na presença de 0,1% de dodecil sulfato de sódio. Esse resultado confirma que a lectina de amendoim é um tetrâmero de subunidades aparentemente idênticas e confirma também a pureza das frações retidas nas matrizes cromatográficas.

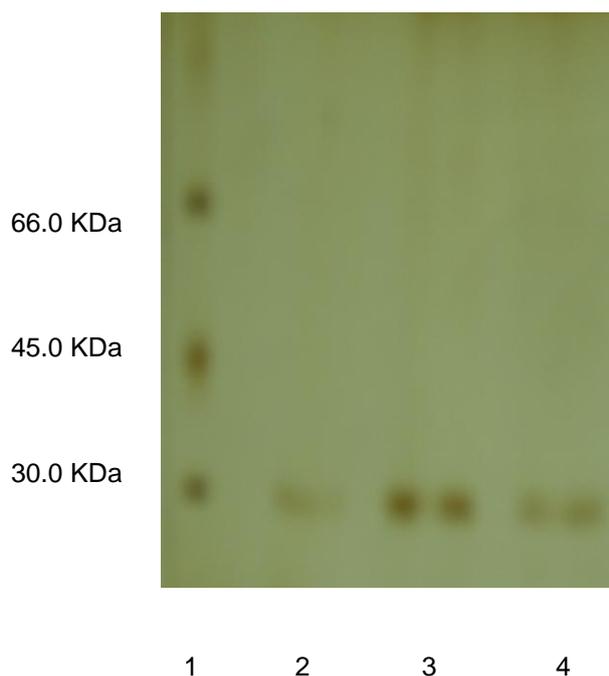


Figura 32 - Eletroforese (SDS-PAGE) da fração retida (PII) do extrato total de *Arachis hypogaea*. Raia 1: Marcador de peso molecular; Raias 2, 3 e 4 –PII, em tampão de amostra sem β -mercaptoetanol em colunas de *A. pavonina*, *D. mollis* e *S. barbatiman*.

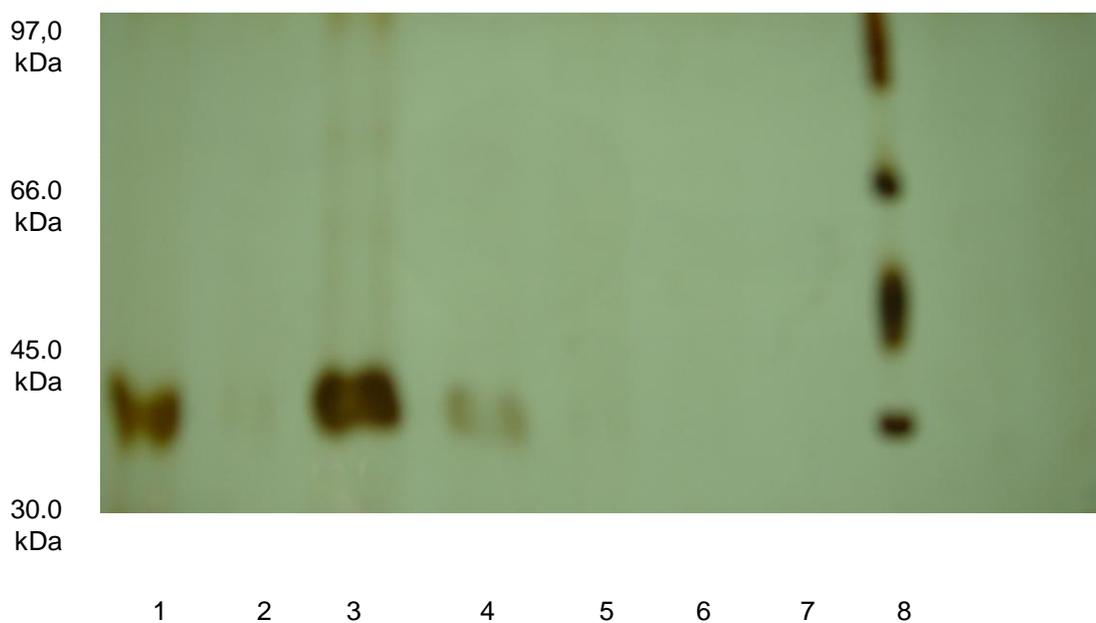


Figura 33 - Eletroforese (SDS-PAGE) da fração retida (PII) do extrato total de *Arachis hypogaea*. Raias 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 - 2 μ g de pico 2 na ausência de β -mercaptoetanol em colunas de *A. pavonina*, *M. scabrella*, *D. mollis*, *S. barbatiman*, *M. sloanei*, *H. coubaril*, *C. langsdorffii*. Raia 8 - padrão de peso molecular.

6. CONCLUSÃO

O mecanismo de separação por afinidade, que utiliza a combinação de ligantes naturais presentes na superfície de polissacarídeos vegetais (galactomanana e xiloglucana) é sugerido como um importante sistema para purificar lectinas vegetais D-galactose-ligantes. Essas matrizes são também uma alternativa interessante e barata para a determinação da especificidade anomérica dessas lectinas. Nesse trabalho foi demonstrado que as matrizes de galactomananas retiveram melhor a jacalina e a frutalina, lectinas α -D-galactose-ligantes. Por sua vez, as matrizes de xiloglucana interagiram muito fracamente com a jacalina e não interagiram com a frutalina. As matrizes de xiloglucanas e galactomananas interagiram muito bem com a ricina, enquanto a PNA interagiu com matrizes de galactomananas e xiloglucanas de maneira inespecífica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

AGRAWAL, B.B.; GOLDSTEIN, I.J. Specific binding of Concanavalin A to cross-linked dextran gels. **The Biochemical Journal**, v. 96, p. 23-25, 1965.

AHMED, H.; CHATTERJEE, B.P. Further characterization and immunochemical studies on the carbohydrate specificity of jackfruit (*Artocarpus integrifolia*) lectin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 16, p. 9365-9372, 1989.

AJIWE, V. I. E.; OKEKE, C. A.; NNABUIKE, B. Applications of oils extracted from African star apple (*Chrysophyllum africanum*), horse eye bean (*Mucuna sloanei*) and African Pear (*Dacryodes edulis*) seeds. **Bioresource Technology**, v. 59, p. 259-261, 1997.

ALCÂNTARA, P.H.N.; DIETRICH, S.M.C.; BUCKERIDGE, M.S. Xyloglucan mobilisation and purification of a (XLLG/XLXG) specific β -galactosidase from cotyledons of *Copaifra langsdorffii*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 37, n. 9, p. 653-663, 1999.

ALENCAR, N.M.; ASSREUY, A.M.; ALENCAR, V.B.; MELO, S.C.; RAMOS, M.V.; CAVADA, B.S.; CUNHA, F.Q.; RIBEIRO, R.A. The galactose-binding lectin from *Vatairea macrocarpa* seeds induces *in vivo* neutrophil migration by indirect mechanism. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.35, p. 1674-1681, 2003.

ALMEIDA, S.P.; PROENÇA, C.E.B.; SANO, S.M.; RIBEIRO, J.F. **Cerrado** – Espécies vegetais úteis. CPAC – Embrapa, Planaltina. 464 p., 1998. *apud* Freitas *et al.* (2002).

APPUKUTTAN, P.S; BASU, D. Four identical subunits in jack fruit seed agglutinin offer only two saccharide binding sites. **Federation of European Biochemical Societies**, v. 180, n. 2, p. 331-334, 1985.

APPUKUTTAN, P.S.; KUMAR, G.S.; BASU, D. Polysaccharide precipitation as a model to study sugar binding by lectins: jack fruit seed lectin interaction with galactomannan. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, v. 21, p. 353-356, 1984.

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

BABURAJ; GUNASEKARAN, In vitro propagation of a tree legume *Adenanthera pavonina*. **Indian Botanical Contactor**, v. 10, p. 1-3, 1993 *apud* Fanti (1997).

BAILEY, H.L.H. **Manual of cultivated plants**. 2a edição, Nova York, p.588-589, 1954 *apud* Tavares (1998).

BAILEY, R.W. Polysaccharides in the leguminosae. In: HARBONE, J.B. **Chemotaxonomy of the Leguminosae**. London: DB& BLT, Academic Press, 1971, p. 503-541. *apud* Franco *et al.* (1996).

- BANERJEE, R.; DAS, K.; RAVISHANKAR, R.; SUGUNA, K.; SUROLIA, A.; VIJAYAN, M. Conformation, protein-carbohydrate interactions and a novel subunit association in the refined structure of peanut lectin-lactose complex. **Journal of Molecular Biology**, v.259, p. 281-296, 1996.
- BASKIN, T.I. On the alignment of cellulose microfibrils by cortical microtubules: a review and a model. **Protoplasma**, v. 215, p. 150-171, 2001 *apud* Lerouxel *et al.* (2006)
- BAVEJA, S.K.; RANGA-RAO, K.V.; ARORO, J.; MATUR, N.K.; VINAYAK, V.K. Chemical investigation of some galactomannan gums as matrix tablets for sustained drug delivery. **Indian Journal of Chemistry**, v. 30B, p. 133-137, 1991.
- BETTLER, E.; IMBERTY, A.; LORIS, R. In: Lectins. Centre National de la Recherche Scientifique. Disponível em: <http://www.cermav.cnrs.fr/lectines/>. Acesso em: 20 mai. 2007.
- BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H.J. Improved silver stain of plant proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels. **Electrophoresis**, v. 8, n. 2, p. 93-99, 1987.
- BOI, C.; CATTOLI, F.; FACCHINI, R.; SORCI, M.; SARTI, G.C. Adsorption of lectins on affinity membranes. **Journal of membrane Science**, v. 273, p. 12-19, 2006.
- BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, especialidades do ceará**. 3ª edição comemorativa do Congresso Brasileiro de Florestas tropicais. Mossoró, 1976 *apud* Tavares (1998).
- BRANDO-LIMA, A.C.; SALDANHA-GAMA, R.F.; HENRIQUES, M.G.M.O.; MONTEIRO-MOREIRA, A.C.O.; MOREIRA, R.A.; BARJA-FIDALGO, C. Frutalin, a galactose-binding lectin, induces chemotaxis and rearrangement of actin cytoskeleton in human neutrophils: involvement of tyrosine kinase and phosphoinositide 3-kinase. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 208, p. 145-154, 2005.
- BRANDO-LIMA, A.C.; SALDANHA-GAMA, R.F.; PEREIRA, C.R.; VILLELA, C.G.; SAMPAIO, A.L.F.; MONTEIRO-MOREIRA, A.C.O.; HENRIQUES, M.G.M.O.; MOREIRA, R.A.; BARJA-FIDALGO, C. Involvement of phosphatidylinositol-3-kinase-Akt and nuclear factor kappa-B pathways in the effect of frutalin on human lymphocyte. **International Immunopharmacology**, v. 6, p. 465-472, 2006.
- BRUMMELL, D.A.; CAMIRAND, A.; MACLACHLAN, G. Differential distribution of glycosyltransferase in pea Golgi dictyosomes and secretory vesicles. **Journal of Cell Science**, v. 96, p. 705-710, 1990.
- BUCKERIDGE, M.S.; AIDAR, M.P.M.; SANTOS, H.P.; TINÉ, M.A.S. Acúmulo de reservas. In: FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. São Paulo: Artmed, 2004, cap. 1, p. 1-33.
- BUCKERIDGE, M.S.; CROMBIE, H.J.; MENDES, C.J.M.; REID, J.S.G.; GIDLEY, M.J.; VIEIRA, C.C.J. A new family of oligosaccharides from the xyloglucan of *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae) cotyledons. **Carbohydrate Research**, v. 303, p. 233-237, 1997.
- BUCKERIDGE, M.S.; DIETRICH, S.M.C. Galactomannan from Brazilian legume seeds. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 13, p. 109-112, 1990.

- BUCKERIDGE, M.S.; DIETRICH, S.M.C.; LIMA, D.U. Galactomannans as the reserve carbohydrate in legume seeds. In: GUPTA, A.K. KAUR, N. **Carbohydrate reserves in plants: synthesis and regulation**. Amsterdam: Elsevier, 2000, p. 283-316.
- BUCKERIDGE, M.S.; REID, J.S.G. Purification and properties of a novel β -galactosidase or exo-(1 \rightarrow 4)- β -d-galactanase from the cotyledons of germinated *Lupinus angustifolius* L. seeds. **Planta**, v.192, n. 4, p. 502-511, 1994.
- BUCKERIDGE, M.S.; ROCHA, D.C.; REID, J.S.G.; DIETRICH, S.M.C. Xyloglucan structure and post-germinative metabolism in seeds of *Copaifera langsdorffii* from savanna and forest populations. **Physiologia Plantarum**, v. 86, p. 145-151, 1992.
- CAMARGO, M.T.L.A. **Medicina popular: aspectos metodológicos para pesquisa, garrafada, objeto de pesquisa, componentes medicinais de origem vegetal, animal e mineral**. São Paulo, Ed. Almed Editora e Livraria Ltda, 1985.
- CARPITA, N.C.; MCCANN, M. The cell wall. In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. cap. 2, p. 52-108.
- CORREIA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura / IBDF, 1984.
- CRESTANA, C.M.; BELTRATI, C.M. Morfologia e anatomia de sementes de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae – Caesalpinioideae). **Naturalia**, Marília, v.13, p. 45-54, 1988 *apud* Ferreira (2004).
- CROCKER, P.R.; FEIZI, T. Carbohydrate recognition systems: functional triads in cell-cell interactions. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 6, p. 679-691, 1996.
- CUATRECASAS, P.; WILCHEK, M.; ANFINSEN, C.B. Selective enzyme purification by affinity chromatography. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 61, p. 636-643, 1968 *apud* Wilchek (1999).
- DAAS, P.J.H.; SCHOLS, A.; JONGH, H.H.J. On the galactosyl distribution of commercial galactomannans. **Carbohydrate Research**, v. 329, p. 609-619, 2000.
- DANIEL, J.R.; WHISTLER, R.L.; VORAGEN, A.G.J.; PILNIK, W. Starch and other polysaccharides. **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**, v. A25, VCH, Weinheim, Germany, 1994 *apud* Daas *et al.* (2000).
- DEA, I.C.M.; MORRISON, A. Chemistry and interactions of the seed galactomannans. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, v. 31, p. 241-312, 1975.
- DE-SIMONE, S.G.; NETTO, C.C.; SILVA Jr, F.P. Simple affinity chromatographic procedure to purify β -galactoside binding lectins. **Journal of Chromatography**, v. 838, p. 135-138, 2006.
- DESPEYROUX, D.; WALKER, N.; PEARCE, M.; FISHER, M.; MCDONNELL, M.; BAILEY, S.C.; GRIFFITHS, G.D.; WAATTS, P. Characterization of ricin heterogeneity by

electrospray mass spectrometry, capillary electrophoresis and resonant mirror. **Analytical Biochemistry**, v. 279, p. 23-36, 2000.

DIETRICH, S.M.C.; BUCKERIDGE, M.S.; TINÉ, M.A.S.; YOUNG, M.C.M.; BOLZANI, V.S.; BRAGA, M.R.; MARQUES, M.R. Plant cell wall research related to evolution and chemical defenses, **Anais da Academia Brasileira de Ciência**, v. 70, n. 4, p. 727-731, 1998.

DRICKAMER, K. Making a fitting choice: common aspects of sugar-binding sites in plant and animal lectins. **Structure**, v. 5, n. 4, p. 65-68, 1997.

DRIOUICH, A.; LEVI, S.L.; STAEHLIN, A.; FAYE, L. Structural and functional organization of the Golgi apparatus in plant cells. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 32, n. 6, p. 713-749, 1994

EDWARDS, M.; BULPIN, P.V.; DEA, I.C.M.; REID, J.S.G. Biosynthesis of legume seed galactomannans in vitro. **Planta**, v. 178, p. 41-51, 1989.

EDWARDS, M.E.; MARSHALL, E.; GIDLEY, M.J.; REID, J.S.G. Transfer specificity of detergent-solubilized fenufreek galactomannan galactosyltransferase. **Plant Physiology**, v. 129, p. 1391-1397, 2002.

ELGAVISH, S.; SHAANAN, B. Lectin-carbohydrate interactions: different folds, common recognition principles. **TIBS**, v. 22, n. 12, p. 462-467, 1997.

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

FAÏK, A.; CHILESHE, C.; STERLING, J.; MACLACHLAN, G. Xyloglucan galactosyl- and fucosyltransferase activities from pea epicotyl microsomes. **Plant Physiology**, v. 114, p. 245-254, 1997.

FANTI, S.C. **Comportamento germinativo sob condições de estresse e do sombreamento artificial e adubo químico na produção de mudas de *Adenanthera pavonina* L.** 1997, 153 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo.

FÉRES, C.A.O.; MADALOSSO, R.C.; ROCHA, O.A.; LEITE, J.P.V.; GUIMARÃES, T.M.D.P.; TOLEDO, V.P.P.; TAGLIATI, C.A. Acute and chronic toxicological studies of *Dimorphandra mollis* in experimental animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 108, p. 450-456, 2006.

FERREIRA, R.A.; OLIVEIRA, L.M.; CARVALHO, D.; OLIVEIRA, A.F.; GEMAQUE, R.C.R. Qualidade fisiológica de sementes de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae Caesalpinioideae) envelhecidas artificialmente. **Revista Ciência Agronômica**, v. 35, n. 1, p. 82-86, 2004.

FONSECA, S.C.L.; PEREZ, S.C.J.G.A. Ação do polietilenoglicol na germinação de sementes de *Adenanthera pavonina* L. e o uso de poliaminas na atenuação do estresse hídrico sob diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 25, n. 1, p. 1-6, 2003.

- FRANCO, T.T.; RODRIGUES, N.R.; SERRA, G.E.; PANEGASSI, V.R.; BUCKERIDGE, M.S. Characterization of storage cell wall polysaccharides from Brazilian legume seeds and the formation of aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B**, v.60, 255-261, 1996.
- FREITAS, C.V.; OLIVEIRA, P.E. Biologia reprodutiva de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae, Caesalpinioideae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 25, p. 311-321, 2002.
- FRY, S.C. Primary cell wall metabolism: tracking the careers of wall polymers in living plant cells. **New Phytologist**, v.161, p. 641-675, 2004.
- FRY, S.C.; YORK, W. S.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A; HAYASHI, T.; JOSELEAU, J. P.; KATO, Y.; LORENCES, E. P.; MacLACHLAN, G. A.; McNEIL, M.; MORT, A.; REID, J. S. G.; SEITZ, H. U.; SELVENDRAN, R. R.; VORAGEN, A. G.,J.; WHITE, A. R. An unambiguous nomenclature for xyloglucan-derived oligosaccharides. **Physiologia Plantarum**, v. 89, p. 1-3, 1993.
- GANTER, J.L.M.S.; CARDOSO, A.T.M.; KAMINSKI, M.; REICHER, F. Galactomannan from the seeds of *Mimosa scabrella*: a scale-up process. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.21, p.137-140, 1997.
- GANTER, J.L.S.; HEYRAUD, A.; PETKOWICZ, C.L.O.; RINAUDO, M.; REICHER, F. Galactomannans from Brazilian seeds: characterization of the oligosaccharides produced by mild hydrolysis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 17, n. 1, p. 13-19, 1995.
- GANTER, J.M.S.; ZAWADZKI-BAGGIO, S.F.; LEITNER, S.C.S.; SIERAKOWSKI, M.R.; REICHER, F. Structural studies on galactomannans from brazilian seeds. **Journal of Carbohydrate Chemistry**, v. 12, n. 6, p. 753-767, 1993.
- GARCÍA-HERNÁNDEZ, E.; HERNÁNDEZ-ARANA, A. Structural bases of lectin-carbohydrate affinities: comparisons with protein-folding energetics. **Cambridge University Press**, v. 8, p. 1075-1086, 1999.
- GARCÍA-HERNANDEZ, E.; ZUBILLAGA, R.A.; RODRIGUEZ-ROMERO, A.; HERNÁNDEZ-ARANA, A. Stereochemical metrics of lectin-carbohydrate interactions: comparison with protein-protein interfaces. **Glycobiology**, v. 10, n. 10, p. 993-1000, 2000.
- GARROS-ROSA, I.; REICHER, F.; PETKOWICZ, C.L.O. Characterization of the galactomannans from *Parkinsonia aculeata* seeds and their application on affinity chromatography. **Polímeros**, v. 16, n. 2, p. 99-103, 2006.
- GERARD, T.; DAVIDSON, R.L. **Handbook of water-soluble gums and resins**. McGraw Hill, New York, 1980 *apud* Lima *et al.* (1995).
- GIBEAUT, D.M. Nucleotide sugars and glycosyltransferases for synthesis of cell wall matrix polysaccharides. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 38, p. 69-80, 2000.
- GIDLEY, M.J.; LILLFORD, P.J.; ROWLANDS, D.W.; LANG, P.; DENTIN, M.; CRESCENZI, V.; EDWARDS, M.; FANUTTI, C.; REID, J.S. Structure and solution

properties of tamarind-seed polysaccharide. **Carbohydrate Research**, v. 214, n. 2, p. 299-314, 1991.

GUERRA, M.O. Aborto em ratas após administração de barbatimão. **Revista Brasileira de Pesquisas Médicas e Biológicas**, v. 13, p. 111-113, 1980.

HAGE, D.S. Affinity Chromatography: a review of clinical applications. **Clinical Chemistry**, v. 45, n. 5, p. 593-615, 1999.

HAGIWARA, K.; COLLET-CASSART, D.; KOBAYASHI, K.; VAERMAN, J.P. Jacalin: isolation, characterization, and influence of various factors on its interaction with human igA1, as assessed by precipitation and latex agglutination. **Molecular Immunology**, v. 25, n. 1, p. 69-83, 1998.

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

HATAKEYAMA, T.; YAMASAKI, N.; FUNATSU, G. Identification of the triptophan residue located at the low-affinity saccharide binding site of ricin D. **Biochemical Journal**, v.100, p. 781-788, 1986.

HAYASHI, T. Xyloglucans in the primary cell wall. **Annual Review of plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 40, p. 139-168, 1989.

HAYASHI, T.; OGAWA, K.; MITSUISHI, Y. Characterization of the adsorption of xyloglucan to cellulose. **Plant and Cell Physiology**, v. 35, n. 8, p. 1199-1205, 1994.

HOFFMAN M.; JIA, Z.; PEÑA, M.J.; CASH, M.; HARPER, A.; BLACKBURN, A.R.II; DARVILL, A.; YORK, W.S. Structural analysis of xyloglucans in the primary cell walls of plants in the subclass *Asteridae*. **Carbohydrate Research**, v. 340, p.1826-1840, 2005.

IYAMA, K.; LAM, T.B.T.; STONE, B.A. Covalent cross-links in the cell wall. **Plant Physiology**, v. 104, p. 315-320, 1994.

INA, C.; SANO, K.; YAMAMOTO-TAKAHASHI, Y.; MATSUSHITA-OIKAWA, H.; TAKEKAWA, H.; TAKEHARA, Y.; UEDA, H.; OGAWA, H. Screening for and purification of novel self-aggregatable lectins reveal a new functional lectin group in the bark of leguminous trees. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 176, p. 21-27, 2005.

ISHIGURO, M.; TAKAHASHI, T.; FUNATSU, G.; HAYASHI, K.; FUNATSU, M. Biochemical studies on ricin: I. Purification of ricin. **Biochemical Journal**, v. 55, p. 587-592, 1964.

JEYAPRAKASH, A.A.; JAYASHREE, G.; MAHANTA, S.K.; SWAMINATHAN, C.P.; SEKAR, K.; SUROLIA, A.; VIJAYAN, M. Structural basis for the energetics of jacalin-sugar interactions: promiscuity *versus* specificity. **Journal of Molecular Biology**, v. 347, p. 181-188, 2005.

- JEYAPRAKASH, A.A.; KATIYAR, S.; SWAMINATHAN, C.P.; SEKAR, K.; SUROLIA, A.; VIJAYAN, M. Structural basis of the carbohydrate specificities of jacalin: an X-ray and modeling study. **Journal of Molecular Biology**, v. 332, p. 217-228, 2003.
- JEYAPRAKASH, A.A.; RANI, P.G.; REDDY, G.B.; BANUMATHI, S.; BETZEL, C.; SUROLIA, A.; VIJAYAN, M. Crystal structure of the Jacalin-T-antigen complex and a comparative study of lectin-T-antigen complexes. **Journal of Molecular Biology**, v. 321, p. 637-645, 2002.
- KEEGSTRA, K.; RAIKHEL, N. Plant glycosyltransferases. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 4, p. 219-224, 2001.
- KILPATRICK, D.C. Animal lectins: a historical introduction and overview. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1572, n. 2-3, p. 187-197, 2002.
- KOOMAIN, P. A method for the determination of the amyloid in plant seeds. **Acta Botânica Neerlandica** (Holanda), v.9, p.20-219, 1960. *apud* Buckeridge *et al.* (1997).
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural protein during the assembly of the Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LAVASTRE, V.; CAVALLI, H.; RATTHE, C.; GIRARD, D. Anti-inflammatory effect of *Viscum album* agglutinin-I (VAA-I): induction of apoptosis in activated neutrophils and inhibition of lipopolysaccharide-induced neutrophilic inflammation in vivo. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 137, p. 272-278, 2004.
- LEROUXEL, O.; CAVALIER, D.M.; LIEPMAN, A.H.; KEEGSTRA, K. Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides – a complex process. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, p. 621-630, 2006.
- LIENER, I.J.; SHARON, N.; GOLDSTEIN, I.J. **The lectins**. Properties, functions and applications in biology and medicine. New York: Academic Press Inc, 1986. 600 p.
- LIMA, N.N.; RECHIA, C.G.V.; GANTER, L.M.S.; REICHER, F.; SIERAKOWSKI, M.R. Oligosaccharides derived from the xyloglucan isolated from the seeds of *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.17, p. 413-415, 1995.
- LIMA, N.N.; REICHER, F.; CORRÊA, J.B.C.; GANTER, J.L.M.S.; SIERAKOWSKI, M.R. Partial structure of a xyloglucan from the seeds of *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa* (jatobá). **Ciência e Cultura**, v.45, p. 22, 1993.
- LIS, H.; SHARON, N. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. **Chemical Reviews**, v. 98, p. 637-674, 1998.
- LOONTIENS, F.G. Slow dissociation of 4-methylumbelliferyl β -d-galactosyl-(1 \rightarrow 3)-N-acetyl β -d-galactosaminide from its complex with peanut agglutinin. **Federation of European Biochemical Societies**, v. 162, n. 1, p. 193-194, 1983.

- LORD, M.J.; JOLIFFE, N.A.; MARDSEN, C.J.; PATEMAN, C.S.; SMITH, D.C.; SPOOMER, R.A.; WATSON, P.D.; ROBERTS, L.M. Ricin, mechanisms of cytotoxicity. **Toxicological Reviews**, v. 22, p. 53-64, 2003.
- LORENZI, H. **Árvores Brasileiras – manual de Identificação de Cultivo de Plantas Arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa, SP: Ed. Plantarum Ltda, 352 p., 1992.
- LORIS, R.; HAMELRYCK, T.; BOUCKAERT, J.; LODE, W. Legume lectin structure. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1383, p. 9-36, 1998.
- LOTAN, R.; SKUTELSKY, E.; DANON, E.; SHARON, N. The purification, composition, and specificity of the anti-T lectin from peanut (*Arachis hypogaea*). **Journal of Biological Chemistry**, v. 250, p.8518-8523, 1975 *apud* Pujol *et al.* (1986).
- MACHADO, J.W.B. **Relação origem/solo e tolerância à saturação hídrica de *Copaifera langsdorffii* Desf.** Tese de doutorado - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1990 *apud* Freitas *et al.* (2002).
- MADSON, M.; DUNAND, C.; LI, X.; VERMA, R.; VANZIN, G.F.; CAPLAN, J.; SHOUE, D.A.; CARPITA, N.C.; REITER, W.D. The MUR3 gene of *Arabidopsis thaliana* encodes a xyloglucan galactosyltransferase that is evolutionarily related to animal exostosins. **Plant Cell**, v. 15, p. 1662-1670, 2003.
- MAUSETH, J.D. **Botany, an introduction to plant biology**. 2/e, Boston: Jons and Bartlett, 1998. 794p. *apud* Buckeridge *et al* (2004).
- MCNEIL, M.; DARVILL, A.G.; FRY, S.C.; ALBERSHEIM, P. Structure and function of the primary cell walls of plants. **Annual Review of Biochemistry**, v. 53, p. 625-663, 1984.
- MONTEIRO, A.C.O. **Características químicas, físico-químicas e estruturais da frutalina, uma lectina D-galactose-ligante**. 1998, 151 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Ceará.
- MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O. **Caracterização estrutural de três lectinas apresentando especificidades por açúcar distintas, isoladas de sementes de Fruta-Pão (*Artocarpus incisa*)**. 2002. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Ceará.
- MOREIRA, R. A., **Lectinas vegetais: uma abordagem química e físico-química**. 1998, 600 f. Tese (Titular). Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Ceará.
- MOREIRA, R.A.; CASTELO-BRANCO, C.C.; MONTEIRO, A.C.O; TAVARES, R.O.; BELTRAMINI, L.M. Isolation and partial characterization of a lectin from *Artocarpus incisa* L. seeds. **Phytochemistry**, v. 47, n. 7, p. 1183-1188, 1998.
- MOREIRA, R. A.; PERRONE, J. C. Purification and partial characterization of a lectin from the seeds of *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiology**, v. 59, p. 783-787, 1977.

NEUKOM, H. **Galactomannans**: properties and applications. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, London, v.22, n. 2, p. 41-45, 1989 *apud* Panegassi *et al.* (2000).

NICOLSON, G.L.; BLAUSTEIN, J.; ETZLER, M.E. Characterization of two plant lectins from *Ricinus communis* and their quantitative interaction with Murine lymphoma. **Biochemistry**, v. 13, n. 1, p. 196-204, 1974

OKIGBO, M. C. **Cropping and Related Research in Africa**. AAASA Occasional Publications Series, OTI, 22-23, 1978 *apud* Ajiwe *et al.* (1997)

OLIVEIRA JÚNIOR, C.J.F.; BRAGA, M.R.; BUCKERIDGE, M.S. Isolamento de oligossacarídeos de xiloglucano de dicotiledôneas através de hidrólise enzimática e cromatografia de exclusão molecular. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 29, n. 3, p. 391-397, 2006.

OLSNES, S.; PIHL, A. Different biological properties of the two constituent peptide chains of ricin, a toxic protein inhibiting protein synthesis. **Biochemistry**, v.12, p. 3121-3126, 1973.

OLSNES, S.; SALTVEDT, E.; PIHL, A. Isolation and comparison of galactose-binding lectins from *Abrus precatorius* and *Ricinus communis*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 249, p. 803-810, 1974.

O'NEILL, M.A.; WARRENFELTZ, D.; KATES, K.; PELLERIN, P.; DOCO, T.; DARVILL, A.G.; ALBERSHEIM, P. Rhamnogalacturonan-II, a pectic polysaccharide in the walls of growing plant cell, forms a dimer that is covalently cross-linked by a borate ester – *in vitro* conditions for the formation and hydrolysis of the dimer. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 22923-22930, 1996.

PANEGASSI, V.R.; SERRA, G.E.; BUCKERIDGE, M.S. Potencial tecnológico do galactomanana de sementes de faceiro (*Dimorphandra mollis*) para uso na indústria de alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, n. 3, 2000.

PERISSUTTI, G.E.; BRISOLIN, T.M.B.; GANTER, J.L.M.S. Interaction between the galactomannan from *Mimosa sacabrella* and milk proteins. **Food Hydrocolloids**, v. 16, p. 403-417, 2002.

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

PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E.J.; BARRE, A.; ROUGE, P. Classification of plant lectins in families of structurally and evolutionary related proteins. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 491, p. 27-54, 2001.

PINEAU, N.; BRUGIER, J.C.; BREUX, J.P.; BECQ-GIRAUDON, B.; DESCAMPS, J.M.; AUCOUTURIER, P.; PREUD'HOMME, J.L. Stimulation of peripheral blood lymphocytes of HIV-infected patients by jacalin, a lectin mutagenic for human CD4+ lymphocytes. **AIDS**, v. 3, p. 659-663, 1989.

- PUJOL, F.H.; CESARI, I.M. A simplified methodology for purification of peanut (*Arachis hypogaea*) agglutinin. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 13, p. 131-134, 1986.
- RAVAL, S.; GOWDA, S.B.; SINGH, D.D.; CHANDRA, N.R. A database analysis of jacalin-like lectins: sequence-structure-function relationships. **Glycobiology**, v.14, n.12, p. 1247-1263, 2004.
- REID, J.S.G. Cementing the wall: cell wall polysaccharide synthesizing enzymes. **Current Opinion in Plant Biology**, v.3, p.512-516, 2000.
- RINI, J. M. Lectin structure. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 24, p. 551-577, 1995.
- ROBERTS, L.M.; LAMB, F.I.; PAPPIN, D.J.; LORD, J.M. The primary sequence of *Ricinus communis* agglutinin. Comparison with ricin. **The Journal of biological Chemistry**, v. 260, n. 1, p. 15682-15686, 1985.
- ROSE, J.K.C.; BENNETT, A.B. Cooperative disassembly of the cellulose-xyloglucan network of plant cell walls: parallels between cell expansion and fruit ripening. **Trends in Plant Science**, v. 4, n. 5, p. 176-183, 1999.
- ROY, I.; SARDAR, M.; GUPTA, M.N. Cross-linked alginate-guar gum beads as fluidized bed affinity media for purification of jacalin. **Biochemical Engineering Journal**, v.23, p. 193-198, 2005.
- ROY, I.; SARDAR, M.; GUPTA, M.N. Exploiting unusual affinity of usual polysaccharides for nioseparation of enzymes on fluidized beds. **Enzyme Microbial and Technology**, v. 27, p. 53-65, 2000.
- RUTENBER, E.; ROBERTUS, J.D. Structure of ricin B-chain at 2.5 Å resolution. **Proteins**, v. 10, p. 260-269, 1991.
- SANKARANARAYANAN, R.; SEKAR, K.; BANERJEE, R.; SHARMA, V.; SUROLIA, A.; VIJAYAN, M. A novel mode of carbohydrate recognition in jacalin, a Moraceae plant lectin with a β -prism fold. **Nature Structural Biology**, v. 3, p. 596-603, 1996.
- SASTRY, M.V.; BANARJEE, P.; PATANJALI, S.R.; SWAMY, M.J.; SWARNALATHA, G.V.; SUROLIA, A. Analysis of saccharide binding to *Artocarpus integrifolia* lectin reveals specific recognition of T-antigen (β -D-Gal(1-3)D-GalNAc). **Journal of Biological Chemistry**, v. 261, p. 11726-11733, 1986.
- SCHRAG, J.D.; PROCOPIO, D.O.; CYGLER, M.; THOMAS, D.Y.; BERGERON, J.M. Lectin control of protein folding and sorting in the secretory pathway. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 28, n. 1, p. 49-57, 2003.
- SHARON, N. Lectin-carbohydrate complexes of plants and animals: an anatomic view. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 18, p. 221-226, 1993

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

SHARON, N.; LIS, H. **Lectins**. London: Kluwer Academic Publishers, 2003.

SHARON, N. Lectins: carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules. **Journal of Biological Chemistry**, v.282, p. 2753-2764, 2007.

SORCI, M.; BOI, C.; FACCHINI, R.; SARTI, G.C. Purification of galacto-specific lectins by affinity membranes. **Desalination**, v. 199, p. 550-552, 2006.

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

STILLMARK, H. **Über Ricin ein giftiges ferment aus den samen von *Ricinus communis* L. und einigen anderen Euphorbiaceen**. Tese de doutorado, Universidade de Dorpad, Dorpad (Tartu), 1988 *apud* Liener *et al.* (1986).

SUGUI, J.A. **Aplicação de galactomanana de *Mimosa scabrella* (bragatinga): interação com surfactantes e proteína**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica), Universidade Federal do Paraná, Paraná, 1994.

SUJATHA, M.S.; BALAJI, P.V. Identification of common structural features of binding sites in galactose-specific proteins. **Proteins**, v. 55, p. 44-65, 2004.

SUJATHA, M.S.; SASIDHAR, Y.U.; BALAJI, P.V. Energetics of galactose- and glucose-aromatic amino acid interactions: implications for binding in galactose-specific proteins. **Protein Science**, v. 13, p. 2502-2514, 2004.

SURESHKUMAR, G.; APPUKUTTAN, P.S.; BASU, D. Purification and characterization of an α -galactoside binding lectin from jack fruit seed (*Artocarpus integrifolia*). **Journal of Biosciences**, v. 4, p. 257-261, 1982 *apud* Appukuttan; Basu (1985).

SZAIMAN, M.L. Introduction to carbohydrates. In: HECHT, S.M. **Bioorganic Chemistry: Carbohydrates**. Oxford: Oxford University Press, 1999. cap. 1, p. 1-55.

TAVARES, R.O. **Galactomanana de *Adenantha pavonina* L.: aplicação para o isolamento de lectinas galactose-específicas**. 1998, 85 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Ceará.

TEIXEIRA, D.M.A. **Isolamento e caracterização de um par lectina-receptor endógeno de semente de *Mucuna sloanei* (Fawcett & Rendle)**. 2005, 130 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Ceará.

TEIXEIRA, D.M.A.; BRAGA, R.C.; HORTA, A.C.G.; MOREIRA, R.A.; BRITO, A.C.F.; MACIEL, J.S.; FEITOSA, J.P.A.; PAULA, R.C.M. *Spondias purpurea* exudate polysaccharide as affinity matrix for the isolation of a galactose-binding-lectin. **Carbohydrate Polymers**, Article in Press, 2007.

TINÉ, M.A.S. **O conteúdo informacional da molécula de xiloglucana de cotilédones de *Hymenaea courbaril* reflete suas funções em nível celular.** 2002, 111 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Estrutural) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.

TINÉ, M.A.S.; SILVA, C.O.; LIMA, D.U.; CARPITA, N.C.; BUCKERIDGE, M.S. Fine structure of a mixed-oligomer storage xyloglucan from seeds of *Hymenaea courbaril*. **Carbohydrate Polymers**, v. 66, p.444-454, 2006.

TOMASSINI, E.; MORS, W.B. *Dimorphandra mollis* Benth. e *D. gardneriana* Tul., novas e excepcionais fontes de rutina. **Anais da academia Brasileira de Ciências**, v. 38, p. 321-323, 1966 *apud* Panegassi *et al.* (2000).

UGHINI, F.; ANDREZZA, I.F.; GANTER, J.L.M.S.; BRESOLIN, T.M.B. Evaluation of xanthan and highly substituted galactomannan from *M. scabrella* as a sustained release matrix. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 271, p. 197-205, 2004.

VAN DAMME, J.M.; BARRE, A.; ROUGÉ, P.; PEUMANS, W.J. Cytoplasmic/nuclear plant lectins: a new story. **Trends in plant Science**, v.9, p.484-489, 2004.

VAN DAMME, E.J.M.; HAO, Q.; CHEN, Y.; BARRE, A.; VANDENBUSSCHE, F.; DESMYTER, S.; ROUGE, P.; PEUMANS, W.J. Ribosome-inactivating proteins: A family of plant proteins that do more than inactivating ribosomes. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v., n.5, p.395-465, 2001.

VAN DAMME, E.J.M.; PEUMANS, W.J.; BARRE, A.; ROUGÉ, P. Plant lectins: A composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 17, p. 575-692, 1998.

VENDRUSCOLO, C.W.; ANDRZZA, I.F.; GANTER, J.L.M.S.; FERRERO, C.; BRESOLIN, T.M.B. Xanthan and galactomannan (from *M. scabrella*) matrix tablets for oral controlled delivery of theophylline. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 296, p. 1-11, 2005.

VICKEN, J.P.; BELDMAN, G.; VORAGEN, A.G. Substrate specificity of endoglucanases: what determines xyloglucanase activity? **Carbohydrate Research.**, v. 298, n. 4, p. 299-310, 1997.

WEIS, W.I.; DRICKAMER, K. Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. **Annual Review of Biochemistry**, v. 65, p. 441-473, 1996.

WILCHEK, M.; MIRON, T. Thirty years of affinity chromatography. **Reactive & Functional Polymers**, v. 41, p. 263-268, 1999.

WRIGHT, C.S.W. New folds of plant lectins. **Carbohydrates and Glycoconjugates**, v.7, p. 631-636, 1997.

WRIGHT, L.M.; WOOD, S.D.; REYNOLDS, C.D.; RIZKALLAH, P.J.; ALLEN, A.K. Crystallization and preliminary crystallographic analysis of *Scilla campanulata* lectin complexed with α -D-mannose. **Protein and Peptide Letters**, v. 4, n. 5, p. 343-348, 1997.

WU, J.H.; SINGH, T.; HERP, A.; WU, A.M. carbohydrate recognition factors of the lectin domain present in the *Ricinus communis* toxic protein (ricin). **Biochimie**, v. 88, p. 201-217, 2006.

YAMASAKI, N.; HATAKEYAMA, T.; FUNATSU, G. Ricin D-saccharide interaction as studied by ultraviolet difference spectroscopy. **Biochemical Journal**, v.98, p. 1555-1560,1985.

YANG, H.; CZAPLA, T.H. Isolation and characterization of cDNA clones encoding jacalin isolectins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, p. 5905-5910, 1993.

YORK, W.S.; VAN HALBEEK, H.; DARVILL, A.G.; ALBERSHEIM, P. Structural analysis of xyloglucan oligosaccharides by H-NMR spectroscopy and fast-atom-bombardment mass spectrometry. **Carbohydrate Research**, v.200, p. 9-31, 1990.

ZAWADKI-BAGGIO, S.F.; SIERAKOWSKI, M.R.; CORRÊA, J.B.C.; REICHER, F. A linear (1-5) linked α -L-arabinofuranan from seeds of guapuruvu (*Schizolobium parahybum*). **Carbohydrate Research**, v. 233, p. 265-269, 1992.