



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

**CLAUDENER SOUZA TEIXEIRA**

**DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DE UMA LECTINA  
DE SEMENTES DE *Canavalia maritima* (Aublet) COMPLEXADA COM O  
POLIFENOL ANTIOXIDANTE RESVERATROL**

**FORTALEZA**

**2015**

CLAUDENER SOUZA TEIXEIRA

DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DE UMA LECTINA DE  
SEMENTES DE *Canavalia maritima* (Aublet) COMPLEXADA COM O POLIFENOL  
ANTIOXIDANTE RESVERATROL

Tese apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Bioquímica do  
Departamento de Bioquímica e  
Biologia Molecular da  
Universidade Federal do Ceará  
como parte dos requisitos para  
obtenção do título de Doutor em  
Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Bruno  
Anderson Matias da Rocha

Co-orientador: Prof. Alexandre  
Holanda Sampaio

FORTALEZA

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

- 
- T265d      Teixeira, Claudener Souza.  
              Determinação da estrutura tridimensional de uma lectina de sementes de *Canavalia marítima* (Aublet) complexada com o polifenol antioxidante resveratrol / Claudener Souza Teixeira. – 2015.  
              94 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2015.  
              Área de Concentração: Bioquímica Vegetal.  
              Orientação: Prof. Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha.  
              Coorientação: Prof. Dr. Alexandre Holanda Sampaio.
1. Lectina de sementes. 2. Canavália. 3. Antioxidantes. I. Título.

---

CDD 574.192

2015

CLAUDENER SOUZA TEIXEIRA

DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DE UMA LECTINA DE  
SEMENTES DE *Canavalia maritima* (Aublet) COMPLEXADA COM O POLIFENOL  
ANTIOXIDANTE RESVERATROL

Tese apresentada ao Programa de Pós  
Graduação de Bioquímica do Departamento de  
Bioquímica e Biologia Molecular da  
Universidade Federal do Ceará como parte dos  
requisitos para obtenção do título de Doutor em  
Bioquímica.

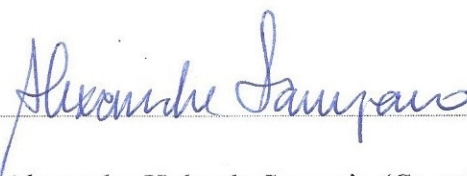
Aprovada em 03/09/2015

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha (Orientador)

Universidade Federal do Ceará (UFC)



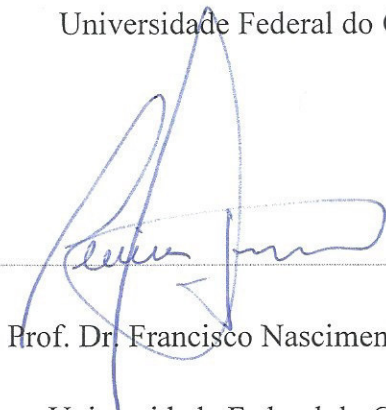
Prof. Dr. Alexandre Holanda Sampaio (Co-orientador)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Ito Liberato Barroso Neto

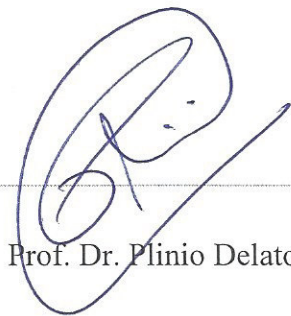
Dr. Ito Liberato Barroso Neto

Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof. Dr. Francisco Nascimento Pereira Júnior

Universidade Federal do Cariri (UFCA)



Prof. Dr. Plinio Delatorre

Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

A meus pais biológicos Maria Lucia e Luiz Braz por todo apoio, dedicação e amor. A meus pais de coração Francisca Lucena e Afonso por toda força e carinho. A meus irmãos Claudenir e Junior por sempre apostarem em mim e ao meu amor, Raquel, por estar sempre ao meu lado. Amo vocês!

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, criador do nosso rico e biodiverso universo, autor de todas as coisas. Agradeço pela sua grande obra e pelo dom da minha vida.

Ao meu Orientador, Prof. Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha, em primeiro lugar por sempre acreditar no meu potencial, pela grande amizade construída durante esses quase 8 anos de trabalho. Nunca vou esquecer de suas palavras de irmão, me aconselhando a não desistir, quando pensei em jogar tudo para o ar e retorno a minha cidade. Aprendi muitas com você, mas o caráter foi o principal ensinamento. Agradeço a Deus por ele ter colocado você em minha vida.

Ao meu Co-orientador, Prof. Dr. Alexandre Holanda Sampaio, por todos os conselhos, sempre me motivando quando eu o procurava para falar de trabalhos e concursos. O senhor é um exemplo de profissional a ser seguido. Muito obrigado por fazer parte da minha formação, tenho muito orgulho de tê-lo conhecido e trabalhado com o senhor durante o Mestrado e Doutorado, sei que nossa amizade irá muito além.

Ao prof. Dr. Plinio Delatorre primeiramente pela amizade verdadeira que construímos durante todo esse tempo. Por sempre acreditar no talismar rsrsrsrs. Agradeço por sempre de forma extrovertida, compartilhar os seus conhecimentos. Nunca irei esquecer das coletas no LNLS, sempre com muito aprendizado e diversão. Você é um amigo que irei levar sempre comigo. Obrigado por tudo.

Ao Prof. Dr Francisco Nascimento Pereira Junior, por aceitar participar da avaliação dessa tese, pela amizade construída desde a época da graduação, pelos ensinamentos de química de proteínas quando cheguei no mestrado. Sempre atencioso e prestativo. Muito obrigado.

Ao Dr. Ito Liberato pela grande amizade que construímos durante o a pós graduação, principalmente no início do meu doutorado. Muito obrigado por todos os ensinamentos durante esse período, principalmente sobre docking molecular. Com toda certeza iremos perpetuar esses trabalhos por muito tempo. Muito obrigado por tudo.

Ao Prof. Dr. André Coelho pelos conselhos nos experimentos e por sempre nos proporcionar um excelente ambiente de trabalho, sempre conduzindo o LABBMOL de forma coerente.

Ao Prof. Dr. Celso Shiniti Nagano, pelos conselhos nos experimentos e pela amizade construída durante todos esses anos.

A professora Dra. Silvana Saker Sampaio e ao seu aluno de Doutorado Daniel Barroso pela grande contribuição nesse trabalho.

Aos dois irmãos que encontrei em Fortaleza, dois amigos que não sei nem como explicar a tamanha gratidão que tenho a eles. Mayron e Rômulo vocês são simplesmente extraordinários, aprendi muito com vocês, principalmente a não julgar o próximo simplesmente pelo o que os outros dizem. Essa virtude de vocês me ajudou bastante durante esses anos. Muito obrigado pela amizade verdadeira que construímos desde a minha chegada a Fortaleza, muito obrigado por tudo “nego preto e urêa seca”.

A todos os colegas do Laboratório de Biocristalografia – LABIC, Bia Chaves, Dayane, Dayara, Ricardo, Pedro, Matheus, Luiz, Daniel e em especial a Mayara Maia e Mário Eduardo, vulgo muriçoca rrsrsrs, pela amizade e ensinamentos compartilhados durante esse período.

Aos amigos, Jeferson, Renatinha, Rafael Simões, Raphael Nóbrega, Bruno Lopes, Sâmia, Ana Claudia, Clareane, Fernando, Alysson, Suzete, Alfa Bari, Arthur, Camila Nobre, Guilherme e Maria Julia, por todos os momentos no laboratório.

Em especial aos amigos Raquel Benevides, Raniére Moura, Raphael Nóbrega por todos os momentos de aprendizagem e descontração, sempre contei com a amizade verdadeira de vocês desde o primeiro dia de laboratório, muito obrigado por tudo.

A todos os colegas do LABBMOL, Vinicius, Talitha, Vanessa, Bia, Jotapê, Tânia e em especial a Samara, pelos os momentos de descontração e ensinamento no laboratório, o laboratório de bioinformática não seria o mesmo se não tivesse vocês como vizinhos rrsrsrs, foi muito bom trabalhar ao lado de vocês.

Ao meu grande amigo o professor José Carlos Marques Freitas por todos os ensinamentos, muito obrigado por me guiar neste caminho.



A professora Dra. Beatriz Tupinambá pela grande amizade e por sempre acreditar no meu potencial, por sempre me aconselhar nos meus experimentos e na minha vida. Tenho muita sorte de ter trabalhado ao seu lado. Uma mãezona para seus alunos. Um grande beijo!

A todos os meus colegas professores da Universidade Regional do Cariri- URCA, pela amizade durante esses três anos de trabalho. Muito obrigado por tudo.

Aos meus alunos de Ciências Biológicas da URCA, muito obrigado pela amizade e os conhecimentos compartilhados durante esse período.

Em especial aos meus amigos de departamento, Pedro Filho, Vanessa Moraes, Lucas Pinheiro, Washington e Paulo Carvalho, e os demais colegas por todos os momentos de felicidade e tristeza compartilhados.

A todos os Professores e Funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC.

A todos os meus grandes amigos de graduação, em especial a Laura Hévila, Katia, Daniele e Bodocó por tudo que vivemos, sempre podem contar comigo.

Ao meu grande amigo George Ronan, que me ajudou muito durante o início da minha pós-graduação, sei que está no céu vibrando a cada passo dado. Muito obrigado meu velho amigo.

Um agradecimento especial as minhas amigas Tamires, Laianny, Rosenya e Edcarla por compartilharem as alegrias e tristezas durante esse período no prédio. Obrigado por tudo meninas.

Em especial aos tripulantes da JNC<sup>2</sup> House, Junior, Niel, Caio, Nino e Juba por compartilharmos essa amizade verdadeira, podem contar comigo sempre, somos felizardos pela amizade verdadeira que construímos. Amo vocês.

Aos meus eternos amigos/irmãos que sempre estão comigo, torcendo pelo o meu sucesso, Niel, Neilson, Renan, Marcos, Anderson Sobrinho, Anderson Carvalho, Darlon, Junior, Mikael, João Adolfo, Ademar, Heli, Pérciles, Isaac, Lenin, Tarcisio, Mário Machado, Bruno e Wendson. Obrigado por toda força durante todos esses anos.

Em especial a meu pedacinho de gente, que tanto me faz feliz, que apesar de toda distância durante esse período de pós-graduação, sempre me deu força e me incentivou a vencer os desafios. Raquel, você é um tesouro que Deus garimpou, lapidou e me presenteou. Tenho sorte de lhe ter ao meu lado, te amo minha flor de lís e agradeço a Deus o presente que ele me deu, Te amo!

## **ESTE TRABALHO FOI REALIZADO COM O AUXILIO DAS SEGUINTE INSTITUIÇÕES**

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), através de bolsa de Doutorado concedida ao candidato e por auxílios de pesquisa concedidos ao Grupo de pesquisa em Biocristalografia do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), pelos convênios estabelecidos ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

Ministério de Ciência e Tecnologia, através do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), além do financiamento aos Projetos de Cristalografia e Bioinformática.

Laboratório de Biocristalografia (LABIC) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, onde se encontra o laboratório de cristalização.

Laboratório de Produtos Naturais Marinhos do Departamento de Engenharia de Pesca do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, onde foram realizado os ensaios de atividade antioxidante.

Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), onde foram realizados os experimentos de difração de Raios X.

“Apesar dos nossos defeitos, precisamos enxergar que somos pérolas únicas no teatro da vida e entender que não existem pessoas de sucesso e pessoas fracassadas. O que existem são pessoas que lutam pelos seus sonhos ou desistem deles”.

(Augusto Cury)

## RESUMO

O resveratrol é um polifenol antioxidante natural encontrado especialmente na epicarpo da uva, em nozes e na romã o qual pode inibir a ativação de mediadores pró-inflamatório e citocinas na fase precoce de expressão do gene. Já é bem conhecido que as lectinas são proteínas de ligação de açúcares que atuam tanto como moléculas pró- e anti-inflamatórias. Assim, o objetivo do presente trabalho foi o de verificar a ligação de um composto de polifenol com uma lectina de *Canavalia maritima* (ConM) com base na sua capacidade para inibir processos pró-inflamatórios. Para alcançar este objetivo, a ConM foi purificada e cristalizada, uma solução de 5 mM de resveratrol 5 mM foi utilizada para *soaking* durante 2 horas de incubação. Os cristais obtidos pertencem ao grupo espacial monoclinico C2, o refinamento final resultou em um *Rfactor* de 16,0% e uma *Rfree* de 25,5%. Resveratrol se liga na rígida através de pontes de hidrogênio e interação hidrofóbica com aminoácidos que compõem a quinta e sexta fita- $\beta$  da folha- $\beta$  rígida da ConM. A ConM complexada com o resveratrol inibiu a oxidação do DPPH, mostrando atividade sinérgica entre a proteína e o ligante com a relação mais eficaz de 2:3. Foi verificado ainda que o sítio de ligação a carboidratos não está diretamente relacionado à atividade antioxidante. É a interação entre ConM e resveratrol, que indica o sinergismo destas duas moléculas em agir como agentes sequestrantes de radicais livres que podem estarem relacionados a capacidade de redução do processo inflamatório através da inibição de muitos mediadores pró-inflamatórios por lectinas.

**Palavras-chave:** *Canavalia maritima*; resveratrol; antioxidante, lectina.

## ABSTRACT

Resveratrol is a natural antioxidant polyphenol found especially in grape epicarp, walnuts, and pomegranates, which can inhibit the activation of proinflammatory mediators and cytokines at the early gene expression stage. It is well known that lectins are sugar-binding proteins that act as both pro- and anti-inflammatory molecules. Thus, the objective of this work was to verify the binding of a polyphenol compound with a lectin of *Canavalia maritima* (ConM) based on their ability to inhibit pro-inflammatory processes. To accomplish this, ConM was purified and crystallized, and resveratrol was soaked at 5 mM for 2 hours of incubation. The crystal belongs to the monoclinic space group C2, the final refinement resulted in an  $R_{\text{factor}}$  of 16.0% and an  $R_{\text{free}}$  of 25.5%. Resveratrol binds in the rigid  $\beta$ -sheet through H-bonds and hydrophobic interaction with amino acids that compose the fifth and sixth  $\beta$ -strands of the rigid  $\beta$ -sheet of ConM. The ConM and resveratrol inhibited DPPH oxidation, showing synergic activity with the most effective ratio of 2:3 and carbohydrate binding site is not directly related to antioxidant activity. It is the interaction between ConM and resveratrol that indicates the synergism of these two molecules in acting as free radicals scavengers and in reducing the inflammatory process through the inhibition of many pro-inflammatory events.

**Keywords:** *Canavalia maritima*; resveratrol; antioxidant, lectin.

**LISTA DE ILUSTRAÇÕES**

<b>FIGURA 1</b> - Classificação estrutural de lectinas.....	25
<b>FIGURA 2</b> - Classificação das lectinas vegetais.....	28
<b>FIGURA 3</b> - Monômero típico de uma lectina de leguminosa.....	30
<b>FIGURA 4</b> - Representação da interação a metais das lectinas de leguminosas.....	31
<b>FIGURA 5</b> - Representação da área de superfície de um sítio de ligação a compostos hidrofóbicos.....	34
<b>FIGURA 6</b> - Mecanismo de ação dos antioxidantes primários.....	36
<b>FIGURA 7</b> - Representação estrutural dos isômeros do resveratrol.....	37
<b>FIGURA 8</b> - Representação estrutural da forma glicosilada do resveratrol.....	38
<b>FIGURA 9</b> - Purificação da ConM.....	50
<b>FIGURA 10</b> - Cristais de ConM.....	52
<b>FIGURA 11</b> - Grafico de Ramachandran das coordenadas da ConM.....	54
<b>FIGURA 12</b> - Estrutura Completa da ConM complexada com resveratrol.....	56
<b>FIGURA 13</b> - Representação do sítio de interação a metais da ConM.....	57
<b>FIGURA 14</b> - Estrutura tridimensional da ConM interagindo com o resveratrol no sítio de folhas- $\beta$ rígidas.....	58
<b>FIGURA 15</b> - Estrutura tridimensional do monômero da ConM complexado com resveratrol.....	59
<b>FIGURA 16</b> - Interação do resveratrol com os resíduos que compõem o sítio de ligação.....	60
<b>FIGURA 17</b> - Sobreposição do sítio de ligação a carboidrato da ConM nativa e ConM complexada com resveratrol.....	61
<b>FIGURA 18</b> - Docking molecular da forma glicosilada do resveratrol no sítio de ligação a carboidrato e no sítio das folhas- $\beta$ .....	63

## LISTA DE GRÁFICOS

- GRAFICO 1** - Atividade de sequestro de radicais livre da quercetina, ConM e resveratrol pelo ensaio do DPPH.....66
- GRAFICO 2** - Avaliação do efeito sinérgico entre ConM e resveratrol e o envolvimento do sítio de ligação a carboidrato no sequestramento de radicais livres.....67
- GRAFICO 3** - Avaliação da habilidade de quelação do íon ferroso efeito sinérgico entre ConM e resveratrol.....68
- GRAFICO 4** - Avaliação da inibição da oxidação do  $\beta$ -caroteno e efeito sinérgico entre ConM e resveratrol.....70



**LISTA DE TABELAS**

<b>TABELA 1</b> - Sete diferentes tipos de interface formados durante a oligomerização de lectinas de leguminosas.....	32
<b>TABELA 2</b> - Estatística da coleta de dados de difração de raios x, refinamento e qualidade da estrutura.....	53
<b>TABELA 3</b> – Contatos hidrófóbicos entre a lectina de <i>C. maritima</i> e o resveratrol.....	61
<b>TABELA 4</b> – Pontes de hidrogênio e interações de van der Waals entre resveratrol-3-O- $\beta$ -mono-D-glucosídeo (RMG) e resíduos no sítio de ligação a carboidratos.....	64
<b>TABELA 5</b> – Pontes de hidrogênio e interações de van der Waals entre resveratrol-3-O- $\beta$ -mono-D-glucosídeo (RMG) e resíduos no sítio de ligação ao resveratrol.....	64

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

**Abs** - Absorbância;

**ABU** - ácido alfa aminobutírico;

**AIA** - Ácido indolacético;

**AMPc** - Adenosina monofosfato cíclico;

**CAT** - Catalase;

**CGL** - Lectina de *Canavalia gladiata*;

**Cgran** - Lectina de *Canavalia grandiflora*;

**ConA** - Concanavalina A;

**ConBr** - Lectina de *Canavalia brasiliensis*;

**ConM** - Lectina de *Canavalia maritima*;

**CPL** - Lectina de *Camptosema pedicelatum*;

**COX** - Ciclo-oxigenase;

**CRLI** - Lectina manose específica de *Cymbosema roseum*;

**Da** – Daltons;

**DGL** - Lectina de *Dioclea grandiflora*;

**Dgran** - Lectina de *Dioclea grandiflora*;

**Dgui** - Lectina de *Dioclea guianensis*;

**DNA** - Ácido desoxirribonucleico;

**DPPH** - 2,2 difenil -1- picrilidrazil;

**Dros** - *Dioclea rostrata*;

**DRC** - Domínio de reconhecimento a carboidrato;

**DvirL** - Lectina de *Dioclea virgata*;

**DVL** - Lectina de *Dioclea violacea*;

**EG** - Etileno glicol;

**ERO** - Espécies reativas de oxigênio;

**FOM** - Figura do mérito;

**Fuc** - Fucose;

**GABA** - Ácido gama aminobutírico;

**Gal** - Galactose;

**GalNAc** - *N*-acetil galactosamina;

**Glc** - Glicose;

**GlcNAc** - *N*-acetil glicosamina;

**GNA** - Aglutinina de *Galanthus nivalis*;

**GPX** - Glutathione peroxidase;

**GS-I** - Isoforma I da lectina de *Griffonia simplicifolia*;

**GS-IV** - Isoforma IV da lectina de *Griffonia simplicifolia*;

**LDL** - Lipoproteína de baixa densidade;

**LNLS** – Laboratório Nacional de Luz Síncrotron;

**LTA** - Aglutinina de *Lotus tetragonolobus*;

**Man** - Manose;

**MDS** - Moldock Score;

**Min** – Minuto;

**NeuAc** - Ácido neuramínico;

**nm** - Nanômetros;

**NO** - Óxido Nítrico;

**PAGE** - Eletroforese em gel de poliacrilamida;

**PBS** - Tampão fosfato salino;

**PDB** - Banco de Dados de Proteínas;

**PEG** - Polietileno glicol;

**pH** - Potencial de hidrogênio;

**PHA** - Aglutinina de *Phaseolus vulgaris*;

**PNA** - Aglutinina de Peanuts;

**Ox-LDL** - Lipoproteína de baixa densidade oxidada;

**rDGL** - Lectina recombinante de *Dioclea grandiflora*;

**RIP** - Proteína Inativadora de Ribossomos;

**RMG** - Resveratrol-3-O- $\beta$ -mono-D-glucosídeo;

**rpm** - Rotação por minutos;

**SBA** - Aglutinina de *Glicine max*;

**SDS** - Dodecil sulfato de sódio;

**SOD** - Superóxido dismutase;

**Tris** - Tris(hidroximetil)aminometano;

**UEA** - Aglutinina de *Ulex europaeus*;

**U.H.** – Unidade Hemaglutinante;

**UV** - Ultravioleta;

**V<sub>m</sub>** - Volume de Matthews.

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\%$  - Porcentagem;

$=$  - Igual;

$\neq$  - Diferente;

$\pm$  - Mais-menos;

$^{\circ}\text{C}$  - Graus Celsius;

$\alpha$  - Alfa;

$\beta$  - Beta;

$\gamma$  - Gama;

$\varphi$  - Fí;

$\psi$  - Psi;

$\sigma$  - Sigma;

$\mu$  - Micro;

$\text{\AA}$  - Ångström

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>22</b>
1.1 Histórico das lectinas.....	22
1.2 Definições.....	23
1.3 Lectinas vegetais.....	25
1.4 Estruturas tridimensionais das lectinas de leguminosa.....	29
1.5 Antioxidantes.....	34
1.6 Resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno).....	36
1.7 Atividade antioxidante do resveratrol.....	39
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>41</b>
2.1 Objetivos gerais.....	41
2.2 Objetivos específicos.....	41
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>42</b>
3.1 Purificação da ConM.....	42
3.2 Atividade hemaglutinante.....	42
3.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS.....	43
3.4 Atividade antioxidante .....	43
3.4.1 Ensaio do DPPH.....	44
3.4.2 Habilidade de quelação de íons ferrosos.....	44
3.4.3 Degradação do $\beta$ -caroteno.....	45
3.5 Cristalização.....	45
3.6 Difração e coleta de dados.....	46
3.7 Substituição molecular e refinamento.....	46
3.8 Validação da estrutura por bioinformática.....	48
3.9 Docking molecular.....	48
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>50</b>
4.1 Purificação da ConM.....	50
4.2 Estrutura completa da ConM complexada com Resveratrol.....	51
4.3 Docking molecular da ConM com resveratrol glicosilado.....	62
4.4 Atividade antioxidante.....	65
<b>5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>73</b>
<b>6. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>74</b>
<b>7. ANEXO.....</b>	<b>88</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Histórico das lectinas

No final do século XIX, alguns estudos relacionados a proteínas com capacidade de aglutinar hemácias, foram explorados em trabalhos científicos por grupos que pesquisavam a toxicidade de extratos de plantas e venenos de serpentes. Essas proteínas eram chamadas de hemaglutininas ou fitohemaglutininas, pois eram em sua maioria encontradas em plantas. A primeira observação de uma atividade aglutinante derivada de lectinas foi descrita por Silas Weir Mitchell em 1860, em extrato de veneno de cobra *Crotalus durissus* (MITCHEL *et al.*, 1860, 1886). Já para as lectinas de plantas, acredita-se que o primeiro relato foi feito por Peter Herrman Stillmark em sua tese de doutoramento na universidade de Dorpat na Estônia com o título “Über Ricin ein giftiges Ferment aus den Samen von *Ricinus communis* L. und einigen anderen Euphorbiaceen” (Sobre a Ricina: Um fermento tóxico de sementes de *Ricinus communis* L. e algumas outras espécies de Euforbiácias). Ele havia isolado uma hemaglutinina altamente tóxica extraída de sementes de mamona (*Ricinus communis*) a qual denominou como ricina (STILLMARK, 1888). Subsequentemente, H. Hellin isolou também uma hemaglutinina tóxica de sementes de Jequirití (*Abrus precatorius*). Ambas se tornaram comercialmente disponíveis e foram utilizadas por Paul Ehrlich como antígenos modelos para estudos imunológicos, estabelecendo vários princípios fundamentais da imunologia através dessas proteínas (VAN DAMME *et al.*, 1998; SHARON; LIS, 2004).

Apenas em 1919, a primeira hemaglutinina foi purificada de sementes de feijão de porco (*Canavalia ensiformis*) por James B. Sumner na Universidade de Cornell (Estados Unidos). Em 1936, Sumner e Howell demonstraram que a Concanavalina A (ConA) possuía habilidade de aglutinar células como eritrócitos e fungos e precipitar glicoconjugados em solução. Sumner também demonstrou que esta atividade poderia ser inibida por sacarose, demonstrando pela primeira vez a especificidade dessas lectinas por açúcar. (SHARON; LIS, 2004).

A ideia de que a toxicidade é uma propriedade intrínseca das lectinas foi abandonada no início do século XX, depois que Ladsteiner e Raubitscheck, em 1907, relataram pela primeira vez a presença de uma lectina não tóxica nas leguminosas

*Phaseolus vulgaris* (feijão comum), *Pisum sativum* (ervilha), *Lens culinaris* (lentilha) e *Vicia sativa*. Após o trabalho de Landsteiner e Raubitscheck, muitas outras hemaglutininas vegetais não tóxicas foram descobertas. Tornou-se, a partir de então, evidente que lectinas estão difundidas no reino vegetal e que a toxicidade atribuída a elas é exceção, e não regra (VAN DAMME *et al.*, 1998). O marco seguinte na história das lectinas vegetais foi a descoberta realizada por Renkonen (1948), Boyd e Reguera (1949) de que algumas hemaglutininas exibem uma clara preferência por eritrócitos de um grupo particular de tipo sanguíneo dentro do sistema ABO. Começou-se a observar que algumas proteínas vegetais obtidas de sementes de plantas podiam reconhecer um grupo específico e aglutiná-lo e que hemácias do sistema ABO respondiam ao contato com essas hemaglutininas de maneira distinta, umas aglutinando e outras não (VAN DAMME *et al.*, 1998). A habilidade das aglutininas de plantas em distinguir eritrócitos de diferentes tipos sanguíneos levou Boyd e Shapleigh a proporem em 1954 o termo “lectina” (do latim *legere*, que significa selecionar ou escolher) para nomear essas proteínas (SHARON; LIS, 2004).

Outro grande marco na história das lectinas ocorreu em 1960, quando Petter C. Nowell demonstrou que a lectina de *Phaseolus vulgaris* (PHA) possui atividade mitogênica sobre linfócitos. Essa descoberta teve um impacto revolucionário sobre a imunologia, pois até aquele momento acreditava-se que os linfócitos eram células incapazes de se dividir ou de se diferenciar em outros tipos celulares (SHARON; LIS, 2004).

## **1.2 Definições**

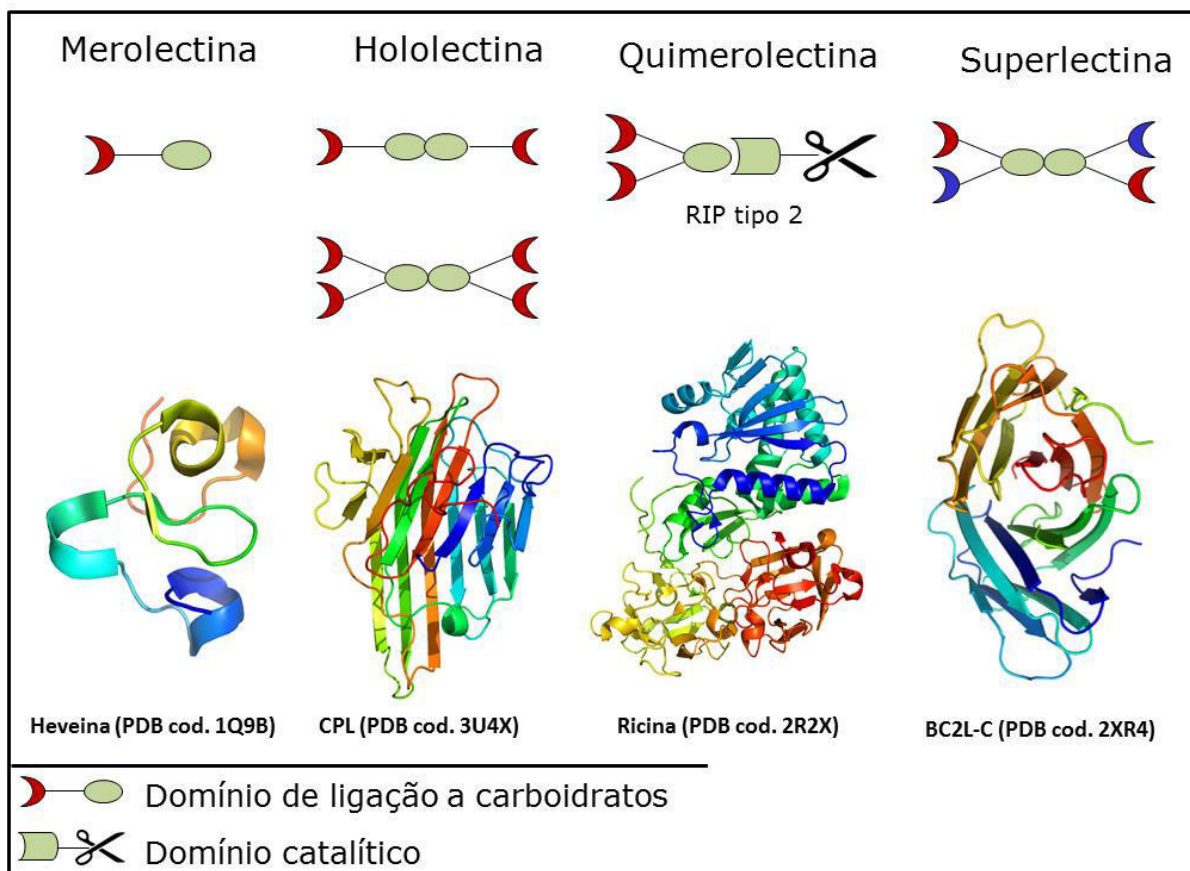
Lectinas são proteínas de origem não-imune com pelo menos um sítio de ligação não catalítico que reconhecem e interagem de forma reversível com carboidratos (PEUMANS; VAN DAMME, 1995). As lectinas foram primeiramente descritas por sua capacidade de aglutinar células sanguíneas através de ligações cruzadas com resíduos de açúcar presentes na superfície dessas células. Elas são classicamente consideradas um grupo heterogêneo de proteínas, com propriedades bioquímicas e atividades biológicas acentuadamente diferentes, apresentando funções biológicas em processos importantes como infecções (TOSCANO *et al.*, 2007), fertilização (TÖPFER-PETERSEN; CALVETE, 1996), câncer (GENG, 2003), transporte proteico (LIU *et al.*, 2000) e embriogênese (VASTA *et al.*, 2004). Também são ferramentas importantes na biologia,



histologia e medicina (VAN DAMME *et al.*, 1998), nos estudos em fisiologia vegetal e defesa de plantas (PEUMANS; VAN DAMME, 1995; DELATORRE *et al.*, 2007), bem como nos estudos de relações ecológicas com bactérias fixadoras de nitrogênio, constituindo micorrizas (MURDOCK; SHADE, 2002).

As lectinas são divididas estruturalmente em quatro grupos, merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas (Figura 1). As merolectinas consistem de apenas um domínio de ligação a carboidrato sendo, portanto, monovalentes e não possui a capacidade de aglutinar células e/ou precipitar glicoconjugados. As hololectinas são constituídas de domínios ligantes a carboidratos, porém contêm ao menos dois de tais domínios idênticos, ou seja, que se ligam a açúcares estruturalmente relacionados, sendo neste grupo que se encontram a maioria das lectinas de planta, que são di ou multivalentes e aglutinam células e/ou precipitam glicoconjugados. As quimerolectinas são proteínas de fusão consistindo de um ou mais domínios de ligação a carboidratos, dispostos de forma sequencial a um domínio não relacionado. Este último domínio pode ter uma atividade enzimática bem definida ou alguma outra atividade biológica que atua independentemente do domínio de ligação a carboidratos. Dependendo do número dos sítios de ligação a carboidratos, as quimerolectinas podem se comportar como merolectinas ou como hololectinas. Finalmente, as superlectinas são aquelas lectinas que se ligam pelo menos a dois tipos de carboidratos estruturalmente diferentes (PEUMANS; VAN DAMME, 1995). Mais recentemente, lectinas foram definidas como um dos grupos mais importantes de proteínas responsáveis por decifram o glicocódigo (GABIUS, 2000). Elas desempenham um papel central em uma variedade de eventos biológicos, como reconhecimento de moléculas em células e interações célula-célula (SHARON; LIS, 2004).

**Figura 1. Classificação estrutural de lectinas.** Representação esquemática de merolectinas (Heveína; PDB: 1Q9B), hololectinas (lectina de *Camptosema pedicelatum* CPL; PDB: 3U4X), quimerolectinas (Ricina; PDB: 2R2X) e superlectinas, (lectina da bactéria *Burkholderia cenocepacia* BC2L-C PDB: 2XR4).



### 1.3 Lectinas vegetais

Lectinas foram primeiramente identificadas em plantas no início do século XX, mas a comunidade científica teve um interesse maior por esta classe de proteínas a partir dos anos sessenta, coincidindo com o nascimento da glicobiologia. O interesse foi motivado principalmente pelo uso de lectinas na detecção, isolamento e caracterização de oligossacarídeos, na tipagem sanguínea e identificação de glicoconjugados, especialmente glicoproteínas. A grande descoberta de que certas condições fisiológicas e patológicas estavam associadas a alguma mudança no estado de glicosilação das células só foi possível através da utilização de lectinas. O número de publicações sobre lectinas tem visto um grande crescimento, principalmente devido à abundância de lectinas em todos os organismos vivos, com certa facilidade de purificação. Nos últimos anos a comunidade científica começou a considerá-las como moléculas bioativas, aumentando o interesse nas funções biológicas destas moléculas. Percebe-se de

imediate a extrema variabilidade das lectinas, primeiro em termos de estrutura primária, e, como resultado das primeiras estruturas resolvidas por difração de raios X, em termos de estrutura tridimensional (SHARON, 2007; LORIS, 2002).

A habilidade para o reconhecimento e ligação a carboidratos específicos distinguem as lectinas de todas as outras proteínas de plantas. Elas são classicamente consideradas um grupo heterogêneo de proteínas, pois apresentam propriedades bioquímicas e atividades biológicas acentuadamente diferentes, distintas estruturas moleculares e especificidades (PEUMANS; VAN DAMME, 1995).

Apesar das lectinas serem amplamente distribuídas no reino vegetal, abrangendo principalmente as famílias *Leguminosae*, *Gramineae*, *Algae*, *Euphorbiaceae*, entre outras, a família *Leguminosae* é a que apresenta o maior número de lectinas isoladas e destas destacam-se principalmente as de sementes (SHARON; LIS, 1993; PRAKASHKUMAR *et al.*, 1998; LORIS *et al.*, 1998), embora possam ser encontradas também em outras partes das plantas, como folhas (RATANAPO *et al.*, 2001), frutos (SAMPIETRO *et al.*, 2001), raízes de algumas *Convolvulaceae* (PEUMANS *et al.*, 1997) e tubérculos (SUSEELAN *et al.*, 2002).

Lectinas de vegetais são as mais bem caracterizadas dentre os grupos de lectinas estudadas. Algumas funções têm sido propostas para as lectinas vegetais, tais como: proteção contra patógenos e insetos, transporte e armazenamento de carboidratos, reconhecimento celular (dentro da célula, entre células ou entre organismos), proteínas de reserva ou reguladores de crescimento (PUSZTAI, 1991).

A interação de lectinas com carboidratos é bastante específica, tanto quanto a interação entre uma enzima e seu substrato, ou antígenos com anticorpos. As lectinas ligam-se a açúcares livres ou polissacarídeos, glicoproteínas ou glicolípídeos, que estão livres ou associados a membranas (PUSZTAI, 1991).

Lectinas vegetais apresentam-se distribuídas em vários grupos botânicos, incluindo mono e dicotiledôneas, musgos e líquens, mas são mais frequentemente estudadas em *Leguminosae* e *Euphorbiaceae* (PUSZTAI, 1991). Nos vegetais, as lectinas são encontradas em vários tecidos e apresentam diferentes localizações celulares, bem como diferentes propriedades moleculares. As lectinas são mais abundantes nas sementes, porém podem facilmente ser encontradas em outras partes

vegetativas. Em sementes de leguminosas estão prevalentemente nos tecidos cotiledonares (PUSZTAI, 1991).

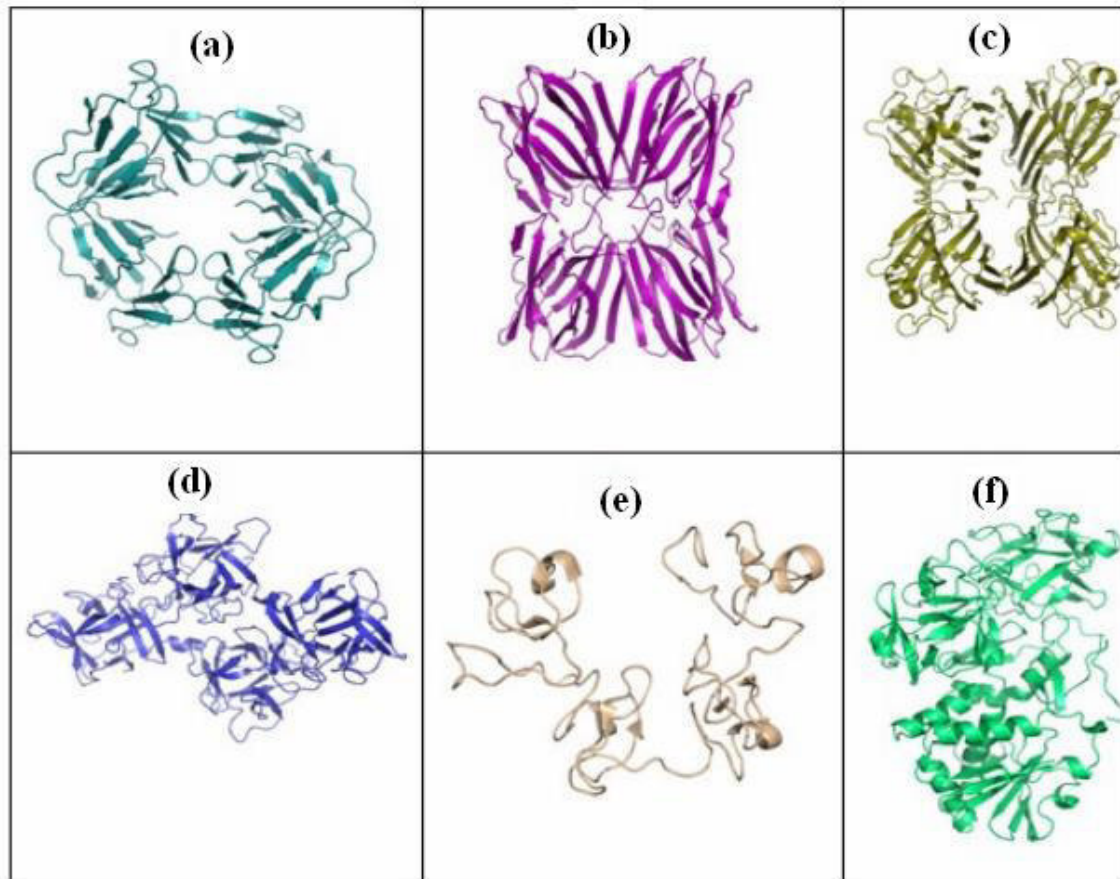
As lectinas de plantas são classificadas em sete grupos de acordo com as semelhanças estruturais e evolutivas. Esses grupos são nomeados de lectinas de leguminosas, lectinas ligantes à quitina, lectinas de monocotiledôneas, proteínas inativadoras de ribossomo tipo 2 (RIP), lectinas de floema de *Cucurbitaceae*, família da Jacalina e das *Amaranthaceae* (Figura 2) (VAN DAMME *et al.*, 1998).

As lectinas de leguminosas têm como principal representante a lectina isolada de sementes de *Canavalia ensiformis* (ConA). É uma proteína que requer cátions divalentes em sítio ligante a metal. Cada subunidade possui um íon  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$ , que é essencial para a atividade de ligação a carboidrato da lectina. Os aminoácidos envolvidos na ligação desses íons são altamente conservados (VAN DAMME *et al.*, 1998).

As proteínas ligantes à quitina (polímero de *N*-acetil-glicosamina) contêm o chamado domínio heveínico. O termo 'heveína' refere-se a uma pequena proteína de 43 resíduos de aminoácidos encontrada no látex da seringueira (*Hevea brasiliensis*) (WALJUNO *et al.*, 1975). As quitinases classe I, por exemplo, são quimerolectinas compostas de um único domínio heveína ligado a um domínio catalítico com atividade quitinásica. Essas lectinas também são encontradas em *Gramineae*, *Solanaceae*, *Urticaceae*, *Papaveraceae* e *Amaranthaceae* (COLLINGE *et al.*, 1993).

A lectina de bulbos de *Galantus nivalis* (GNA) foi a primeira lectina de monocotiledônea ligante de manose a ser isolada e caracterizada (VAN DAMME *et al.*, 1987). Desde então, proteínas similares têm sido encontradas em espécies de monocotiledôneas, como nas famílias *Amalyllidaceae*, *Alliaceae*, *Araceae*, *Liliaceae*, *Orchidaceae* e *Bromeliaceae* (PEUMANS; VAN DAMME *et al.*, 1995).

**Figura 2. Classificação das lectinas vegetais.** (a) Lectina de monocotiledôneas ligantes à manose, aglutinina de *Galanthus nivalis* (GNA PDB: 1MSA) (b) Lectinas relacionadas às Jacalinas, Jacalina (PDB: 1UGW), (c) Lectinas de leguminosas, aglutinina de *Ulex europaeus* (UEA PDB: 1FX5), (d) *Amarantina*, *Amarantina* (1JLX), (e) Lectina ligante à quitina compostas por domínios heveínicos, Heveína (PDB: 1Q9B) (f) RIP's do tipo II, Abrina (PDB: 2ZR1).



As proteínas inativadoras de ribossomos são quimerolectinas compostas de um polipeptídeo constituído de um domínio adenosina glicosidase (cadeia A) ligado ao domínio ligante a carboidrato (cadeia B) (STIRPE; BATTELLI, 2006). Ambas as cadeias são sintetizadas por uma única molécula precursora a qual é processada após a tradução através da excisão de uma ligação entre as cadeias A e B (VAN DAMME *et al.*, 1998; STIRPE; BATTELLI, 2006). A ricina (*R. communis*) e abrina (*A. precatorius*) são exemplos de RIP's tipo 2 com potentes atividades biológicas (VAN DAMME *et al.*, 1998).

A Jacalina é uma lectina de sementes da jaca (*Artocarpus integrifolia*) que apresenta especificidade a galactose. Lectinas de *Moraceae* são consideradas um grupo de lectinas que ocorrem excessivamente nesta particular família de plantas com

características da jacalina. Por repetirem-se em lectinas de outras famílias de plantas, muito provavelmente, a família jacalina também é uma superfamília de lectinas que ocorre em diferentes grupos taxonômicos (PEUMANS *et al.*, 2000).

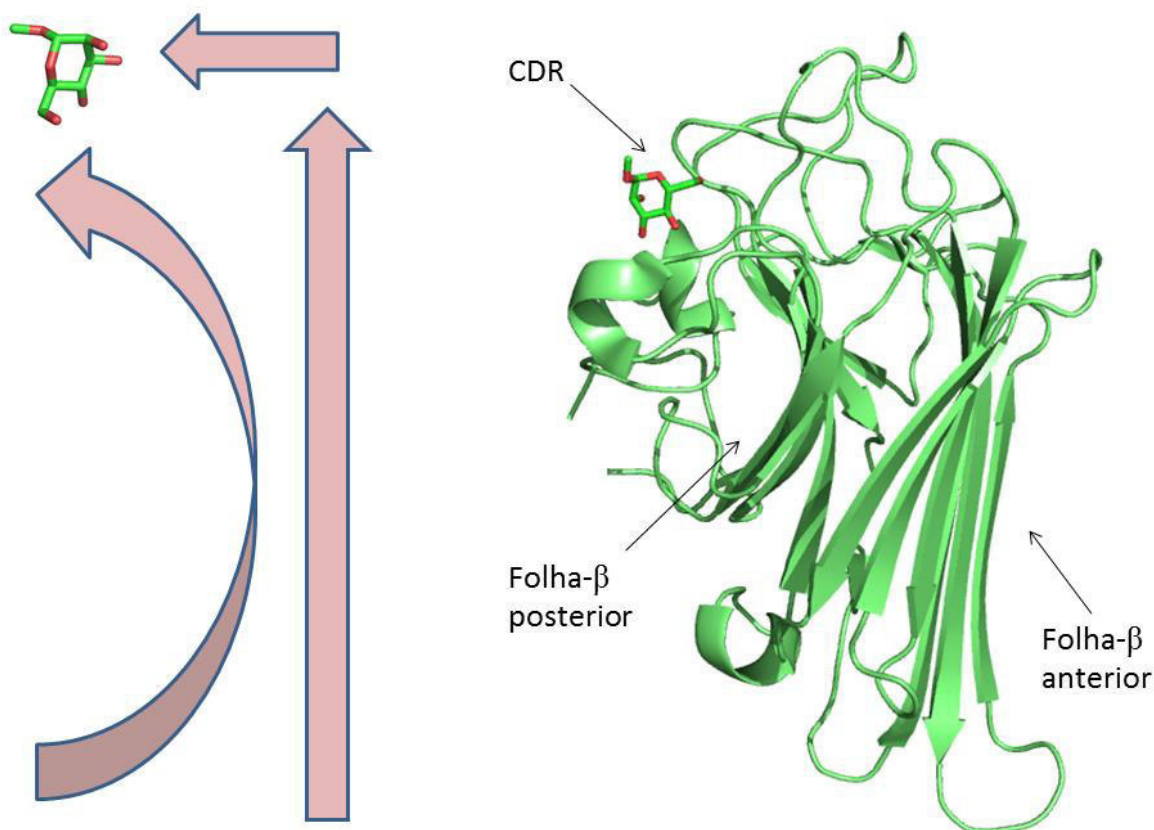
Muitas espécies de *Curcubitaceae* contêm alta concentração de lectinas que se ligam a oligômeros de GlcNAc (WANG *et al.*, 1994). Todas as lectinas conhecidas do floema de *Curcubitaceae* mostram um grau de similaridade sequencial entre si, mas não têm qualquer similaridade sequencial com outras lectinas de plantas ou outras proteínas (PEUMANS; VAN DAMME, 1998).

#### **1.4 Estruturas tridimensionais das lectinas de leguminosa**

A primeira lectina cristalizada foi a lectina da semente de *Canavalia ensiformis* (ConA) pelo o pesquisador James B. Sumner que utilizou a técnica para purificar esta proteína em 1919 (SUMNER, 1919). Passaram-se cinquenta e três anos até que sua estrutura tridimensional fosse elucidada por cristalografia de raios X em 1972 (EDELMAN *et al.*, 1972; HARDMAN *et al.*, 1972). Subsequentemente, outras lectinas de leguminosas foram cristalizadas e tiveram suas estruturas tridimensionais resolvidas. Hoje, existem vários grupos no mundo trabalhando com purificação e caracterização estrutural de lectinas vegetais.

Em geral, nas lectinas de leguminosas, a estrutura do monômero é bem conservada. Ela consiste principalmente de folhas- $\beta$ , que são conectadas por *loops*, em que se encontram cerca de 50% dos aminoácidos. O monômero é formado por duas folhas- $\beta$  de fitas antiparalelas: uma folha- $\beta$  composta por seis fitas antiparalelas, a folha- $\beta$  anterior, e outra composta por sete fitas, a folha- $\beta$  frontal (BANERJEE *et al.*, 1996). A principal região hidrofóbica está localizada entre as folhas frontal e anterior. Esse enovelamento terciário é conhecido como motivo “jelly-roll” (Figura 3) (WILLIAMS; WESTHEAD, 2002).

**Figura 3. Monômero típico de uma lectina de leguminosa.** Representação do motivo *jelly-roll* da lectina de *Canavalia brasiliensis* destacando o domínio de reconhecimento a carboidrato (DRC) e folhas- $\beta$  posteriores e anteriores.

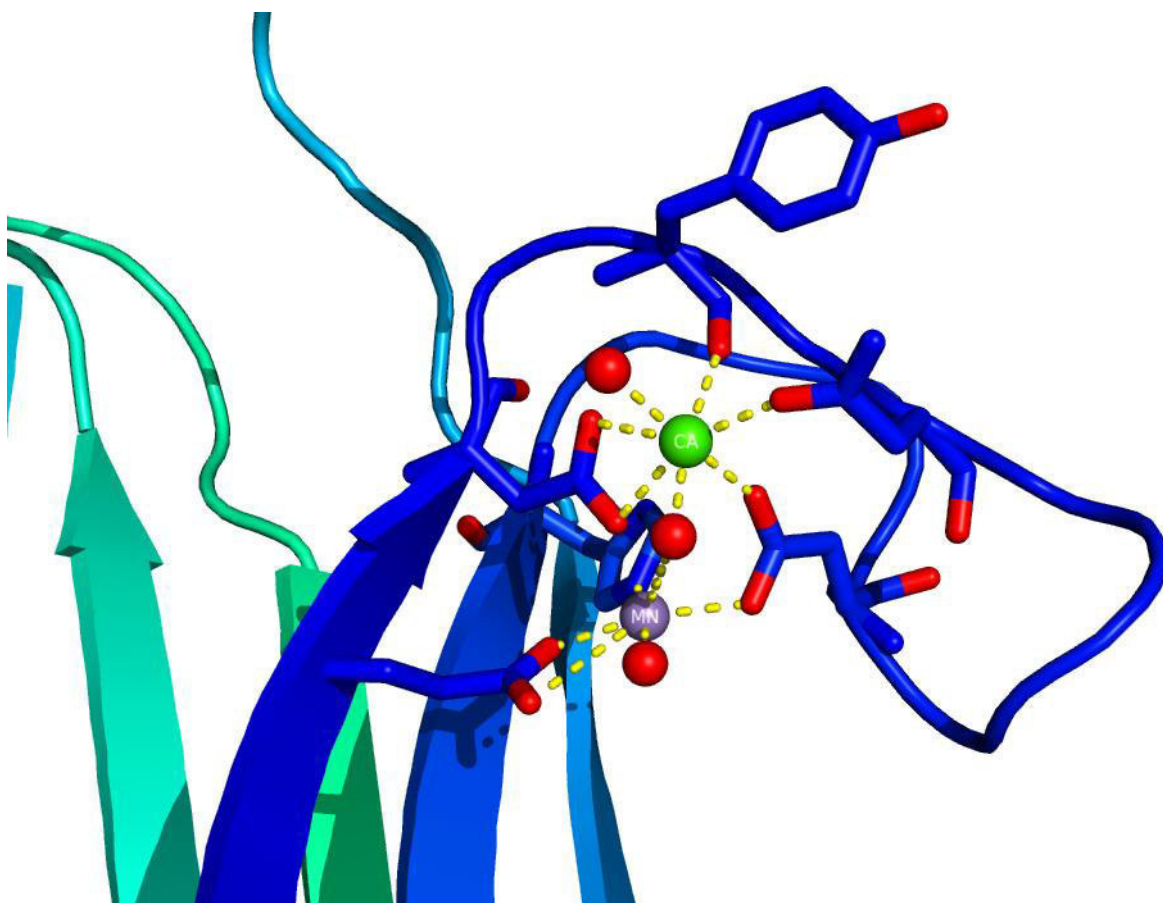


Na estrutura das lectinas de leguminosas, o domínio de ligação a carboidrato é estabilizado e ativado por íons de manganês e cálcio. Eles estão a uma distância de aproximadamente 4,5 Å um do outro e estão ligados por dois aspartatos. O evento chave na ativação do DRC pelos íons é a isomerização da ligação peptídica entre alanina 207 e aspartato 208 de trans para cis, cujo aspartato 208 é movido para uma posição de ligação a carboidrato (Figura 4). Na estrutura da ConA desmetalizada, o aspartato 208 se apresenta afastado do DRC (LORIS *et al.*, 1998). A ligação a carboidratos se dá, por interações apolares entre as porções apolares dos açúcares e resíduos de aminoácidos aromáticos (tirosina e fenilalanina), e por pontes de hidrogênio formadas entre as hidroxilas dos carboidratos e com cadeias laterais. Em lectinas de leguminosas o DRC é formado pelos resíduos de aminoácidos: Tyr12, Asn14, Leu99, Tyr100, Asp208 e Arg228. Dentre esses resíduos, há uma região de “loop” (97-102) onde se acredita ser a região que determina a especificidade por monossacarídeos das lectinas de leguminosas, podendo ser específicas a glicose/manose ou a galactose (LORIS, *et al.*, 1998). As regiões dos DRCs são conservadas nas lectinas de *Diocleinae*, mas na estrutura da



lectina de *Canavalia maritima* (ConM) há uma mutação no resíduo 202, a qual uma serina se encontra no lugar de uma prolina. Esse resíduo, apesar de não estar relacionado diretamente ao DRC, propicia um deslocamento da Tyr12 para dentro do DRC, o que lhe confere um aumento significativo na capacidade da ConM se ligar à dissacarídeos (GADELHA *et al.*, 2005).

**Figura 4. Representação em cartoon da interação a metais das lectinas de leguminosas.** Sítio de ligação a metais  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$  (esferas verde e lilás respectivamente) e interações com aminoácidos (representação em sticks) que estabilizam o sítio de ligação ao carboidrato na lectina de *Canavalia ensiformis* (ConA) PDB 1CVN.

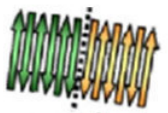
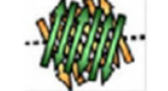
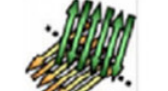
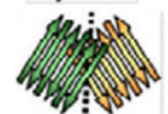


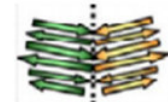


A estrutura quaternária das lectinas de leguminosas é composta de duas ou quatro subunidades, cada uma com um único sítio de ligação a carboidratos de mesma especificidade. As subunidades interagem por forças não covalentes. Em relação aos arranjos quaternários, essa família tem sido classificada em nove tipos, compostos por sete interfaces diméricas diferentes (BRINDA *et al.*, 2004; SINHA *et al.*, 2007). Esses sete modos de interação estão representados na tabela 1. Moreno *et al.*, (2008) relataram



um novo modo de interação observado na lectina de *Lotus tetragonolobus* (LTA), que forma um homotetrâmero composto de dois dímeros interagindo de modo X4 que interagem de forma invertida quando comparado com o tetrâmero da lectina de *Griffonia simplicifolia* (GS IV). Dentre os modos de interação, duas formas de associação são encontradas na estrutura quaternária das lectinas da subtribo *Diocleinae*. Os dímeros canônicos ou associação do Tipo II são estabilizados, principalmente, por pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas. A interação entre esses dímeros forma o tetrâmero, sendo essa associação chamada de interface X2. O dímero canônico é caracterizado pela associação lada a lado de duas folhas- $\beta$  anteriores, uma de cada monômero, formando, assim, uma folha- $\beta$  contínua de 12 fitas. A interface do dímero se forma de tal modo que as folhas- $\beta$  ficam face a face, formando estruturas rígidas.

**Tabela 1.** Sete diferentes tipos de interface formados durante a oligomerização de lectinas de leguminosas (Adaptado de Sinha *et al.*, 2007).

Tipos de interface	Exemplo e características	Ilustração
Interface canônica ou tipo II	Presente em lectinas diméricas como PSL e lectinas tetraméricas como ConBr.	
Interface X1	Observado na interface não canônica do tetrâmero de SBA e PHA.	
Interface X2	Observado apenas nos tetrâmeros com a interface não canônica de ConA e ConBr.	
Interface X3 ou “aperto de mão”	Observado nos dímeros de Ecol e WBA.	
Interface X4 ou “costa para costa”	Observado na PNA, GS4 e GS1.	
Interface X5	Observado na GS1, é a forma da interface X4 com um ângulo diferente e orientação mútua.	
Interface não usual	Observado na PNA entre as subunidades 3 e 4.	

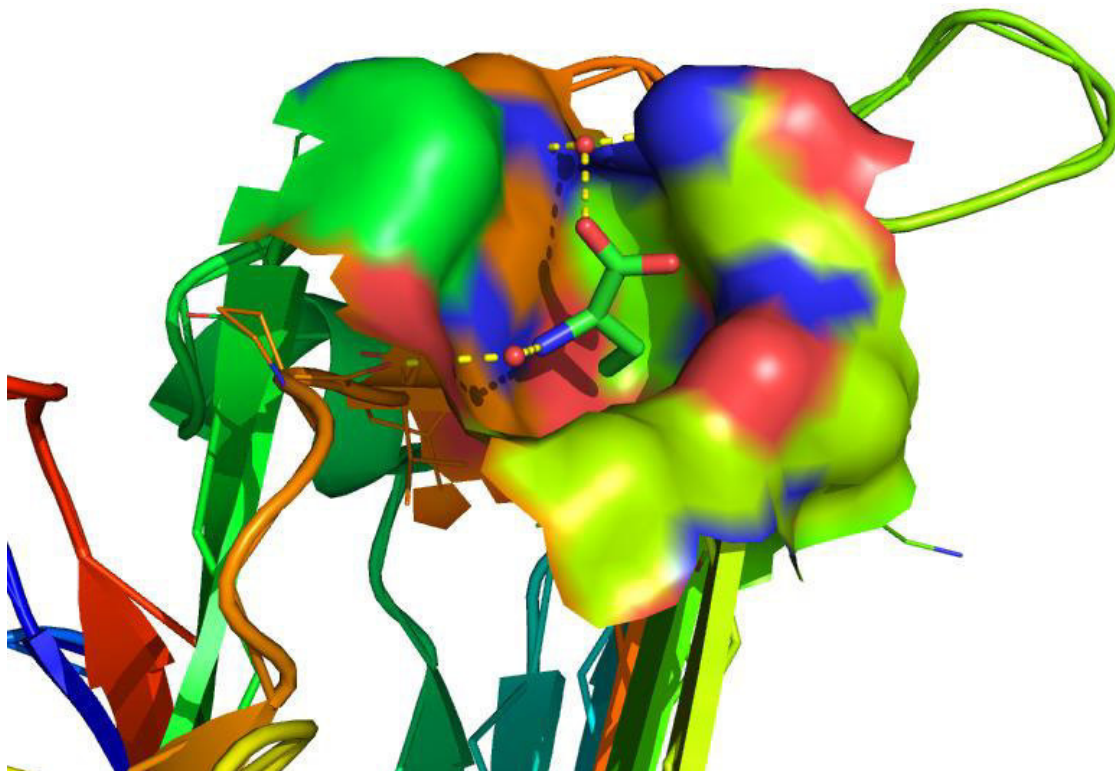
Os DRCs de cada monômero se encontram nos extremos dos dímeros. A estrutura quaternária pode apresentar rotações e/ou translações, se for comparada entre

as diversas lectinas da subtribo *Diocleinae*. Por exemplo, no caso da ConBr, os dímeros apresentam uma pequena rotação quando comparado com a ConA e a própria ConA, que ao ser complexada com um trimanosídeo apresenta uma pequena rotação nos dois monômeros do dímero quando comparada com a sua estrutura sem ligante. Isso demonstra que o tetrâmero é uma estrutura dinâmica (LORIS *et al.*, 1998).

Em grande parte das lectinas isoladas e purificadas de sementes da subtribo *Diocleinae*, o equilíbrio dímero-tetrâmero é dependente de pH. Elas são modelos excelentes para o estudo da interação entre monômeros de proteínas diméricas e tetraméricas (SRINIVAS *et al.*, 2001; WAH *et al.*, 2001) e vêm sendo estudadas para um melhor entendimento das interações proteína-proteína. Alguns estudos indicam que *loops* da cavidade central são pontos chave na estabilização da associação tetramérica dependente de pH das lectinas de *Diocleinae* (GALLEGO *et al.*, 2004; GALLEGO *et al.*, 2007). Nagano e colaboradores sugeriram que a força iônica nos contatos estabelecidos por His51, Arg60 e Asp78 podem ser modulados pelo pH, o que levaria a uma dependência na força iônica para a dissociação do tetrâmero em proteínas que sejam dependentes do pH para tetramerização (NAGANO *et al.*, 2008).

Além dos DRC, há também sítios hidrofóbicos que podem interagir com moléculas não polares, como acontece por exemplo entre a ConM e o ácido indolacético, um hormônio vegetal que está envolvido no crescimento da planta (DELATORRE *et al.*, 2013; EDELMAN; WANG, 1978). Também podemos encontrar outro sítio hidrofóbico na lectina de sementes de *Canavalia gladiata* (CGL) (Figura 5) (DELATORRE *et al.*, 2007) e em outras lectinas de leguminosas, por exemplo, nas lectina das sementes de *Dioclea wilsonii* (DwL), *Canavalia brasiliensis*, etc. (OLIVEIRA *et al.*, 2008; BEZERRA *et al.*, 2011; SRINIVAS, *et al.*, 2001), todas complexadas com o ácido aminobutírico, um aminoácido não protéico.

**Figura 5. Representação da área de superfície de um sítio de ligação a compostos hidrofóbicos.** Sítio de ligação ao aminoácido não-protéico ácido  $\alpha$ -aminobutírico na lectina de *Canavalia gladiata* (PDB:1WUV).

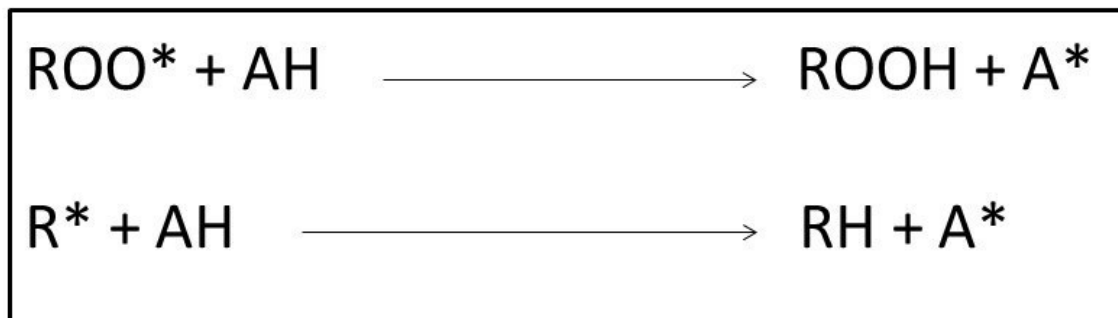


### 1.5 Antioxidantes

Antioxidantes são substâncias que retardam a velocidade da oxidação, através de um ou mais mecanismos tais como inibição de radicais livres e complexação de metais (PIETA, 2000). Eles podem ser sintéticos ou naturais e classificados como primários, sinergistas, removedores de oxigênio, biológicos, agentes quelantes e mistos (DUARTE-ALMEIDA *et al.*, 2006)

Antioxidantes primários são compostos fenólicos que promovem a remoção ou a inativação dos radicais livres formados durante a iniciação ou propagação da reação, através da doação de átomos de hidrogênios a estas moléculas, interrompendo a reação em cadeia (BAILEY, 1996). O mecanismo de ação deste tipo de oxidante está descrito na figura 6. Os antioxidantes mais conhecidos desta classe são os polifenóis tais com o hidroxianisol de butila (BHA), hidroxitolueno de butila (BHT), terc-butil-hidroquinona (TBHQ) e propil galato (PG).

**Figura 6. Mecanismo de ação dos antioxidantes primários.** ROO\* e R\* são radicais livres, AH – antioxidante com um átomo de hidrogênio, A\* - radical inerente.



Os antioxidantes sinergistas são moléculas com pouca ou nenhuma atividade antioxidante, que podem aumentar a atividade dos antioxidantes primários quando usados em combinações adequadas (BAILEY, 1996).

Os removedores de oxigênios são substâncias que atuam capturando oxigênio presente no meio, através de reações químicas estáveis, tornando-os conseqüentemente, indisponíveis para atuarem como propagadores da autoxidação. O ácido ascórbico e seus isômeros são exemplos de removedores de oxigênio (COUTO; CANNIATTI-BRAZACA, 2010).

Os antioxidantes biológicos incluem várias enzimas, como glicose oxidase, catalase e superóxido dismutase. Essas enzimas podem remover oxigênio, ou compostos altamente reativos de um sistema biológico (FERRO *et al.*, 2010; MAIA; BICUDO, 2009).

Os agentes quelantes complexam íons metálicos principalmente cobre e ferro, que catalisam a oxidação lipídica (BAILEY, 1996). Um par de elétrons na sua estrutura molecular promove a ação de complexação. Os exemplos mais comuns são os ácidos cítricos e o ácido etileno diamino tetra acético (EDTA).

Os antioxidantes mistos incluem compostos de plantas e animais que tem sido amplamente estudados como antioxidante, entre eles estão várias proteínas hidrolisadas, flavonoides e derivado de ácido cinâmico (CAVALCANTE, 2006)

Diversas técnicas têm sido utilizadas para determinar a atividade antioxidante *in vitro* das diferentes classes de antioxidantes, de forma a permitir uma

rápida seleção de substâncias e/ou misturas potencialmente interessantes, na prevenção de doenças crônico-degenerativas (HUANG; PRIOR, 2005). Dentre estes métodos destacam-se o sistema de co-oxidação do  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico e o método de seqüestro de radicais livres, tais como DPPH• - 2,2-difenil-1-picrilhidrazila. O método de oxidação do  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico avalia a atividade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoléico. O método está fundamentado em medidas espectrofotométricas da descoloração (oxidação) do  $\beta$ -caroteno induzida pelos produtos de degradação oxidativa do ácido linoléico (MARCO, 1968; MILLER, 1971). Igualmente ao sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico, o método de radicais livres está baseado no descoramento de uma solução composta por radicais estáveis DPPH• de cor violeta quando da adição de substâncias que podem ceder um átomo de hidrogênio. Entretanto, o primeiro método determina a atividade de uma amostra ou composto de proteger um substrato lipídico da oxidação, enquanto que o método de inibição de radicais DPPH• baseia-se na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um oxidante, alguns polifenóis como o resveratrol apresenta essa propriedade de transferir elétrons inibindo a oxidação de compostos (BRAND *et al.*, 1995; DE LA LASTRA; VILLEGAS, 2007).

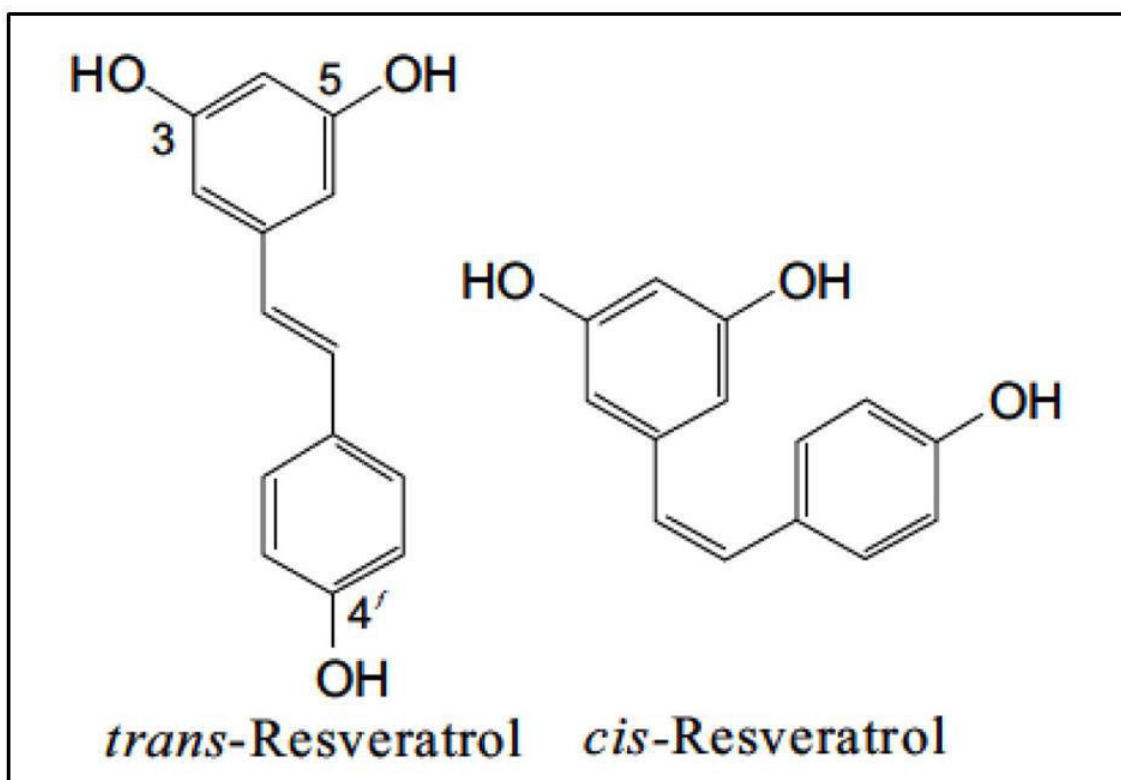
### **1.6 Resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno)**

A palavra resveratrol tem origem latina, onde “Res” significa “que veio de”, “*veratrum*” designa a planta onde foi primeiramente descoberta e “ol” indica a presença do grupamento álcool na sua estrutura. O resveratrol foi detectado em mais de 70 espécies de plantas, compreendidas em 32 gêneros (AGGARWAL *et al.*, 2004).

O resveratrol é um polifenol sintetizado nas plantas em resposta a estresses ambientais, tais como radiação UV e ataque de fungos, sendo assim classificado como uma fitoalexina (LANGCAKE; PRYCE, 1976). Por definição, fitoalexina é um produto do metabolismo secundário da planta, ou seja, não é essencial para os processos metabólicos básicos, e é sintetizado de novo, no momento em que a planta necessita se defender das condições ambientais adversas (KUC, 1995). No caso das uvas, o resveratrol é produzido quando esta é infestada pelo fungo *Botrytis cinera*. Esta produção ocorre na epiderme da folha e na casca do fruto, não sendo sintetizado na parte carnosa (CREASY; COFFEE, 1988).

O resveratrol pertence à classe dos estilbenos. A estrutura da molécula consiste em dois anéis fenólicos unidos por uma ligação dupla, que permite uma orientação cis e trans (Figura 7), sendo a forma trans mais estável e biodisponível. O precursor do resveratrol é a fenilalanina e a enzima estilbeno sintase catalisa a conversão desta em resveratrol (JEANDET *et al.*, 2002). Muitos pesquisadores estão tentando transferir o gene da estilbeno sintase para outras plantas a fim de melhorar a tolerância a fitopatógenos e aprimorar a qualidade nutricional dos alimentos. A transferência deste gene e a detecção do produto resveratrol foram realizadas com sucesso em tabaco, arroz, maçã, trigo, entre outros (DELAUNOIS *et al.*, 2009).

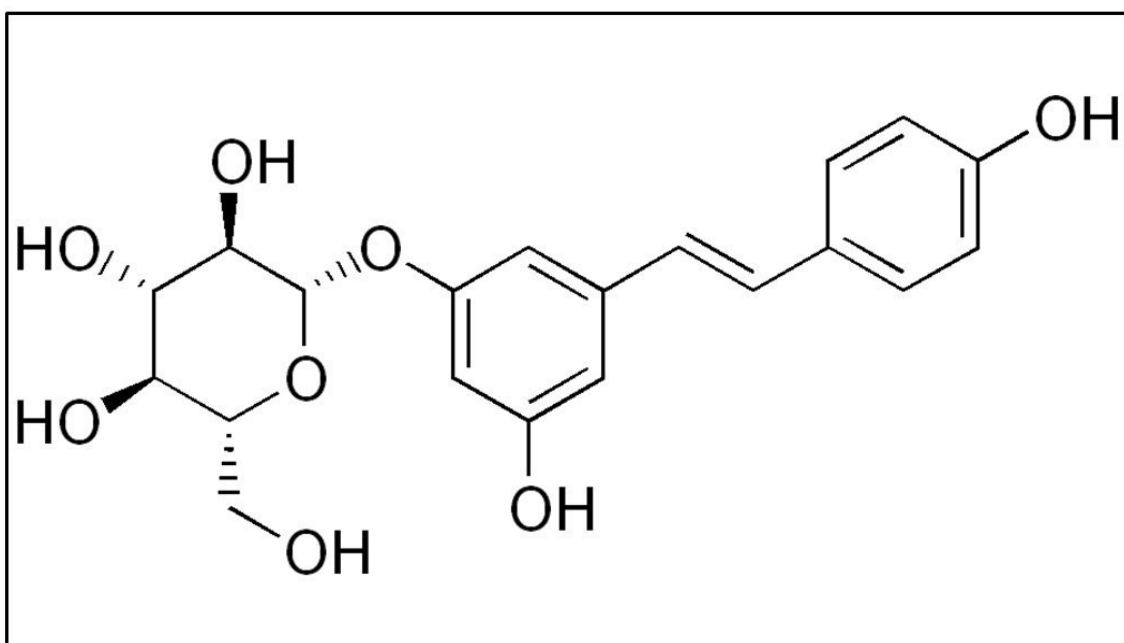
**Figura 7. Representação estrutural dos isômeros do resveratrol.** Estrutura do trans-resveratrol e cis-resveratrol.



O resveratrol é um polifenol natural encontrado especialmente no epicarpo da uva, nozes, e romã. Acredita-se que o resveratrol contribui para uma dieta mediterrânea rica em polifenóis por sua capacidade de prevenir algumas doenças cardíacas, surgimento de alguns tumores e atuar no retardo do envelhecimento por apresentar atividade antioxidante (BAUR *et al.*, 2006; FRANKEL *et al.*, 1993). Nos

sucos de uva e em *Poligonum cuspidatum*, foi observado que além do resveratrol na sua forma ativa, foi encontrado concentrações significantes da forma glicosilada do resveratrol (forma inativa) (resveratrol-3-O- $\beta$ - Mono-D-glicosidil), esta forma é cerca de sete vezes mais concentrado que resveratrol na uva e é provavelmente a forma mais abundantedo resveratrol na natureza (ROMERO-PEREZ *et al.*, 1999; REGEV-SHOSHANI *et al.*, 2003). A forma glicosilada tem seu carboidrato ligado na posição do C-3 substituinte de um grupo hidroxila (Figura 8). Esta substituição da origem a alterações conformacionais da molécula, por sua vez, resulta em alterações nas propriedades biológicas. A forma glicosilada do resveratrol é mais resistente a oxidações enzimática e bem mais solúvel em água ao contrário do resveratrol ativo. O transporte celular realizado via um mecanismo ativo por um carreador de glicose (ROMERO-PEREZ *et al.*, 1999).

**Figura 8. Representação estrutural da forma glicosilada do resveratrol.** Estrutura da forma inativa do resveratrol-3-O- $\beta$ - Mono-D-glicosidil.



O resveratrol tem meia vida curta no organismo, aproximadamente 8 a 14 minutos, e sua molécula primária é extensivamente metabolizada pelo organismo, sendo convertida a outros compostos secundários. A meia vida desses metabólitos é cerca de 9,2 horas, como o sulfato conjugado. Porém, outros compostos do vinho e da dieta podem modificar a disponibilidade e até agir sinergicamente ao resveratrol, o que

explicaria o fato de doses relativamente baixas do resveratrol obtidas a partir do consumo de vinho tinto poderem produzir efeitos benéficos mensuráveis *in vivo* (BAUR *et al.*, 2006).

O resveratrol é um potente agente antioxidante que pode atuar como sequestrador de espécies reativas de oxigênio (ERO). Além disso, o mesmo tem demonstrado a capacidade de regular peptídeos vasoativos tais como endotelinas, inibição de lipoproteínas de baixa densidade oxidada (ox-LDL) e ciclooxigenase, inibição liberação e neurotoxicidade de  $\beta$ -amiloides, modulação da via de sinalização de apoptose e modulação da atividade de sirtuin e proteína quinase ativada por AMPc, as quais acredita-se estarem envolvidas no efeito da restrição calórica (ALBANI *et al.*, 2010).

Estudos epidemiológicos mostraram uma associação entre consumo moderado de vinho e proteção contra doenças cardiovasculares. Também foi observado que o vinho possui atividade antioxidante, antiinflamatória e anti proliferativa *in vitro* e *in vivo* (MANACH *et al.*, 2005). Vinhos tintos são ricos em flavonoides, e outros constituintes polifenólicos, que demonstram *in vitro* a capacidade de inibir efeitos proaterogênico. (SOLEAS *et al.*, 1997), esses efeitos inclui, inibição de ox-LDL (FRANKEL *et al.*, 1993), inibição de agregação plaquetária e síntese de eicosanoides proaterogênicos (BERTELLI *et al.*, 1995; PACE-ASCIAK *et al.*, 1995), inibição da proliferação celular (HSIEH *et al.*, 1999), aumento no vaso relaxamento (PACE-ASCIAK *et al.*, 1996), e inibição de danos ao DNA devido a presença de espécies reativas de oxigênio (ERO) (LEONARD *et al.*, 2003).

### **1.7 Atividade antioxidante do resveratrol**

O resveratrol é um potente antioxidante encontrado em uvas, a sua capacidade de remover radicais livres do meio se deve à presença de uma dupla ligação conjugada na sua estrutura como demonstrado na figura 7, (KHANDUJA; BHARDWAJ, 2003). A inibição da oxidação de LDL por polifenóis como o resveratrol que está presente no vinho tinto pode desempenhar importante papel na diminuição da taxa de mortalidade de pessoas que consomem essa bebida (BELQUENDOZ *et al.*, 1997). O resveratrol previne a oxidação do LDL *in vitro* através da quelação do cobre, bem como por seqüestrar radicais livres. Em ratos hipertensos propensos ao infarto, resveratrol significativamente reduz marcadores do estresse oxidativo como albumina glicada no



soro e 8-hidroxi-guanosina na urina (BAUR; SINCLAIR, 2006). Nos vegetais alguns agentes oxidantes como as espécies reativas de oxigênio (ERO) são liberadas em respostas a ataques a planta. Essas ERO podem ocasionar danos a DNA da planta.

EROs incluem os radicais livres, tais como ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), radical hidroxila ( $\bullet OH$ ), bem como moléculas não radicais, como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), oxigênio atômico ( $^1O_2$ ), entre outros (O'BRIEN, *et al.*, 2012). EROs desempenham um papel importante nos processos de sinalização de plantas, controle do crescimento, desenvolvimento e respostas bióticas e abióticas (BAILEY-SERRES; MITTLER, 2006). No entanto, todas as EROs são extremamente prejudiciais para os organismos em concentrações elevadas, podendo causar vários efeitos biológicos, incluindo, apoptose e necrose celular (SHARMA, *et al.*, 2012). O acúmulo de EROs induzidas por estresses é reduzido por sistemas antioxidantes que incluem uma variedade de agentes enzimáticos, tais como, a superóxido dismutase, ascorbato peroxidase, glutatona peroxidase, glutatona transferase, e catalase e metabolitos não-enzimáticos de baixo peso molecular tais como, ascorbato, glutatona,  $\alpha$ -tocoferol, carotenóides e flavonoides, por exemplo, resveratrol (GILL; TUTEJA, 2010)

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Resolver e analisar a estrutura tridimensional da lectina de sementes de *Canavalia maritima* complexada com resveratrol e correlacionar a interação com a atividade antioxidante.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Purificar a lectina de *Canavalia maritima* (ConM);
- Determinar a atividade antioxidantes da lectina e do resveratrol através da capacidade de sequestro de radicais livres;
- Obter cristais da lectina ConM.
- Difratar e obter conjuntos de dados de difração dos cristais da ConM;
- Resolver a estrutura tridimensional da proteína em complexo com resveratrol;
- Analisar a estrutura e discutir as correlações entre o complexo lectina-resveratrol e a atividade e antioxidante.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Purificação da ConM

As sementes de *Canavalia maritima* foram descascadas e submetidas a maceração até se obter um pó fino na forma de farinha, apropriada para o processo de extração protéica. Foi utilizada a cromatografia de afinidade em matriz de Sephadex G-50 onde a concentração de proteínas nas frações coletadas foi monitorada por absorvância em comprimento de onda de 280 nm como descrito por Ramos e colaboradores (1996).

Previamente, a farinha foi submetida à extração protéica na proporção de 1:10 (m/v) em solução de NaCl 0,15 M por 3 horas. O extrato foi aplicado à coluna e deixado em contato com a matriz por 8 horas previamente equilibrada com solução de NaCl 0,15 M contendo CaCl<sub>2</sub> 5 mM e MnCl<sub>2</sub> 5 mM. Após o contato, a fração não retida foi eluída com a mesma solução de equilíbrio e a fração retida foi eluída com NaCl 0,15 M e glicose 0,1 M. A fração retida, referente à lectina, foi dialisada exaustivamente contra água destilada e liofilizada, sendo o material liofilizado utilizado para os passos seguintes.

#### 3.2 Atividade Hemaglutinante

Amostras de sangue de coelhos foram lavadas adicionando-se solução de NaCl 0,9% e, em seguida, centrifugando-se as misturas a 3.000 rpm por 5 minutos, descartando o sobrenadante. Esse procedimento foi repetido por sete vezes, ou até que o sobrenadante remanescente da centrifugação se tornasse totalmente límpido.

A atividade hemaglutinante foi testada no extrato total e nas frações de purificação segundo o método descrito por Moreira & Perrone (1977), utilizando-se solução a 3% de hemácias.

Os testes foram realizados em placas de microtitulação com poços com fundo em V, contendo 8 fileiras de 12 poços cada, que foram preenchidos com 50 µL de solução de NaCl 0,15 M e em seguida acrescidos 50 µL do extrato no primeiro poço de cada fileira. A amostra então foi diluída de forma seriada, com homogeneização e transferência de 50 µL para o poço seguinte até o penúltimo poço da fileira, sendo descartados os 50 µL referentes ao último poço. Após as diluições, foram adicionados

50  $\mu$ L da suspensão de eritrócitos a 2%. A placa foi mantida em repouso por 1 hora em estufa a 37 °C.

Os títulos de hemaglutinação foram medidos em termos de U.H. (Unidade Hemaglutinante) como a concentração de proteínas remanescentes no último poço de uma diluição seriada ainda capaz de causar hemaglutinação visível, através da seguinte equação exponencial:  $U.H. = 2^n$ ; onde n corresponde ao número do último tubo da diluição onde foi possível detectar hemaglutinação.

### **3.3 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida na Presença de SDS**

A avaliação da homogeneidade, o grau de pureza e a massa molecular aparente da amostra obtida, referente à lectina, foi realizada seguindo metodologia descrita por Laemmli (1970). A amostra não reduzida foi diluída em tampão Tris-HCl 0,0625 M, pH 8,3, a uma concentração protéica final de 4 mg/mL. Foi acrescentado ao tampão utilizado, SDS a uma concentração final de 1% e quantidade suficiente de glicerol de modo a deixar a solução densa, além de azul de bromofenol 0,02%, para monitorar a frente da corrida da eletroforese. Para a amostra reduzida, foi acrescentado também  $\beta$ -mercaptoetanol e a suspensão foi exposta a calor úmido de 100°C por 10 minutos.

O gel de empilhamento utilizado continha a concentração de 3,5% de poliacrilamida na presença de tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8, com SDS 1%. O gel de separação continha a concentração de 12,5% de poliacrilamida em Tris-HCl 3 M, pH 8,8 com SDS a 1%.

A corrida eletroforética foi realizada a uma variação de voltagem de até 200 V, de potência de até 5 W, com uma amperagem constante de 20 mA. O tampão de corrida utilizado foi Tris 0,025 M-Glicina 0,192 M SDS 0,1%, pH 8,8.

Após a corrida, o gel de separação foi submetido a uma fixação em uma solução aquosa contendo 25% metanol e 10% ácido acético, por um período mínimo de 1 hora. O gel, então fixado, foi corado em solução de Coomassie R-250 a 0,05% diluído em metanol, ácido acético e água a uma proporção 1:3,5:8 (v/v/v). O excesso do corante foi removido com lavagens em água destilada quente.

### **3.4 Atividade antioxidante**

Para avaliação e caracterização da atividade antioxidante foram realizados os ensaios de sequestro do DPPH, habilidade de quelação de íons ferroso (FIC) e degradação do  $\beta$ -caroteno (BCB). Mecanismos pelos o quais a ConM e resveratrol podem atuar.

### 3.4.1 Ensaio do DPPH

A capacidade da ConM e do Resveratrol de sequestrar radicais livres foi analisado utilizando o teste do DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil) segundo método de Blois (1958) com algumas modificações. Quercitina foi usada como controle positivo. Antes do ensaio antioxidante, a lectina foi incubada com manose 100 mM para verificar se há o envolvimento do domínio de reconhecimento a carboidratos com a atividade antioxidante 0,2 mL de metanol e 0,3 mL de ConM em diferentes concentrações (5-100  $\mu$ g/mL) ou resveratrol (5-100  $\mu$ M) foram misturados em tudo de ensaio de 10 mL. DPPH (2,5 mL na concentração de 160  $\mu$ M em metanol) foi adicionado a mistura obtendo um volume final de 3,0 mL. A solução foi mantida a temperatura ambiente por 30 min, e a absorção lida a 517 nm usando um leitor de microplacas (Biochrom Asys UVM 340). A percentagem do radical DPPH sequestrado foi calculada a partir da equação 1:

$$(1) \text{ Efeito sequestrante} = \left[ 1 - \frac{Abs_{amostra} - Abs_{branco}}{Abs_{controle}} \right] \times 100\%$$

Onde  $Abs_{controle}$  = DPPH sem amostra;  $Abs_{amostra}$  = amostra e DPPH e  $Abs_{branco}$  = amostra sem DPPH

### 3.4.2 Habilidade de quelação de íons ferrosos

A habilidade de quelação do íon ferroso foi determinado pela metodologia de Wang, Jónsdóttir e Ólafsdóttir, (2009), através da adição de 1,35 mL de água destilada, 50  $\mu$ L de cloreto ferroso ( $FeCl_2$ ) 2 mM e 100  $\mu$ L de ferrozine 5 mM a tubos contendo 1 mL do EDTA (12  $\mu$ M), ConM (5-100  $\mu$ g/mL) ou resveratrol (5-100  $\mu$ M), compondo, assim, a amostra. Para o branco da amostra, 100  $\mu$ L de ferrozine 5 mM foram substituídos por 100  $\mu$ L de água destilada, enquanto que para o controle, 1 mL do extrato será substituído por 1 mL de água. Os tubos (amostra, o branco da amostra e o

controle) foram incubados por 10 min em temperatura ambiente, e as absorbâncias mensuradas em 562 nm utilizando uma leitora de microplaca Assys UVM 340. A atividade foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$(2) \text{ Quelação do íon ferroso}(\%) = \frac{[\text{Abs}_{\text{controle}} - (\text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{branco}})]}{\text{Abs}_{\text{controle}}} \times 100\%$$

### 3.4.3 Degradação do $\beta$ -caroteno

A degradação do  $\beta$ -caroteno foi realizado de acordo com a metodologia de Chew e colaboradores (2008). Foram adicionados 3 mL de  $\beta$ -caroteno (1 mg 10 mL<sup>-1</sup> clorofórmio) e 40 mg de ácido linoleico a 400 mg do Tween 40. O clorofórmio da mistura foi evaporado em um evaporador rotativo, e 100 mL de H<sub>2</sub>O Milli-Q saturada de O<sub>2</sub> foram adicionados à mistura, seguindo-se vigorosa agitação até a formação de uma emulsão. Para a amostra, foram adicionados 3 mL dessa emulsão e 1 mL do BHA (12  $\mu$ M), ConM (5-100  $\mu$ g/mL) e resveratrol (5-100  $\mu$ M). As absorbâncias foram lidas em 470 nm utilizando uma leitora de microplaca Assys UVM 340, imediatamente após a preparação da emulsão ( $\text{Abs}_{\text{inicial}}$ ) e depois 1 h de incubação em banho-maria a 50°C ( $\text{Abs}_{1\text{h}}$ ). A atividade antioxidante foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$(3) \text{ Atividade antioxidante}(\%) = \left( \frac{\text{Abs}_{1\text{h}}}{\text{Abs}_{\text{inicial}}} \right) \times 100\%$$

### 3.5 Cristalização

A proteína liofilizada, previamente purificada, foi suspensa em água Milli-Q na concentração final de 12,5 mg.mL<sup>-1</sup>. A suspensão da proteína foi então centrifugada à 9.000 rpm por 10 min e o sobrenadante foi utilizado para os passos futuros. Para experimentos com o ligante, a proteína em solução foi encubada com resveratrol na concentração final de 5 mM por 5 horas antes dos experimentos de cristalização. A proteína foi então submetida ao “screen” de cristalização, utilizando o método da matriz esparsa inicialmente descrito por Jancarik e Kim (1991). O kit utilizado foi o “crystal screen 1” (Hampton Research) onde as variáveis iniciais foram pH, força iônica e precipitantes. O método utilizado foi o de difusão de vapor em gota

suspensa utilizando placas de cristalização Linbro<sup>®</sup> de 24 poços. Foram colocados em cada poço da placa de cristalização 300 µL da solução do kit (condição de cristalização) e a gota foi composta por 2 µL da solução de proteína e 2 µL da condição de cristalização. O poço foi então coberto por lamínulas siliconizadas utilizando graxa de silicone para vedação, as placas foram deixadas em repouso a temperatura de 20 °C. Após a obtenção de cristais, foi feita a otimização dessa condição de cristalização variando a concentração de precipitante e o pH (7,0 a 8,5) da solução, repetindo o método da difusão de vapor. Essa otimização visou melhorar a condição de formação do cristal, produzindo assim, um cristal com características necessárias (monocristal, tamanho, espalhamento) para que ele pudesse ser difratado quando submetido ao feixe de raios X.

### 3.6 Difração e coleta de dados

Os dados de difração de raios X foram coletados a temperatura de 100 K. Para evitar formação de gelo os cristais foram mergulhados em uma solução crioprotetora composta de 70% da solução de cristalização e 30% de polietileno glicol 400. O cristal laçado com o loop foi alinhado manualmente utilizando-se um goniômetro e então submetido à coleta de dados na estação experimental MX1 do Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (Campinas-SP), usando comprimentos de onda de 1,42 Å e detector utilizado foi CCD 165 mm (Mar Research). Para determinar a estratégia de coleta, foram coletadas inicialmente 4 imagens em diferentes ângulos  $\Phi$  ( $\varphi$ ) para definir os parâmetros de cela e a mosaicidade com o intuito de calcular o melhor ângulo de oscilação através da equação 4:

$$(4) \quad \theta = \left( \text{Arctg} \frac{\text{Resolução}}{\text{Maior parâmetro de cela}} \right) - \text{Mosaicidade}$$

Um conjunto de 120 imagens foi coletado com oscilação de 1°, totalizando 120°. Os dados foram processados, indexados e integrados utilizando-se o programa MOSFLM (LESLIE, 1997) e as intensidades reduzidas utilizando-se o programa SCALA (EVANS, 1997). Todos os programas utilizados fazem parte do pacote CCP4 (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994). No processamento são observadas as intensidades de cada ponto de difração e os índices de Miller, que são números inteiros utilizados para identificar os pontos de difração no espaço recíproco.

### 3.7 Substituição molecular e refinamento

Para solucionar o problema da fase foi adotado como método a substituição molecular usando o programa MolRep (VARGIN; TEPLYAKOV, 1997). As coordenadas atômicas usadas como modelo foram obtidas da lectina *Canavalia marítima* complexada com maltose (PDB ID 2CYF) (DELATORRE et al., 2006), porém tanto o ligante quanto as moléculas de água foram removidos do arquivo de coordenadas. Após a utilização de operações de simetria de rotação e translação obteve-se a melhor solução de acordo com os parâmetros *Rfactor* e o coeficiente de correlação, admitindo como modelo com qualidade a ser refinado os resultados que apresentaram valores de *Rfactor* e coeficiente de correlação, (equações 5 e 6 respectivamente) inferior de 40% e acima de 60%, respectivamente.

$$(5) \quad R_{factor} = \frac{|F_{obs}| - |F_{calc}|}{|F_{obs}|}$$

$$(6) \quad CC = \frac{\Sigma ab - (\Sigma a \Sigma b)/N}{\{ [\Sigma a^2 - (\Sigma a)^2/N ]^{1/2} \} \{ [\Sigma b^2 - (\Sigma b)^2/N ]^{1/2} \}}$$

$$\text{Onde } a = |F_{obs}| \text{ e } b = |F_{calc}|$$

Inicialmente a estrutura foi submetida a 10 ciclos de refinamento de corpo rígido, após os resultados obtidos os ciclos foram reduzidos para 4 devido este apresentar a melhor solução para os parâmetros avaliados, *Rfactor*, *Rfree* e FOM. Posteriormente, os dados foram submetidos a 15 ciclos de refinamento de restrições, sendo estes reduzido apenas a 5 ciclos por apresentar melhores soluções para os mesmos parâmetros, usando o programa REFMAC5 (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994). Os dados das coordenadas da estrutura gerada no refinamento foram analisados no programa Coot, onde foi feito refinamento de posição com mudança do posicionamento das cadeias laterais orientado-as para dentro das



densidades eletrônicas, visualizadas no mapa (2Fo-Fc) a  $1\sigma$ . Também foram realizadas deleção de resíduos de aminoácidos a partir do modelo utilizado na construção da estrutura. O mapa de densidade eletrônica não explicada (Fo-Fc) foi visualizado a  $2,5\sigma$ , e uma varredura foi realizada no intuito de encontrar densidades não explicadas. Após detecção da densidade que correspondia ao ligante, as coordenadas do resveratrol foram adicionadas nas coordenadas da estrutura e posteriormente o ligante foi posicionado dentro da densidade eletrônica. Por fim, moléculas de água foram adicionadas ao mapa não explicado (Fo-Fc) visualizado a  $2,0\sigma$ , seguido da análise individual e posicionamento de cada molécula de água dentro da nuvem eletrônica, finalizando com mais 3 ciclos de refinamento de restrição.

### 3.8 Validação e análise da estrutura

A qualidade estereoquímica da estrutura da ConM avaliadas pelo gráfico de de Ramachandran a partir do programa PROCHECK do pacote CCP4 e o programa online MOLPROBITY (DAVIS *et al.* 2007) que busca os valores das rotações phi ( $\varphi$ ) e psi ( $\psi$ ) do carbono- $\alpha$  dos resíduos de aminoácidos. Os fatores de vibração térmica também foram utilizados para avaliar a correção no posicionamento dos aminoácidos, dos ligantes e das moléculas de água. As interações de van der Waals, contatos polares e hidrofóbicos foram analisados no programa CONTACT do pacote CCP4 com corte de distâncias de 3,5 Å, 3,5 Å e 5,0 Å, respectivamente. Todas as figuras e sobreposições de estruturas foram realizadas pelo programa PyMOL (DELANO, 2002).

### 3.9 Docking molecular

A estrutura da ConM foi submetida a um docking molecular com o resveratrol glicosilado no domínio de reconhecimento a carboidratos e no sítio da folha- $\beta$ . A estrutura tridimensional do resveratrol glicosilado foi obtida do software PRODRG (SCHÜTTELKOPF; VAN AALTEN, 2004). O docking molecular foi realizado utilizando o software Molegro Virtual Docker usando o método Moldock (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006). O Moldock é baseado em uma pesquisa algorítmica que é combinada com evolução diferencial e um algoritmo de predição de cavidades. Um procedimento de re-docking foi adicionado para aumentar a precisão de encaixe nos sítios de ligação detectados. O MolDock Score (MDS) foi calculado usando funções de pontuações. Inicialmente foi realizado 10 corridas com o GRID de resolução de 0,30 Å, número máximo de interações foi de 2.000, o tamanho da população de 200 e 10 poses.

A energia de interação proteína-ligante foi expressa em uma unidade arbitrária na forma de MolDock score (MDS) (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006), onde a valores mais negativos refletem interações mais fortes. O MDS foi calculado conforme a equação 7,  $MDS = E_{inter} + E_{intra}$  onde  $E_{inter}$  é a energia de interação entre proteína e ligante (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006).

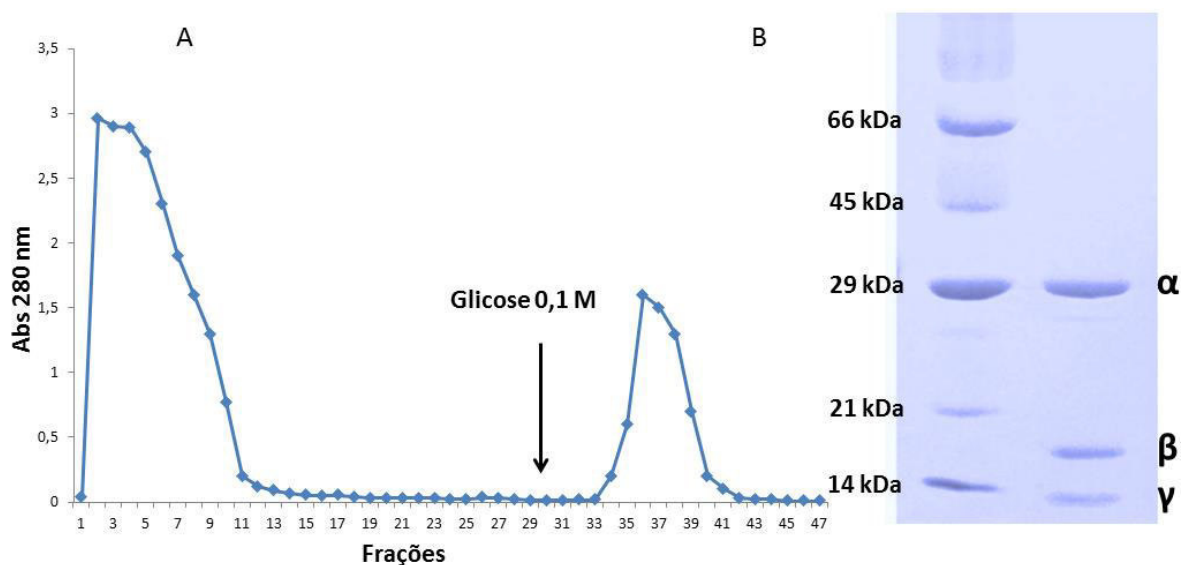
$$(7) \quad E_{inter} = \sum_{i \in ligand} \sum_{j \in ligand} \left[ E_{PLP}(r_{ij}) + 332.0 \frac{q_i q_j}{4r_{ij}^2} \right]$$

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Purificação da ConM

A ConM foi purificada por cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-50 a qual foi retida pelas ligações cruzadas do gel de dextrose e eluída por competição com com 0,1 M de glicose como descrito por Ramos e colaboradores (1996). Após a eluição o cromatograma apresentou dois picos, sendo o primeiro correspondente à fração não retida e o segundo à fração retida (Figura 9A). A fração retida corresponde à lectina purificada da semente de *Canavalia maritima*.

**Figura 9. Purificação da ConM.** (A) Perfil cromatográfico da ConM em coluna Sephadex G-50 equilibrada com NaCl 0,15 M contendo 5 mM de CaCl<sub>2</sub> e MnCl<sub>2</sub>, eluída com 100 mM de D-Glicose contendo NaCl 0,15 M (B) SDS-PAGE. Linha 1: marcadores de massa molecular (albumina sérica bovina, 66 kDa; ovalbumina, 45 kDa; anidrase carbônica, 29 kDa; inibidor de tripsina, 21 kDa and  $\alpha$ -lactoalbumina, 14 kDa) linha 2: ConM.



Várias outras lectinas da subtribo *Diocleinae* já foram isoladas por cromatografia de afinidade em Sephadex G-50. Essa matriz é caracterizada por separar moléculas de acordo com o tamanho da proteína, mas, por ser composta basicamente de moléculas de glicose foi utilizada como matriz de afinidade para isolamento dessas lectinas específicas por glicose/manose. Lectinas da subtribo *Diocleinae*, como é o caso

da lectina da espécie de *Canavalia maritima*, apresentam perfil cromatográfico bastante semelhantes (MOREIRA; CAVADA, 1984; VASCONCELOS *et al.*, 1991; OLIVEIRA *et al.*, 1991; MOREIRA *et al.*, 1996; CAVADA *et al.*, 1996a; CAVADA *et al.*, 1996b; MOREIRA *et al.*, 1997; CALVETE *et al.*, 1999; CECCATTO *et al.*, 2002). O primeiro experimento de isolamento de uma lectina por cromatografia de afinidade foi realizado pelo pesquisador Irwin J. Goldstein que purificou a lectina de sementes de *Canavalia ensiformis*, a ConA, por cromatografia de afinidade em gel Sephadex a partir do protocolo de extração descrito por James B. Sumner (GOLDSTEIN, 2010).

A eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (Figura 9B) confirmou a homogeneidade da amostra, revelando uma maior banda de aproximadamente 30 kDa (cadeia  $\alpha$ ) e duas bandas menores correspondendo às cadeias ( $\beta$  e  $\gamma$ ) de aproximadamente 16 kDa e 13 kDa respectivamente, essas bandas são característico das lectinas da subtribo *Diocleinae* (CALVETE *et al.*, 1999). A presença de tais fragmentos observado na eletroforese da ConM é devido a um processamento pós-traducional chamado de permutação circular descrito primeiramente por Carrington e colaboradores (1985). Esse processo envolve uma clivagem proteolítica em uma região interna de um precursor gerando os fragmentos  $\beta$  e  $\gamma$ . Esses fragmentos são então religados em uma ordem inversa àquela no qual o precursor foi sintetizado, produzindo a cadeia  $\alpha$ . Como a religação não é 100% eficiente, podemos observar, através da eletroforese, que mesmo na fração purificada os fragmentos estão presentes.

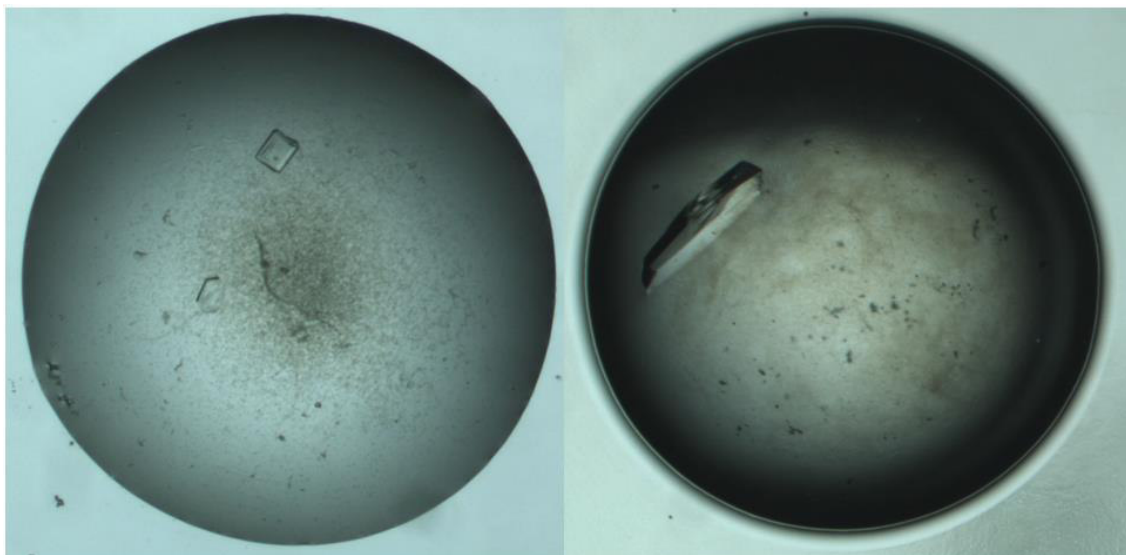
A cadeia  $\alpha$  se mostra mais evidente, mas é possível a visualização clara de  $\beta$  e  $\gamma$ . Perfis de proteínas com alto peso molecular podem ser observados, podendo tais perfis representar oligomerizações das cadeias  $\alpha$  ou o precursor que não foi processado (pre-pró-proteína). O perfil eletroforético da ConM é bastante semelhante a proteínas da subtribo *Diocleinae*, podendo ser caracterizada como uma lectina do tipo ConA.

#### **4.2 Estrutura completa da ConM complexada com Resveratrol**

Cristais irregulares de ConM cresceram após uma semana na condição N° 39 do *Screen I* do kit de cristalização da Hampton Research que continha 100 mM de HEPES pH 7,5 com 2,0 M de sulfato de amônio e 2% de PEG 400 segundo Gadelha e colaboradores 2005 (Figura 10A), Várias etapas de otimizações foram realizadas variando pH e concentração de precipitante. Cristais de ConM cresceram em 100 mM

de Hepes (pH 8,5) contendo 2,0 M de sulfato de amônio e 2% de PEG 400 com dimensões máxima de 0,1 x 0,2 x 0,15 mm (Figura 10B).

**Figura 10. Cristais de ConM.** (a) Pequenos cristais obtidos com a condição N° 39 do *Screen I*. (b) Cristal obtido após otimização.



Cristais da ConM difrataram a uma resolução máxima de 2,5 Å usando radiação Síncroton na estação MX1 do Laboratório Nacional de Luz Síncroton (LNLS) Campinas – SP. O conjunto de 180 imagens foi indexado, integrado e escalonado a 2,5 Å. O cristal apresentou grupo espacial monoclinico C2 com parâmetros de cela  $a=119,7$  Å,  $b=67,5$  Å,  $c=70,4$  Å,  $\alpha=90^\circ$   $\beta=125,8^\circ$   $\gamma=90^\circ$ . O coeficiente de Matthews  $2,26 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$  (MATTHEWS, 1968) foi calculado baseado no peso molecular da proteína 25.500 Da e implica que o cristal continha 48,18% de solvente, indicando a presença de um dímero por unidade assimétrica.

Os dados foram escalados com um total de 142.177 reflexões, sendo 15.213 reflexões únicas, revelando 95,6% (94,4%) de completudeza,  $R_{\text{merge}}$  a 9,4 (40,6) e  $(I/\sigma)$  em 5,7 (1,9), sendo os valores em parêntesis referentes a camada de maior resolução (2,6 – 2,5 Å). Todas as estatísticas da coleta de dados estão descritas na tabela 2.

**Tabela 2.** Estatística da coleta de dados de difração de raios x, refinamento e qualidade da estrutura.

<b>Parâmetros</b>	<b>Valores</b>
<b>Coleta de dados</b>	
Comprimento de onda	1,42 Å
Grupo espacial	C2
Parâmetros da cela unitária Å	
A	119,7
B	67,5
C	70,4
Número de reflexões torais	142177
Número de reflexões únicas	15213
Número de moléculas por unidade assimétrica	2
Limite de resolução	27,7 – 2,5 (2,6 – 2,5)
Rmerge (%)	9,4 (40,6)d
Completeza (%)	95,6 (94,4)d
Multiplicidade	2,6 (2,6)d
I/(σ)	5,7 (1,9)d
<b>Substituição molecular</b>	
Coeficiente de correlação	67,5
Rfactor <sub>b</sub> (%)	37,5
<b>Refinamento</b>	
Faixa de resolução (Å)	27,7 – 2,5
Rfactor <sub>b</sub> (%)	16,0
Rfree <sub>c</sub> (%)	25,5
Número de resíduos em unidade assimétrica	474
Número de moléculas de água	89
<b>R.M.S.D</b>	
Comprimento de ligação (Å)	0,013
Ângulos de ligação (graus)	1,835
<b>Média do B fator para toda a cadeia da proteína (Å)</b>	<b>45,19</b>
<b>Gráfico de Ramachandran</b>	
Resíduos em regiões mais favorecidas (%)	86,7
Resíduos em regiões adicionalmente permitidas (%)	12,6
Resíduos em regiões não permitidas (%)	0,8

$$^a R_{merge} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I(hkl) - \langle I(hkl)i \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_i \langle I(hkl)i \rangle}$$

$I(hkl)i$  é a intensidade da primeira medição da reflexão h

e  $I(hkl)$  é o valor médio de  $I(hkl)i$  para todas as medições I.

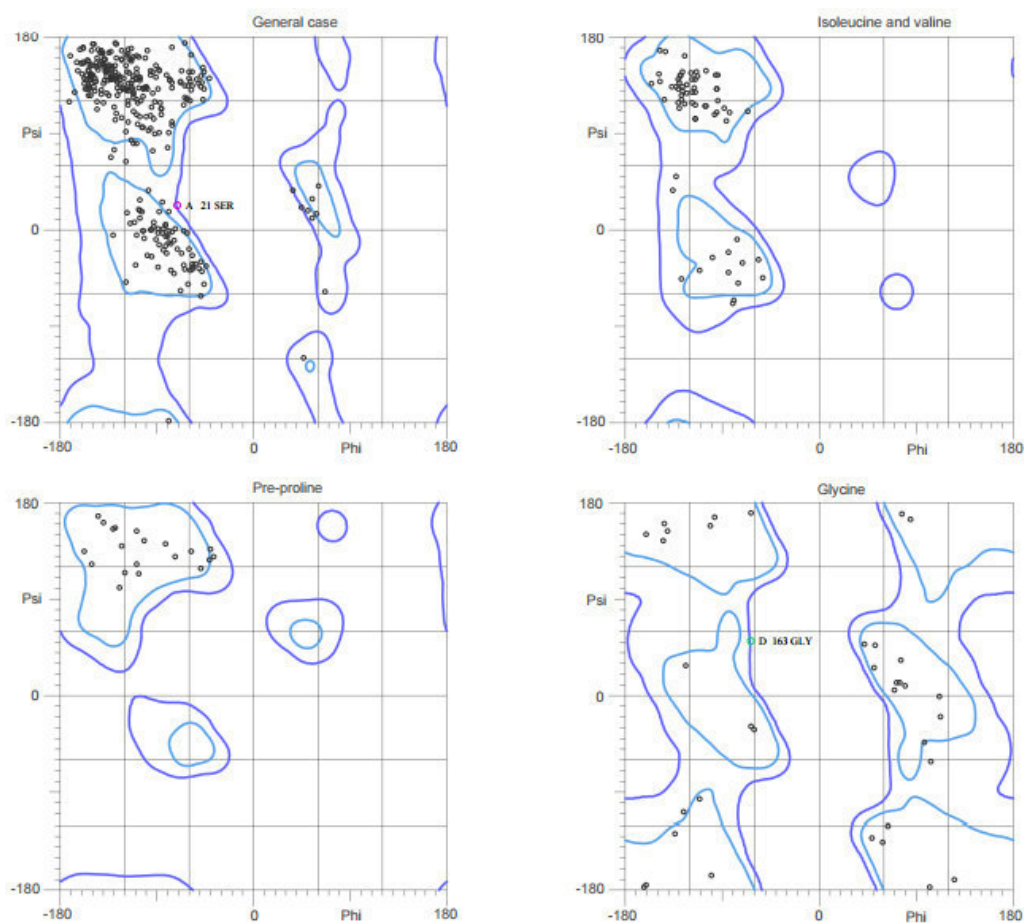
$$^b R_{factor} = \frac{|F_{obs}| - |F_{calc}|}{|F_{obs}|}$$

<sup>c</sup>Calculada com 5% dos valores omitidos no refinamento.

<sup>d</sup>Valores em parenteses representam a resolução da ultima camada.

O refinamento de corpo rígido da estrutura da ConM apresentou um *Rfactor* de 30,96 e *Rfree* de 33,95 seguido de 7 ciclos de refinamento de restrições com *Rfactor* 18,7, *Rfree* 27,4 e FOM de 79,3%. Após a adição das moléculas de água e do ligante, a estrutura foi novamente submetida a um refinamento de restrição com um *Rfactor* e *Rfree* finais de 16,0 e 25,5 respectivamente e o FOM de 80%. O ligante resveratrol apresentou um B-fator de 11,06 Å, o que está dentro dos valores esperados para vibrações térmicas de ligantes em estrutura de proteínas que vai até um valor máximo de 30 Å. A qualidade estereoquímica da estrutura foi avaliada no programa PROCHECK baseado nas torções psi ( $\psi$ ) e phi ( $\psi$ ) das ligações do carbono- $\alpha$ , com 96,7% dos resíduos em regiões mais favorecidas, 12,6% dos resíduos em regiões adicionalmente permitidas e 0,8% resíduo em regiões não permitidas, mostrando que a estrutura final da ConM apresentou um bom parâmetro estereoquímico (Figura 11) e fatores de vibração termica (Tabela 2).

**Figura 11. Grafico de Ramachandran das coordenadas da ConM.** Pontos dentro dos círculos azuis claros e escuros representam regiões permitidas e generosamente permitidas de ocupação por resíduos discriminados em cada gráfico, respectivamente.

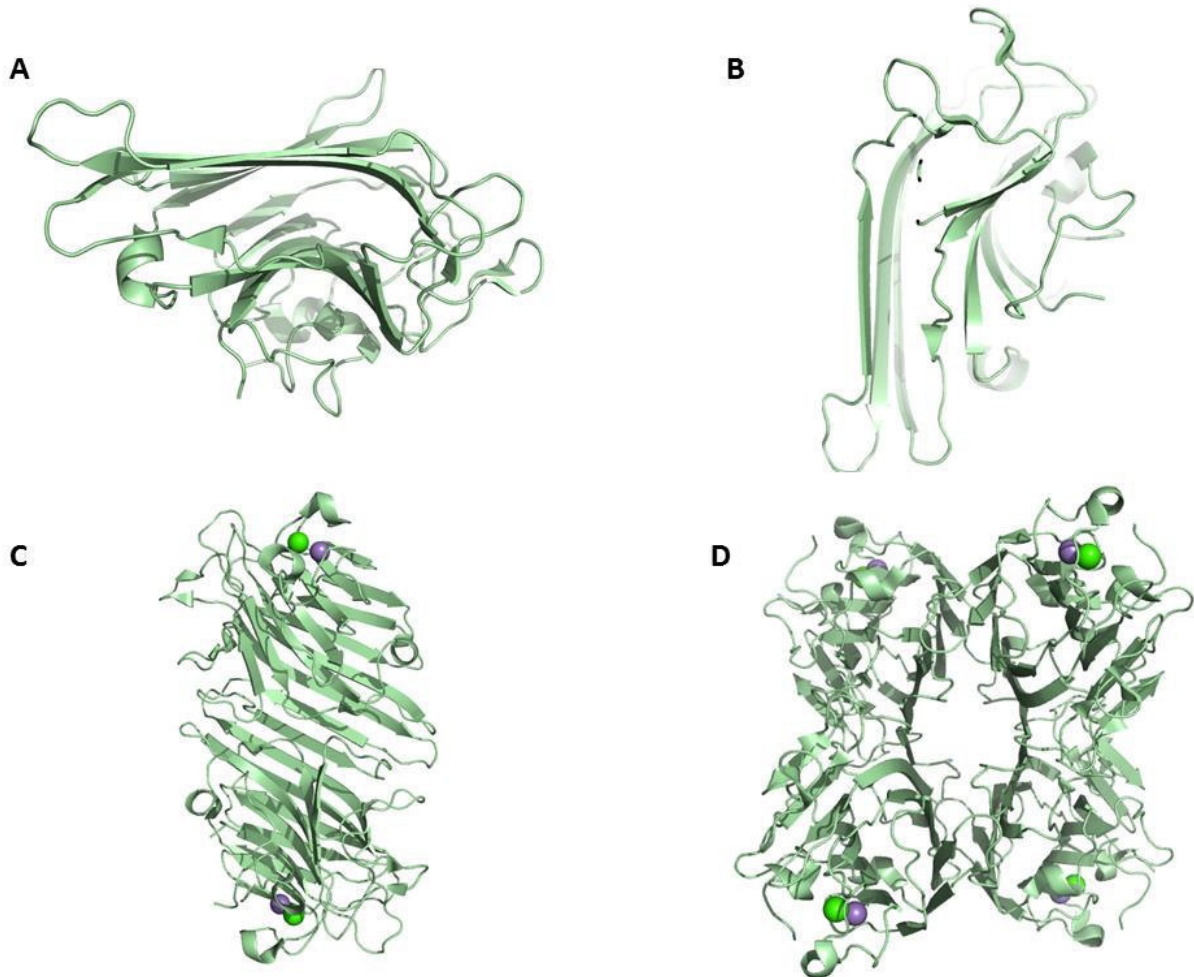


Além da visão geral dos resíduos, o gráfico de Ramachandran mostra em detalhes regiões permitidas e generosamente permitidas, para os resíduos de glicina, pois este resíduo apresenta uma grande mobilidade devido a sua pequena cadeia lateral, (um átomo de hidrogênio). Como observado na figura 11, os resíduos também estão dentro das posições esperadas para uma boa estrutura predominando em regiões permitidas. Outros dois parâmetros avaliados no gráfico de Ramachandran são o posicionamento dos resíduos de prolina que geralmente provocam uma curvatura na estrutura tridimensional, estando geralmente em regiões mais flexíveis como nos *loops*, bem como o posicionamento dos demais resíduos que antecedem as prolinas que também apresentam uma flexibilidade distinta devido ao dobramento na estrutura pela presença da prolina. Ambos estão em regiões estimadas, validando assim a estrutura da ConM (Figura 11).

A estrutura do dímero da ConM complexada com resveratrol consiste de 474 resíduos de aminoácidos apresentando os domínios  $\beta$ -sanduíche/*Jelly-roll* que consiste de duas folhas- $\beta$  antiparalela uma contendo seis fitas- $\beta$  e outra contendo sete fitas- $\beta$ , como observado em várias outras lectinas de leguminosas, (BRINDA, *et al.*, 2004) (Figura 12A e B). O tetrâmero da ConM consiste de dois dímeros canônicos ligados por interações iônicas entre as folhas beta (Figura 12C e D).

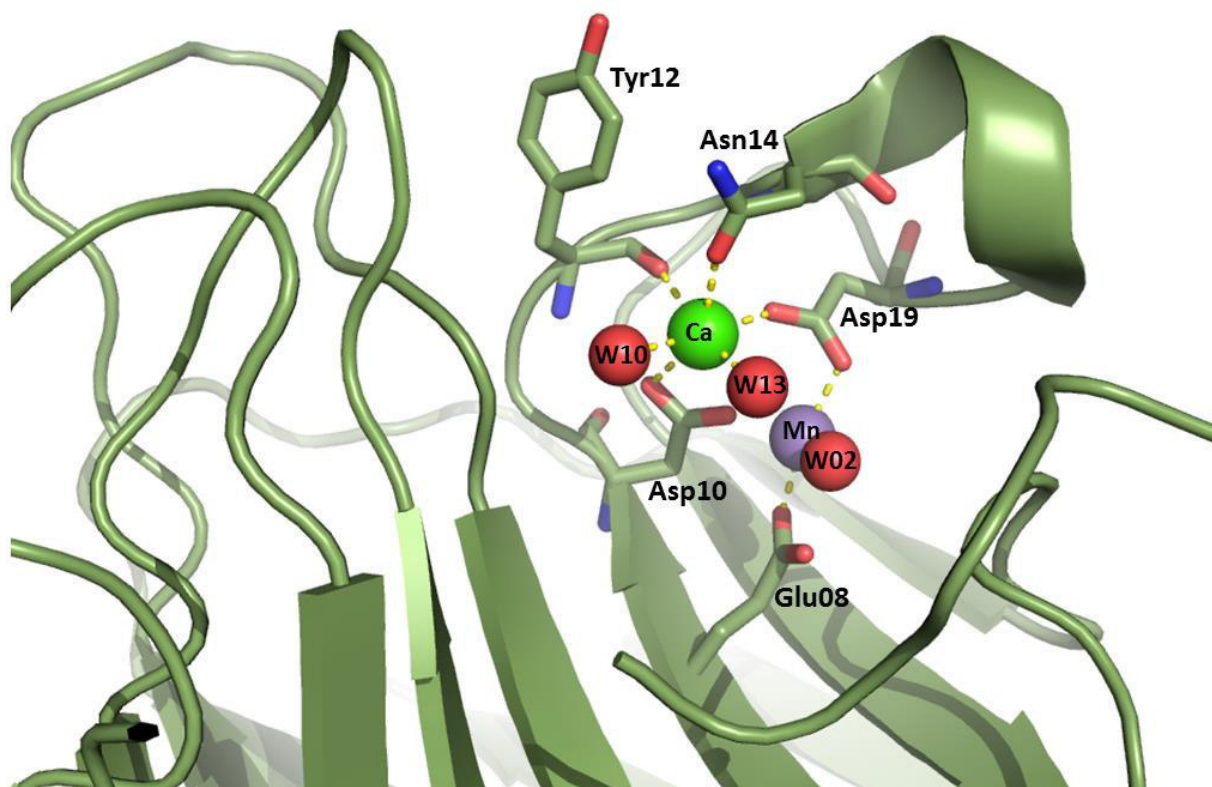


**Figura 12. Estrutura Completa da ConM complexada com resveratrol.** (A) Representação em cartoon do motivo  $\beta$ -sanduíche. (B) Representação do motivo *Jelly-roll*. (C) Representação do dímero canônico (D) Representação tetramérica da ConM. Esferas verdes e lilás representam íons de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$  respectivamente.



A ConM apresenta um sítio de ligação a metal conservado com os resíduos Asn14 e Tyr12 interagindo com o cálcio, Glu8 e His24 (interagindo com manganês), Asp10 e Asp19 interagindo com ambos (Figura 13). Além de 2 moléculas de água, os resíduos Ala207 e Asp208 estão isomerizados na configuração *cis* devido à presença dos íons divalentes que mudam a orientação da cadeia lateral dos resíduos Asn14 e Asp208, uma observação comum em lectinas de leguminosas. A substituição de um único resíduo neste sítio pode afetar significativamente o efeito da atividade biológica, como observado em outras lectinas com mutagênese sítio-dirigida (HIRABAYASHI; KASAI, 1991).

**Figura 13. Representação do sítio de interação a metais da ConM.** Representação da interação da ConM (cartoon) com água (esferas vermelhas) e com os metais  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$  (esferas verde e lilás respectivamente) estabilizando o sítio de ligação ao carboidrato na proteína. Linhas pontilhadas representam coordenações realizadas entre os metais, moléculas de água e resíduos de aminoácidos em stick.

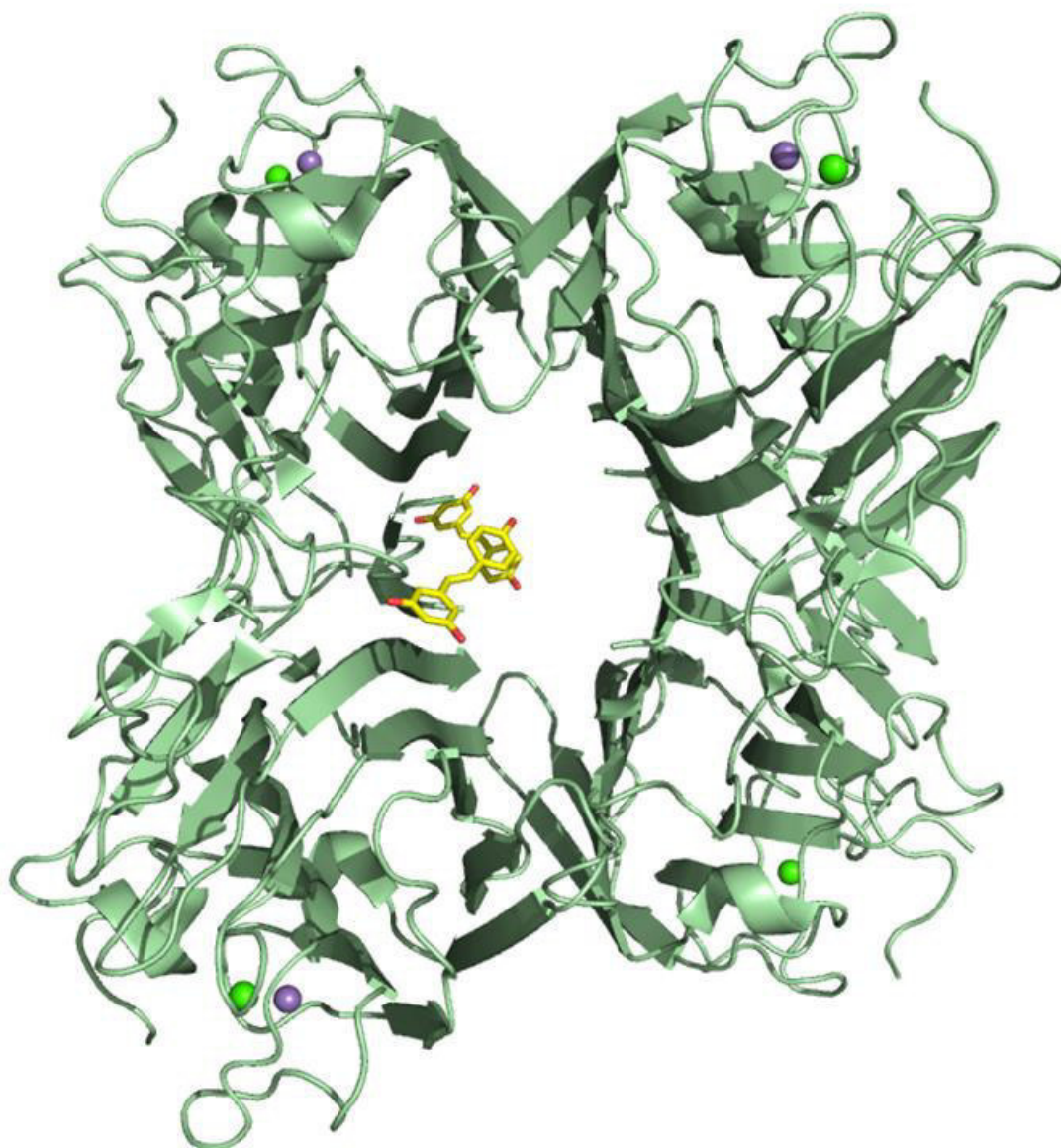


O sítio de ligação a carboidrato da ConM é composto pelos resíduos, Tyr12, Asn14, Leu99, Tyr100 Asp206 e Arg228, este sítio de ligação não sofreu modificação topológica em comparação com outra estrutura de ConM nativa depositada em banco de dados do PDB (2CWM).

O ligante resveratrol foi ancorado na interface entre os monômeros que formam o dímero canônico. Resveratrol está ligado apenas a um dos dímeros que formam a estrutura quaternário da ConM, isto pode ser devido a razão proteína/resveratrol que foi grande demais para permitir que todos sítios de ligação fossem ocupados. Resveratrol interage com a quinta e sexta fita da folha- $\beta$  pertencentes da cadeia A do monômero e sexta fita pertencente a cadeia do monômero do simétrico (-x, y, -z). Nessa estrutura o monômero da cadeia A e o monômero do simétrico (-x, y, -

z) formam o dímero canônico, logo, dois dímeros canônicos são conectados por interações polares entre as interfaces das folhas- $\beta$  dos monômeros, formando a estrutura quaternária da ConM (Figura 14).

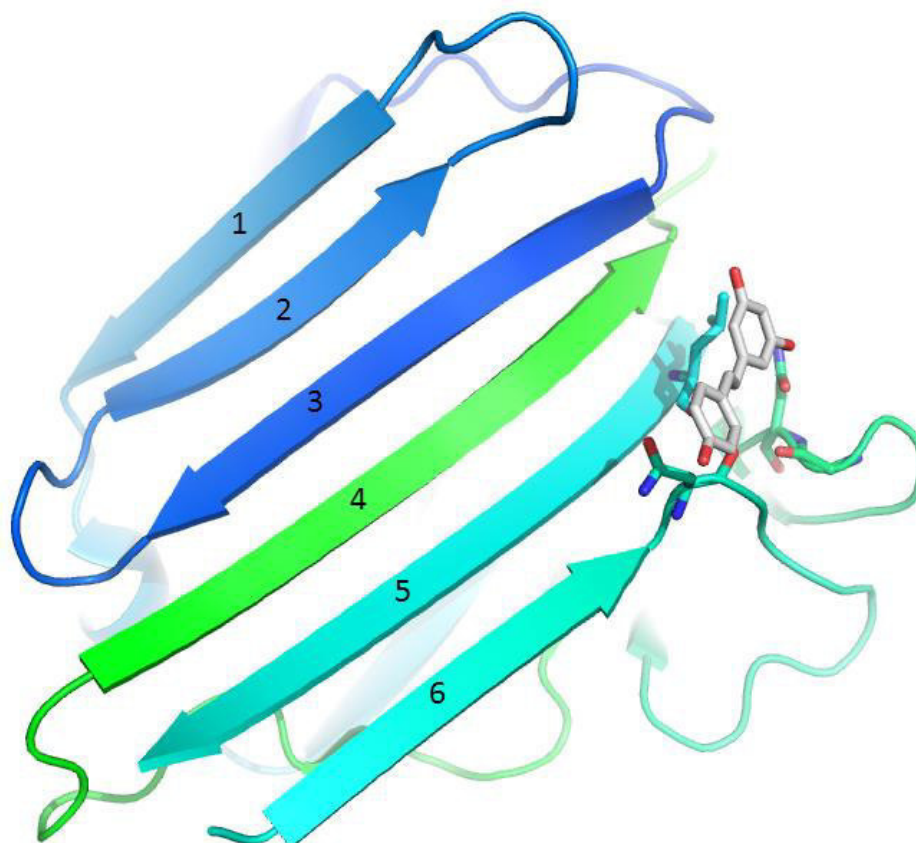
**Figura 14. Estrutura tridimensional da ConM interagindo com o resveratrol no sítio de folhas- $\beta$  rígidas.** Estrutura quaternária da ConM (cartoon) composta por duas moléculas de resveratrol (stick amarelo) em um dímero canônico, as esferas em verde e lilás representam os íons cálcio e manganês respectivamente.



As folhas- $\beta$  das lectinas do tipo ConA são responsáveis por estabelecer as interações fracas que formam o dímero canônico. O resveratrol está ligado nessa região

através de pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas com resíduos que compõem a quinta e sexta fita da folha- $\beta$  do monômero da cadeia A e a sexta fita da folha- $\beta$  do monômero do simétrico (-x, y, -z) (Figura 15).

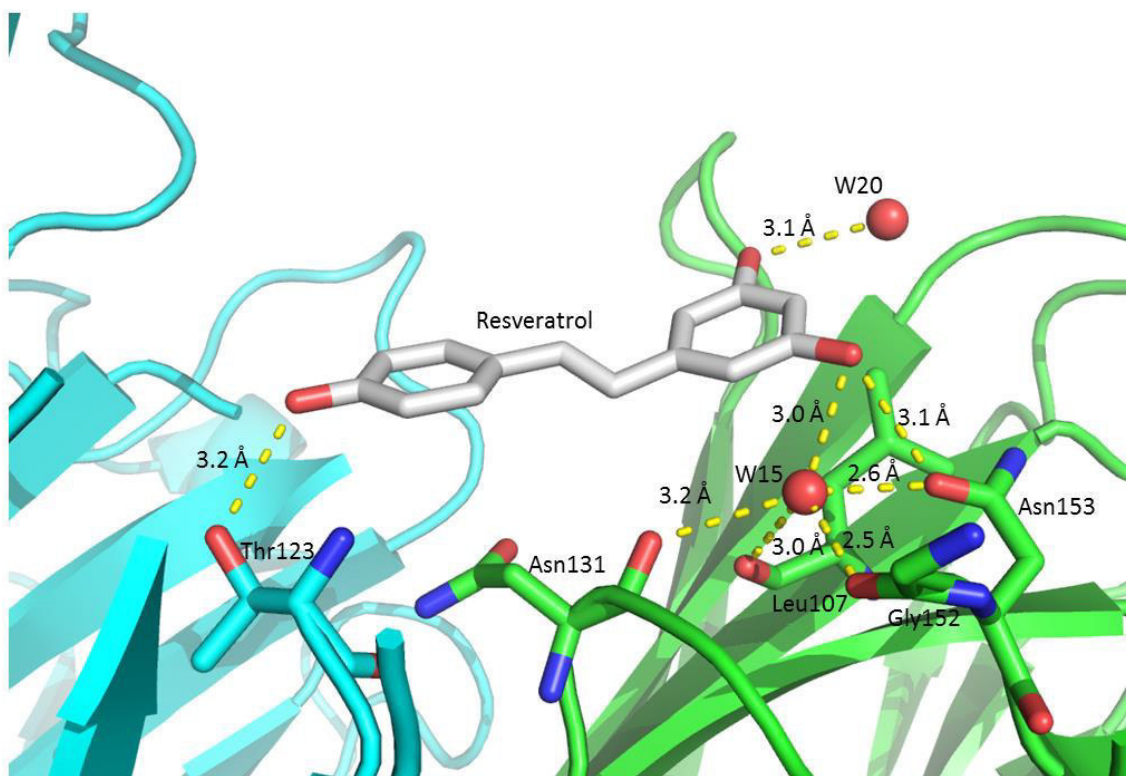
**Figura 15. Estrutura tridimensional do monômero da ConM complexado com resveratrol.** Visualização da interação do resveratrol com os resíduos da quinta e sexta fita- $\beta$  da folha- $\beta$  rígida.



Os principais contatos polares observados na estrutura da ConM com o resveratrol são mediados pela molécula de água (W15) a qual interage com o resveratrol a uma distância de 3,1 Å, essa água por sua vez, interagem com o oxigênio (O) do resíduo de Leu107, oxigênio (OD1) do resíduo de Asn153 e oxigênio (O) do resíduo de Gly152 (O), a uma distância de 3,0 Å, 2,6 Å e 2,5 Å respectivamente. Além da W15, o resveratrol interage também com outra molécula de água (W20) e com o resíduo de Asn153 ambos a uma distância de 3,1 Å e com o oxigênio (OG1) do resíduo de Thr123 do monômero assimétrico (-x, y, -z) a uma distância de 3,2 Å (Figura 16).

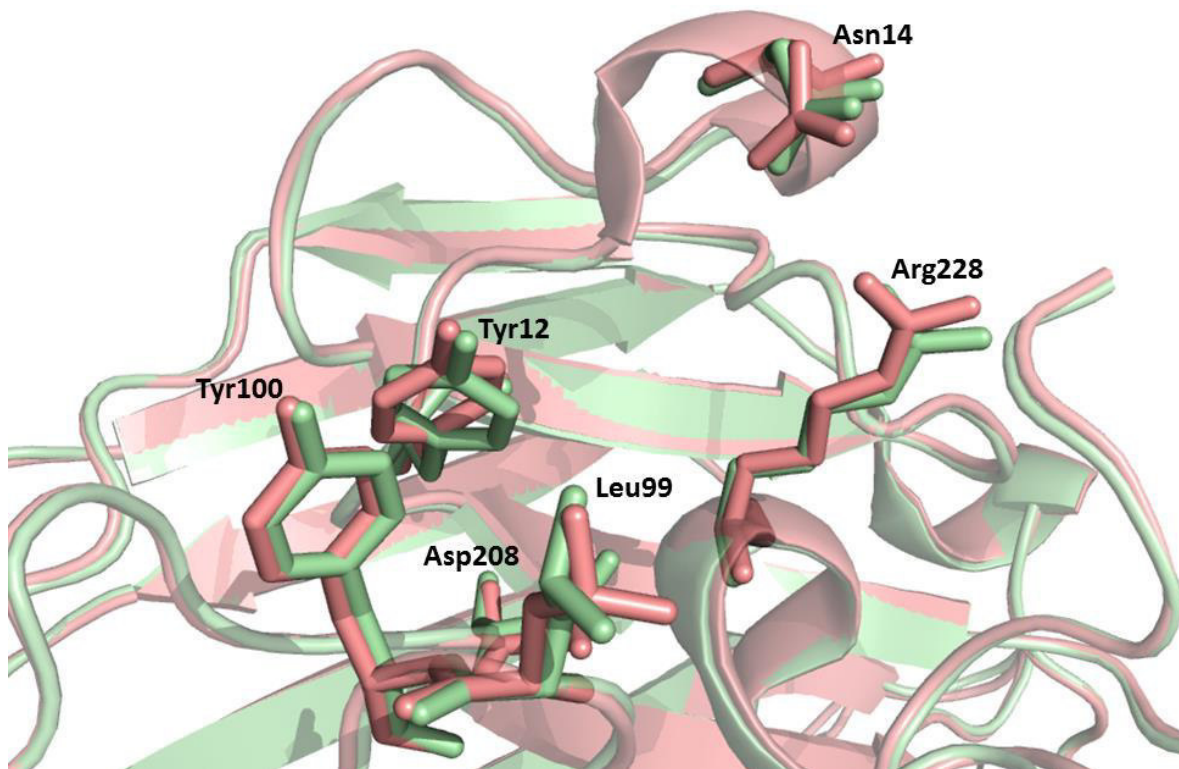


**Figura 16. Interação do resveratrol com os resíduos que compõem o sítio de ligação.** A cadeia “A” está representada em verde, a cadeia do simétrico (-x, y -z), está representado em azul. Esferas vermelhas e traços amarelos representam moléculas de água e comprimento de ligação respectivamente.



As interações hidrofóbicas entre resveratrol e ConM são mediados pelos resíduos de aminoácidos, Leu107 (CA/CD2) e Asn131 (CB), como demonstrado na tabela 3. A sobreposição da estrutura de ConM nativa (PDB código 2CWM) com a estrutura da ConM complexada ao resveratrol mostrou que não há mudanças significativas nos resíduos que compõem o sítio de interação a carboidratos (Figura 17).

**Figura 17:** Sobreposição do sítio de ligação a carboidrato da ConM nativa e ConM complexada com resveratrol. Em verde ConM/resveratrol (PDB: 4DPN), em rósea ConM nativa (PDB: 2CWM).



**Tabela 3.** Contatos hidrofóbicos entre a lectina de *C. maritima* e o resveratrol.

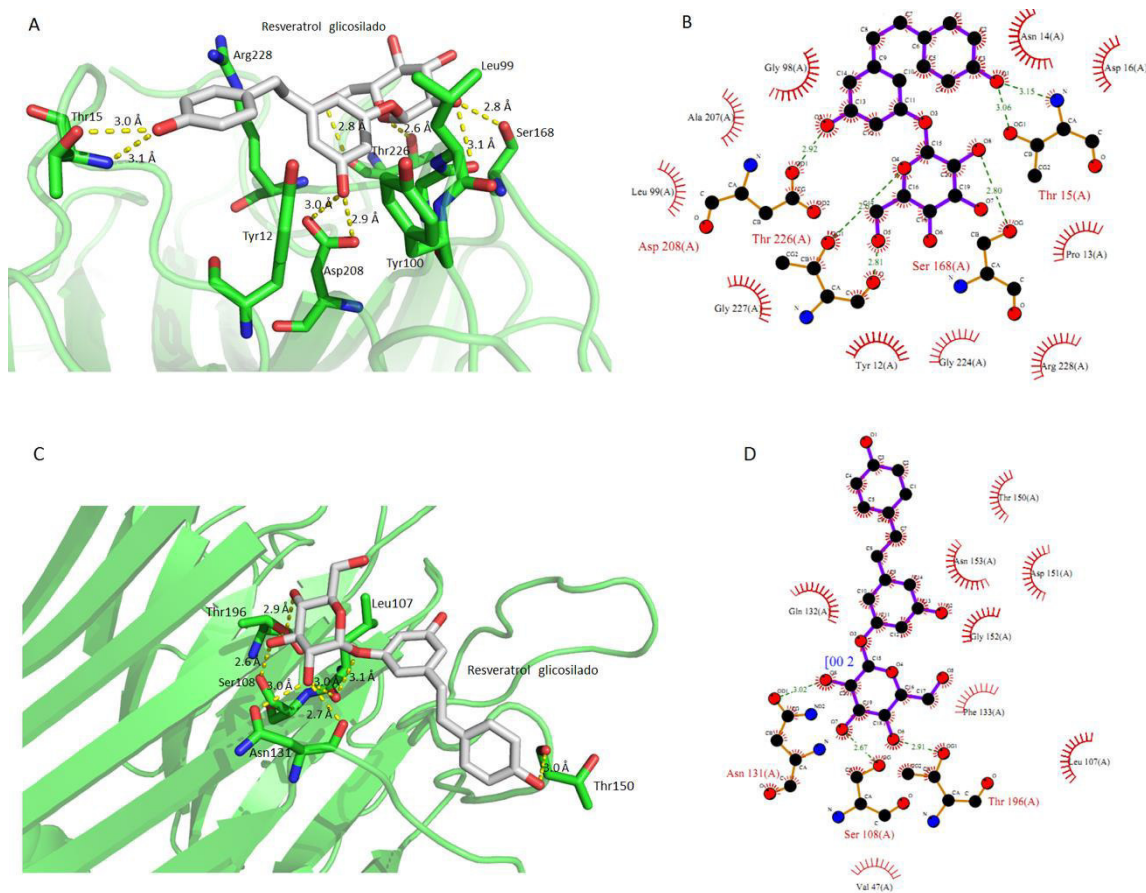
Aminoácidos	Resveratrol	Distance (Å)
Leu107 CB	C1	4,6
Leu107 CG	C1	4,5
Leu107 CD2	C1	3,6
Leu107 CB	C2	4,2
Leu107 CG	C2	3,8
Leu107 CD2	C2	3,0
Leu107 CB	C3	4,1
Leu107 CG	C3	3,8
Leu107 CD2	C3	3,6
Leu107 CA	C3	4,9
Leu107 C	C4	4,9
Leu107 CB	C4	4,4
Leu107 CG	C4	4,6
Leu107 CD2	C4	4,6
Leu107 CB	C5	4,8
Leu107 CB	C6	4,9
Leu107 CD2	C6	4,6

<b>Asn131 CA</b>	C7	4,9
<b>Asn131 C</b>	C7	4,6
<b>Asn131 CB</b>	C7	4,4
<b>Asn131 CG</b>	C7	4,9
<b>Asn131 CB</b>	C8	4,8
<b>Asn131 CG</b>	C8	4,9
<b>Asn131 CB</b>	C9	4,4
<b>Asn131 CG</b>	C9	4,4
<b>Asn131 CB</b>	C10	3,8
<b>Asn131 CG</b>	C10	4,1
<b>Asn131 CB</b>	C11	4,1
<b>Asn131 CG</b>	C11	4,3
<b>Asn131 CB</b>	C12	4,9
<b>Asn131 CG</b>	C12	4,7
<b>Asn131 CG</b>	C13	4,9
<b>Asn131 CG</b>	C14	4,8

### 4.3 Docking molecular da ConM com resveratrol glicosilado

Nos vegetais a estrutura do resveratrol pode ser encontrada de forma ativa ou na forma inativa, essa última apresenta-se na forma glicosilada (resveratrol-3-O- $\beta$ -Mono-D-glicosidil), esta forma é cerca de sete vezes mais concentrado que resveratrol e é provavelmente a forma mais abundante do resveratrol na natureza (ROMERO-PEREZ *et al.*, 1999; REGEV-SHOSHANI *et al.*, 2003). A forma glicosilada tem seu carboidrato ligado na posição do C-3 substituinte de um grupo hidroxila. Logo, foi avaliado uma possível interação do resveratrol glicosilado no domínio de reconhecimento a carboidrato da ConM e nas fitas- $\beta$  do sítio de interação ao resveratrol encontrado na estrutura da ConM. O docking molecular no presente estudo revelou que a interação entre ConM e resveratrol glicosilado é energeticamente favorável tanto no sítio de interação a carboidrato (MDS= -118,78) (Figura 18 A e B) como nas fitas- $\beta$  do sítio do resveratrol (MDS= -103,44) (Figura 18C e D).

**Figura 18. Docking molecular da forma glicosilada do resveratrol no sítio de ligação a carboidrato e no sítio das folhas- $\beta$ .** (A) e (C) Resveratrol-3-O- $\beta$ -mono-D-glucosídio ancorado no sítio de ligação a carboidratos no sítio da folha- $\beta$  respectivamente. (C) e (D) representação das interações polares e apolares no sítio de ligação a carboidrato e no sítio das folha- $\beta$  respectivamente.



O resveratrol glicosilado interagiu no sítio de ligação a carboidratos através de contatos polares, pontes de hidrogênio e interação de van der Waals com os resíduos, Tyr12 (OH/CE2/CD2), Asn14 (ND2), Thr15 (N/OG1), Asp16 (OD1), Gly98 (O), Leu (N), Ser168 (OG), Asp208 (OD1/OD2) e Thr226 (O/OG1), como demonstrado na tabela 4. Vários estudos de estruturas de lectinas vegetais tem demonstrado a interação de carboidratos ligados ao sítio de ligação e de moléculas com características hidrofóbicas interagindo em regiões vizinhas a esse sítio (KANELLOPOULOS 1996), como exemplo temos a adenina complexado na estrutura da lectina da semente de ConM (PDB 3S0S) e porfirina complexada na estrutura da lectina da semente da jaca (*Artocarpus heterophyllus*) (PDB 1PXD) e na estrutura da ConA, esta ultima interagindo no sítio no sítio de ligação a carboidrato juntamente com um resíduo de manose (PDB 1JN2) (GOEL *et al.*, 2001; GOEL *et al.*, 2004; KOMATH *et al.*, 2006).



**Tabela 4.** Pontes de hidrogênio e interações de van der Waals entre resveratrol-3-O- $\beta$ -mono-D-glucosídeo (RMG) e resíduos no sítio de ligação a carboidratos.

<b>Aminoácidos</b>	<b>RMG</b>	<b>Distância (Å)</b>
<i>Pontes de hidrogênio</i>		
<b>Thr15 OG1</b>	O1	3,0
<b>Thr15 N</b>	O1	3,1
<b>Asp208* OD1</b>	O2	2,9
<b>Asp208* OD2</b>	O2	2,9
<b>Ser168 OG</b>	O8	2,8
<b>Gly98* O</b>	O8	3,1
<b>Thr226 O</b>	O5	2,8
<b>Thr226 OG1</b>	O4	2,6
<i>Interações de van der Waals</i>		
<b>Leu99* N</b>	C12	3,2
<b>Tyr12* CE2</b>	O2	3,1
<b>Tyr12* CD2</b>	O2	3,0
<b>Tyr12* OH</b>	C5	3,0
<b>Asn14* ND2</b>	C6	3,1
<b>Asp16* OD1</b>	C2	2,6
<b>Asp16* OD1</b>	C1	2,8

\* Resíduos que estão envolvidos na interação de carboidratos nas lectinas do tipo ConA.

Já no sítio de interação ao resveratrol, a forma glicosilada realizou contatos polares com os resíduos de Leu107 (O), Ser108 (OG), Asn131 (O/OD1), Gln132 (OE1), Thr150 (O), Asn153 (OD1) e Thr196 (OG1), como demonstrado na tabela 5. Delatorres e colaboradores (2013) também demonstraram a interação do ácido indolacético (AIA) no sítio de ligação da ConM (PDB 3SNM), nesse estudo, os pesquisadores demonstraram a participação dos resíduos de Ser108 e Asn131 formando pontes de hidrogênio com o AIA, aumentando assim a interação do ligante com no sítio, o qual é predominantemente mantido por interações hidrofóbicas com a cadeia lateral dos resíduos que compõem a região (DELATORRE, *et al.*, 2013), mostrando assim, a importância desses resíduos na interação de moléculas hidrofóbicas.

**Tabela 5.** Pontes de hidrogênio e interações de van der Waals entre resveratrol-3-O- $\beta$ -mono-D-glucosídeo (RMG) e resíduos no sítio de ligação ao resveratrol.

<b>Aminoácidos</b>	<b>RMG</b>	<b>Distâncias (Å)</b>
<i>Ponte de hidrogênio</i>		
<b>Thr196 OG1</b>	O6	2,9
<b>Thr196 OG1</b>	O7	3,1
<b>Ser108 OG</b>	O7	2,6
<b>Asn131 O</b>	O8	2,7
<b>Asn131 OD1</b>	O8	3,0

<b>Leu107 O</b>	O8	3,0
<b>Leu107 O</b>	O3	3,1
<b>Thr150 O</b>	O1	3,0
<i>Interações de van der Waals</i>		
<b>Thr150 O</b>	C3	3,1
<b>Gln132 OE1</b>	C5	3,0
<b>Asn153 OD1</b>	C13	3,0
<b>Asn153 OD1</b>	C12	3,0

Além de observar a estrutura do AIA no sítio de ligação da ConM, Delatorre e colaboradores (2013) observaram por simulação de docking molecular que o AIA glicosilado (forma inativa), o qual é encontrado nas plantas como forma de reserva, apresenta energia favorável de interação no sítio de reconhecimento a carboidrato, logo esses dados corroboram com os dados obtidos em nossos estudos de simulação de docking molecular, o qual sugere que a forma inativa do resveratrol possa também se ligar a estrutura da ConM, assim essa proteína poderia servir como âncora de reserva desses ligantes, e serem liberados quando houver consumo das proteínas nos tecidos, como já sugerido para aminoácidos não proteico como o ácido alfa aminobutírico (ABU) e ácido gama aminobutírico (GABA) (DELATORRE *et al.*, 2007).

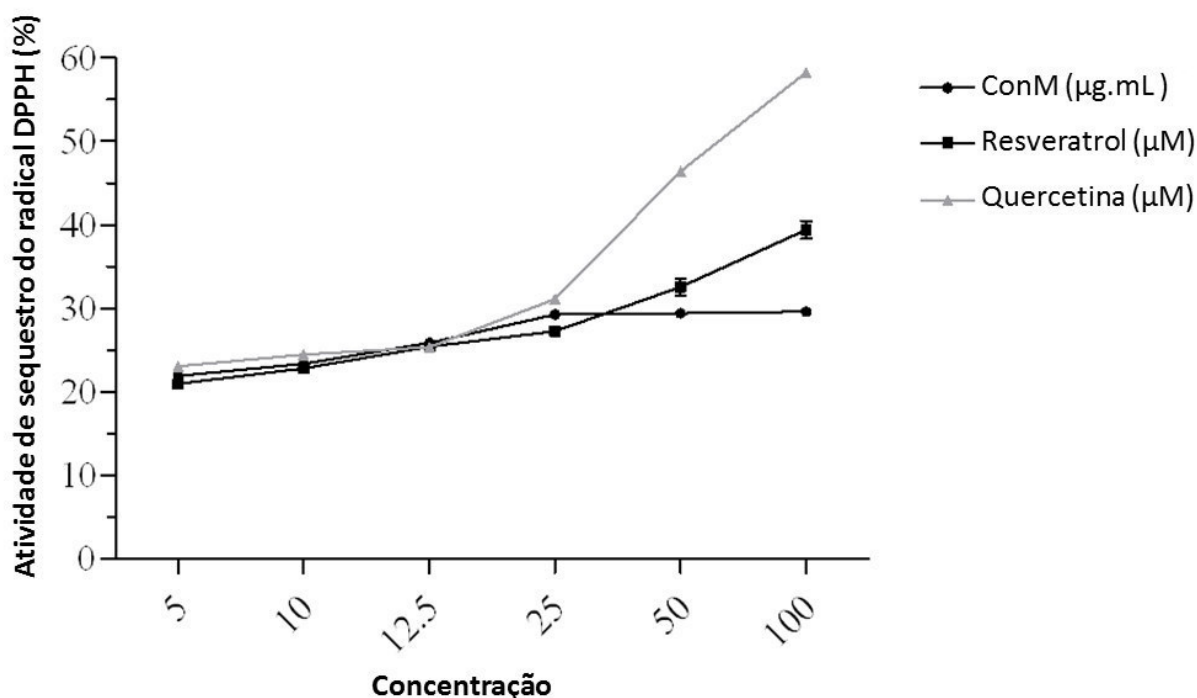
A maior concentração do resveratrol encontrado na uva, romã e em outros frutos encontra-se na forma inativa, ou seja, na forma glicosilada, nesse estado, a molécula não apresenta atividades característica tais como atividades antioxidante e anti-inflamatório quando absorvidas na alimentação (ROMERO-PÉREZ *et al.*, 1999). A forma glicosilada dos flavonóides é dificilmente absorvida no intestino delgado devido ao favorecimento da hidrofiliabilidade. Acredita-se que a forma glicosilada dos flavonóides passa direto pelo intestino delgado sendo hidrolizada pelas enterobactérias liberando a aglicona correspondente, no ceco e cólon. Os flavonoides que não estão glicosilados podem ser absorvidos mais facilmente pelas células epiteliais do intestino grosso devido a sua lipofiliabilidade que facilita a passagem pela camada fosfolipídica da membrana celular (BEHLING, *et al.*, 2004).

#### 4.4 Atividade antioxidante

Para avaliar uma possível atividade antioxidante, a ConM e resveratrol foram submetidos a ensaios de sequestro de radicais livres DPPH, inibição da oxidação do  $\beta$ -caroteno e quelação do íon ferroso.

O ensaio de sequestro de radicais livres com a ConM mostrou que a proteína nas concentrações variando entre 5 a 100  $\mu\text{g/mL}$  inibiu a oxidação do DPPH, mostrando uma atividade dose dependente até a concentração de 25  $\mu\text{g/mL}$  após aumentar essa concentração a atividade permanece constante. Resveratrol (5 a 100  $\mu\text{M}$ ) e quercetina (controle positivo) (5 a 100  $\mu\text{M}$ ), mostraram também uma atividade dose dependente na inibição da oxidação do DPPH (Gráfico 1).

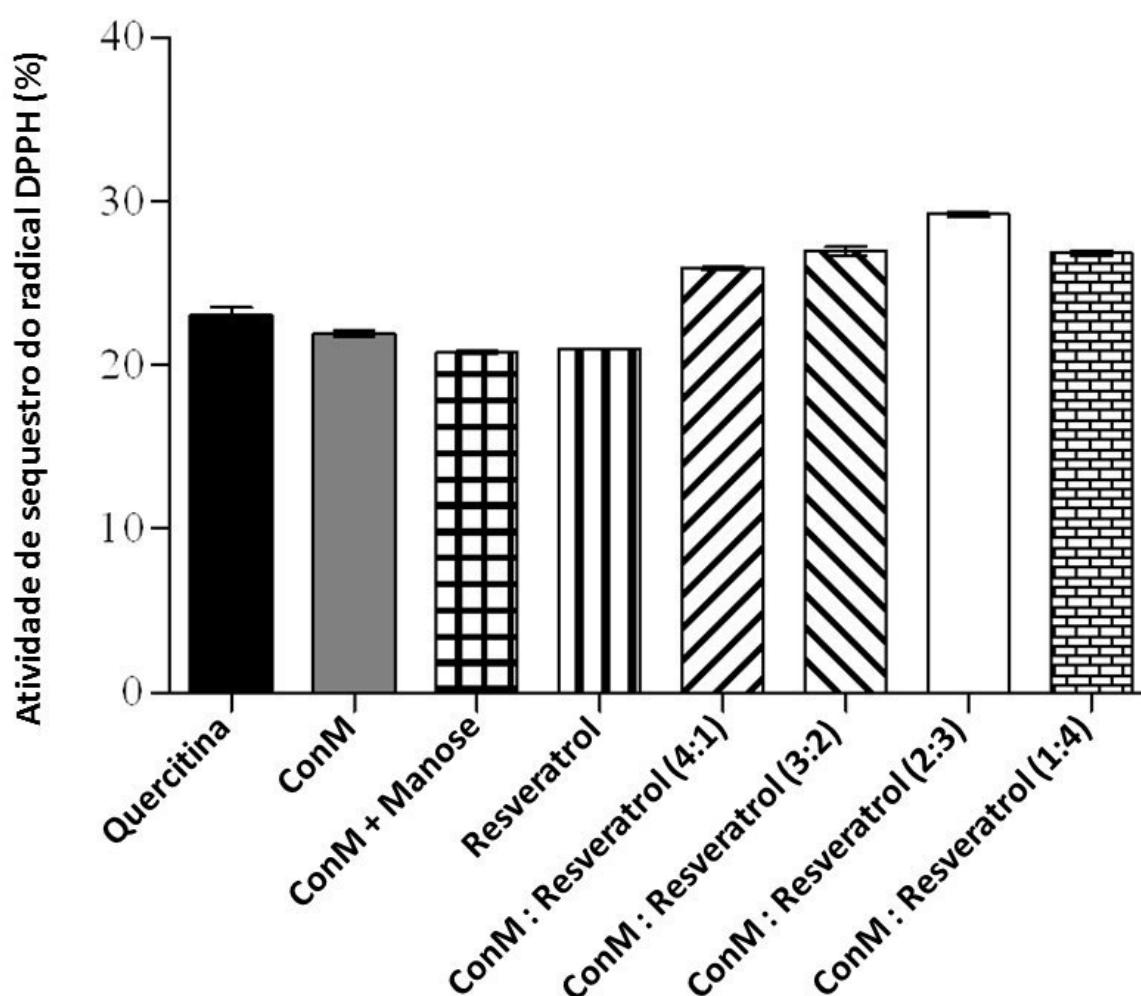
**Gráfico 1. Atividade de sequestro de radicais livre da quercetina, ConM e resveratrol pelo ensaio do DPPH.** A atividade do sequestro de radicais foi medido em seis diferentes concentrações de ConM (5, 10, 12.5, 25, 50, 100  $\mu\text{g/mL}$ ), quercetina e resveratrol nas concentrações de (5, 10, 12.5, 25, 50, 100  $\mu\text{M}$ ). Os resultados estão expressos como médias  $\pm$  desvio-padrão de três replicatas ( $p < 0,05$ ).



Além da atividade análise da atividade antioxidante de cada molécula, foi investigado também um possível efeito sinérgico das moléculas de ConM e resveratrol em diferentes razões de concentrações 4:1, 3:2, 2:3 e 1:4 (ConM/Resveratrol). A atividade sinérgica mostrou inibição da oxidação do DPPH. A mais efetiva razão foi 2:3, como pode ser observado no gráfico 2. A fim de avaliar o envolvimento do sítio de reconhecimento a carboidrato da ConM com atividade antioxidante, o sítio de ligação a carboidrato foi previamente bloqueado com o açúcar manose na concentração de 0,1 M. No entanto, não houve diferença significativa observada na inibição da oxidação do

DPPH por ConM complexado com manose (Gráfico 2), indicando que o sítio de ligação a carboidrato não está diretamente relacionado com a atividade antioxidante. Estes resultados corroboram com os estudos cristalográficos, indicando que a interação entre a ConM e resveratrol pode aumentar a atividade antioxidante de ambas as moléculas.

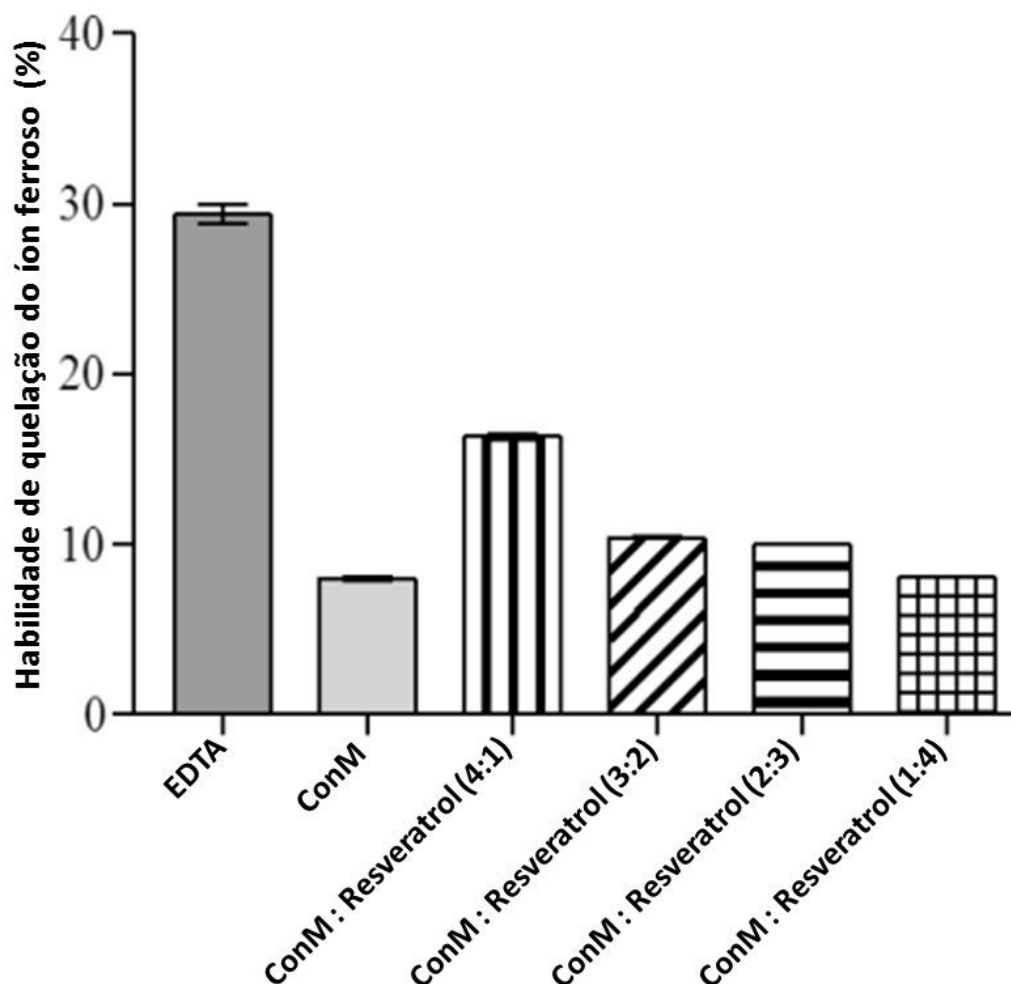
**Gráfico 2. Avaliação do efeito sinérgico entre ConM e resveratrol e o envolvimento do sítio de ligação a carboidrato no sequestro de radicais livres.** O ensaio foi realizado em pequenas concentrações, ConM (5 µg/mL), manose (0,1 M), resveratrol (5 µM) e quercetina (5 µM). Os resultados estão expressos como médias ± desvio-padrão de três replicatas ( $p < 0,05$ ).



Foi investigado também a habilidade de quelação da ConM e resveratrol pelo o ensaio de quelação do íon ferroso. Nesse ensaio foi observado que tanto a ConM (5 µg/mL), quanto o resveratrol (5 µM) não possuem habilidade de quelação, quelando

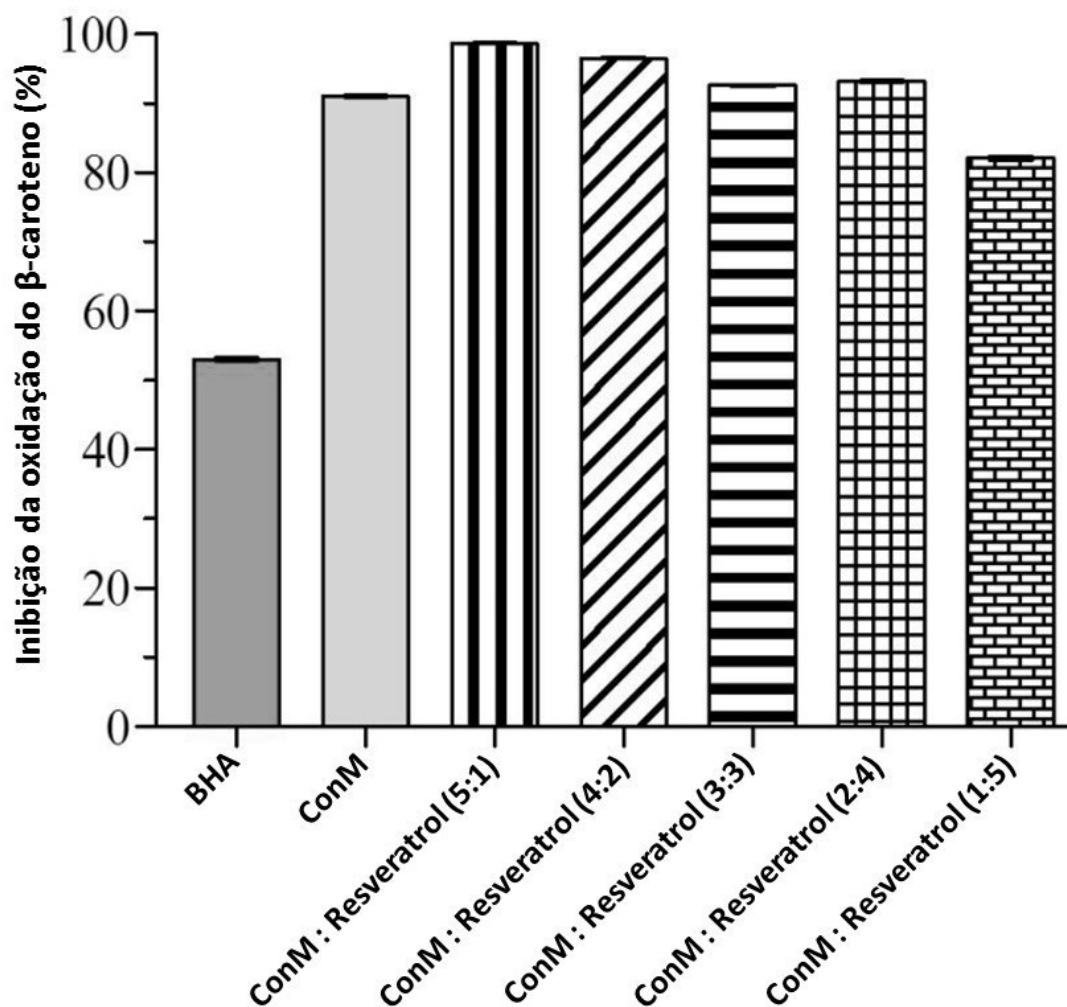
apenas 8,2% e 5,6% respectivamente, quando comparado com o controle positivo EDTA (25  $\mu$ M), o qual quelou 29,4% do íon ferroso. Além da atividade direta, foi estudado também um possível efeito sinérgico das moléculas de ConM e resveratrol em diferentes razões de concentrações 4:1, 3:2, 2:3 e 1:4 (ConM/Resveratrol). A atividade sinérgica mostrou que não houve quelação significativa do íon ferroso em comparação com o controle positivo (EDTA) como pode ser observado no gráfico 3. Sugerindo assim, que o mecanismo pelo qual a ConM e resveratrol apresentam atividade antioxidante não está relacionado com a quelação de íons, podendo essa atividade ser via transferência de elétrons para os radicais livres.

**Gráfico 3. Avaliação da habilidade de quelação do íon ferroso efeito sinérgico entre ConM e resveratrol.** O ensaio foi realizado em pequenas concentrações, ConM (5  $\mu$ g/mL), resveratrol (5  $\mu$ M) e EDTA (25  $\mu$ M). Os resultados estão expressos como médias  $\pm$  desvio-padrão de três replicatas ( $p < 0,05$ ).



Por fim, foi investigado a atividade antioxidante da ConM e resveratrol pelo sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico. Nesse ensaio verificou-se que tanto a ConM (5  $\mu\text{g/mL}$ ), quanto o resveratrol (5  $\mu\text{M}$ ) possuem atividade antioxidante, inibindo a oxidação do  $\beta$ -caroteno em 92,1% e 68,6% respectivamente, já o controle positivo BHA (12  $\mu\text{M}$ ), inibiu 51,1% da oxidação do  $\beta$ -caroteno. Além da atividade antioxidante de cada molécula, foi realizado investigado também efeito sinérgico da ConM e resveratrol em diferentes razões de concentrações 5:1, 4:2, 3:3 e 1:5 (ConM/Resveratrol). A atividade sinérgica mostrou inibição da oxidação do  $\beta$ -caroteno em todas as razões testadas como demonstrado no gráfico 4. Esses ensaios demonstram que tanto a ConM, quanto o resveratrol são excelentes agentes antioxidantes, impedindo a ação da peroxidação lipídica na oxidação do  $\beta$ -caroteno.

**Gráfico 4. Avaliação da inibição da oxidação do  $\beta$ -caroteno e efeito sinérgico entre ConM e resveratrol.** O ensaio foi realizado em pequenas concentrações, ConM (5  $\mu$ g/mL), resveratrol (5  $\mu$ M) e BHA (12  $\mu$ M). Os resultados estão expressos como médias  $\pm$  desvio-padrão de três replicatas ( $p < 0,05$ ).



Portanto, o mecanismo da atividade antioxidante da ConM e do resveratrol não é via quelação de íons, indicando assim, que essa atividade seja via sequestro dos radicais livres a partir da transferência de elétrons para os radicais formados no ensaio do DPPH e no sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico. Esse mecanismo de ação antioxidante é geralmente descrito para os antioxidantes primários (BAILEY, 1996), como é o caso do BHA utilizado como controle positivo no sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico, sugerindo assim, que tanto a ConM quanto o resveratrol sejam classificados como antioxidantes primários.

A atividade antioxidante de alguns flavonóides tais como o resveratrol, foi previamente caracterizado como sequestradores eficazes de radicais livres (PIER-

GIORGIO, 2000). A ConM complexada com resveratrol atuam sinergicamente para aumentar a atividade antioxidante. Nas plantas, esta interação pode promover uma redução dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs), que são produzidos pela redução parcial do oxigênio (RAY *et al.*, 2012). No meio ambiente, plantas são expostas constantemente a diferentes estresses biótico e abiótico que geralmente aumenta os níveis de EROs na planta (BAILEY-SERRES; MITTLER, 2006). Nas plantas, as defesas antioxidantes poderiam ser realizadas por moléculas não enzimáticas, por exemplo, glutathione, prolina,  $\alpha$ -tocoferóis, carotenóides e flavonóides ou enzimática, tais como, superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), a glutathione peroxidase (GPX) e glutathione reductase (GR) (GILL; TUTEJA 2010). Alguns estudos também demonstram a capacidade do resveratrol reduzir os níveis de ( $\bullet$ OH) e ( $O_2\bullet^-$ ), bem como radicais produzidos pela reação enzimática com Cr (VI) e a inibição de danos no DNA devido radicais produzidos pela reação de Fenton (LEONARD *et al.*, 2003). Outros estudos têm mostrado que o efeito antioxidante do resveratrol protege os neurônios dopaminérgicos contra alto estresse oxidativo induzido por glicose, diminuindo os níveis celulares de ânions superóxido (RENAUD *et al.*, 2014).

Além da redução dos níveis de EROs nas células, o resveratrol induz também o acúmulo de transcritos de proteínas relacionadas com patogêneses (proteínas – PR) (CHANG *et al.*, 2011) Entre as 14 famílias de proteínas PR já descritos, a PR-4 chama a atenção, pois são compostas de quitinases. Algumas dessas quitinases apresentam domínio heveínicos, que reconhecem e se ligam aos resíduos de GlcNAc (BERTINI *et al.*, 2012), o que indica que a relação entre a lectina e o resveratrol pode estar envolvido na resposta de defesa contra agentes patogênicos. Por conseguinte, a interação entre ConM e o resveratrol pode ser um mecanismo alternativo para reduzir o stress oxidativo, reduzindo possíveis danos celulares.

A interação entre o resveratrol e ConM também fornece evidência de que estas duas moléculas podem atuar sinergicamente para reduzir os processos inflamatórios através da inibição de muitos eventos pró-inflamatórias. Lectinas do tipo ConA tem sido descritas com proteínas anti-inflamatórias quando administrada sistemicamente em camundongo (ROCHA *et al.*, 2011; ALENCAR *et al.*, 1999). A atividade anti-inflamatória das lectinas é explicada por uma competição entre as lectinas e as moléculas de adesão, por exemplo, selectinas que são responsáveis pela aderência



e rolagem de células recrutadas para a migração celular após estímulo inflamatório (ALENCAR *et al.*, 2010).

A atividade anti-inflamatória do resveratrol está diretamente relacionados com a supressão das células de adesão como resultado de regular negativamente na expressão de E-selectina (PENDURTHI; RAO, 2002). Resveratrol também regula negativamente alguns factores pró-inflamatórias, incluindo NO, PGE2, iNOS e COX, bem como mediadores pró-inflamatórias, tais como TNF- $\alpha$  e IL-1b. Muitas lectinas vegetais são comumente conhecido por reduzir a produção de NO após injeção local (ALENCAR *et al.*, 2005) e também ativar eNOS, causando um efeito vasorelaxante na aorta endotelizada intacta após injeção sistêmica. ConM não pode reduzir a produção de NO no fluido peritoneal, mas é muito eficaz em estimular efeito vasorelaxante mediados por actividade de NOS e esta atividade está claradamente relacionada com o sítio de ligação a carboidratos das lectinas (GADELHA *et al.*, 2005).

O sinergismo observado entre ConM e resveratrol pode ser explicado também através da interação da ConM e a forma glicosilada do resveratrol. Especificamente, a principal forma do resveratrol encontrado na natureza é a forma glicosilada, enquanto que o glicano é responsável por uma forma mais estável e solúvel, é também responsável pela internalização do resveratrol através de um mecanismo que utiliza transportadores de glicose (ROMERO-PÉREZ *et al.*, 1999). A forma glicosilada tem dois locais de ligação baseado em docking molecular, porém a forma ativa provavelmente se liga apenas na interface das folhas- $\beta$ , possivelmente devido a presença de aminoácidos hidrofóbicos na interface da proteína, os quais forma as interações de van der Waals e hidrofóbicas entre a proteína e o resveratrol. A existência de dois locais de ligação de interação da forma inativa do resveratrol na ConM é portanto, uma fonte secundária de interação que poderia elicitar as propriedades biológicas do resveratrol com lectinas que atuando como um sistema de entrega para células comumente reconhecidos pela ConM nas quais a resposta inflamatória é suprimida na presença desta proteína.

## 5. CONCLUSÃO

O resveratrol complexado na estrutura da ConM é provavelmente responsável pelo sinergismo que revelou um efeito antioxidante significativo. Esta atividade também parece não estar relacionado com a quelação de íons e nem com o domínio de reconhecimento a carboidratos. As evidências estruturais das ligações demonstram que a forma glicosilada do resveratrol complexada com a ConM indica que muitas outras atividades poderiam ser eliciadas pelo complexo entre eles na célula vegetal. Assim, postulamos que a interação entre ConM e o resveratrol apresenta um duplo potencial elicitor na atividade antioxidante por eliminação de radicais livres e na resposta anti-inflamatória pela regulação negativa da expressão de E-selectina por resveratrol. E a competição com as selectinas e vasorelaxação realizado por lectinas; ambos os efeitos interferem no processo de adesão, regulando a adesão, rolagem e diapedese de leucócitos.

## REFERÊNCIAS

- ALBANI, D., POLITO, L., SIGNORINI, A., FORLONI, G. Neuroprotective properties of resveratrol in different neurodegenerative disorders. *Biofactors*, 36: 370–376, 2010.
- ALENCAR, N. M. N., ASSREUY, A. M. S., BINDÁ, A.H., BENEVIDES, R. G., MOURA, T. R., SOUSA, R. B., RIBEIRO, R. A., CUNHA, F. Q., CAVADA, B. S. *Vatairea macrocarpa* (Leguminosae) lectin activates cultured macrophages to release chemotactic mediators. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 374, 275-282, 2005.
- ALENCAR, N. M., TEIXEIRA, E. H., ASSREUY, A. M., CAVADA, B. S., FLORES, C. A., RIBEIRO, R. A. Leguminous lectins as tools for studying the role of sugar residues in leukocyte recruitment. *Mediators Inflamm*, 8, 107–113, 1999.
- ALENCAR, N. M., CAVALCANTE, C. F., VASCONCELOS, M. P., LEITE, K. B., ARAGÃO, K. S., ASSREUY, A. M., NOGUEIRA, N. A., CAVADA, B. S., VALE, M. R. Anti-inflammatory and antimicrobial effect of lectin from *Lonchocarpus sericeus* seeds in an experimental rat model of infectious peritonitis. *J Pharm Pharmacol* 57, 919-922, 2010.
- AGGARWAL, B. B. BHARDWAJ, A., AGGARWAL, R. S., SEERAM, N. P., SHISHODIA, S., TAKADA, Y. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res*, 24, 2783-2840, 2004.
- BAILEY, A. E. Bailey's Industrial Oil and Fat Products, 5th ed., John Wiley: New York, 1996, vol. 3.
- BAILEY-SERRES, J., MITTLER, R. The Roles of Reactive Oxygen Species in Plant Cells. The Roles of Reactive Oxygen Species in Plant Cells. *Plant Physiol.*, 141, 311, 2006.
- 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. *J. Mol. Biol.*, 259, 281–296, 1996.

BAUR, J., SINCLAIR, D. A. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5, 493–506, 2006.

BEHLING, E. B. SENDÃO, M. C., FRANCESCATO, H. D. C. L. M. G., BIANCHI, M. L. P. Flavonóide Quercetina Aspectos Gerais e Ações Biológicas. *Alim. Nutr.*, 15, 285-292, 2004.

BELQUENDOUZ, L., FREMONT, L., LINARD, A. Resveratrol inhibits metal ion-dependent and independent peroxidation of porcine low-density lipoproteins. *Biochem Pharmacol*, 9, 1347-1355, 1997.

BERTELLI, A. A. E, GIOVANNINI L-GIANNESI, D., MIGLIORI, M., BERNINI, W., FREGONI, M. Antiplatelet activity of synthetic and natural resveratrol in red wine. *Int J Tissue React*, 17, 1–3, 1995.

BERTINI, L., PROIETTI, S., ALEANDRI, M. P., MONDELLO, F., SANDINI, S., CAPORALE, C. Modular structure of HEL protein from Arabidopsis reveals new potential functions for PR-4 proteins. *Biol Chem.*, 4, 1-14, 2012.

BEZERRA, E. H. S., ROCHA, B. A. M., NAGANO, C. S., BEZERRA, G. A. A., MOURA, T. R., BEZERRA, M. J. B., BENEVIDES, R. G., SAMPAIO, A. H., DELATORRE, P., CAVADA, B. S. Structural analysis of conbr reveals molecular correlation between the carbohydrate recognition domain and endothelial no synthase activation. *Biochem.Bioph Res*, 408, 566-570, 2011.

BEZERRA, G. A., OLIVEIRA, T. M., MORENO, F. B. M. B., SOUZA, E. P., ROCHA, B. A. M., BENEVIDES, R. G., DELATORRE, P., AZEVEDO JR., W. F., CAVADA, B. S. Structural analysis of *Canavalia maritima* and *Canavalia gladiata* lectins complexed with different dimannosides: New insights into the understanding of the structure-biological activity relationship in legume lectins. *J. Struct. Biol*, 160, 168-176, 2007.

BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181, 1199 – 1200, 1958.

BRINDA, K. V., MITRA, N., SUROLIA, A., VISHVESHWARA, S. Determinants of quaternary association in legume lectins. *Protein Science*, 13, 1735-1749, 2004.

CALVETE, J. J., THOLE, H. H., RAIDA, M., URBANKE, C., ROMERO, A., GRANGEIRO, T. B., RAMOS, M. V., ALMEIDA, D. A., ROCHA, I. M., GUIMARÃES, F. N., CAVADA, B. S. Molecular characterization and crystallization of Diocleinae lectins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1430, 367–375, 1999.

CARRINGTON, D. M., AUFFRET, A., HANKE, D. E. Polypeptide ligation occurs during post-translational modification of Concanavalin A. *Nature*. 313, 3, 64-67, 1985.

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

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

CAVADA, B. S., RAMOS, M. V., CORDEIRO, E. F., GRANGEIRO, T. B., OLIVEIRA, J. T. A., CARVALHO, A. F. F. U., MOREIRA, R. A. Purification and partial characterization of a lectin from *Dioclea virgata* Benth seeds. *Revista Brasileira de Fisiologia*, 8, 37-42, 1996b.

CAVALCANTE, A.A.C.M. Compostos Fenólicos, Carotenos e Vitamina C na Atividade Antioxidante do Suco de Caju e da Cajuína. In : *Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica*, 2006.

CECCATTO, V. M., CAVADA, B. S., NUNES, E. P., NOGUEIRA, N. A. P., GRANGEIRO, M. B., MORENO, F. B. M. B., TEIXEIRA, E. H., SAMPAIO, A. H., ALVES, M. A. O., RAMOS, M. V., CALVETE, J. J., GRANGEIRO, T. B. Purification and partial characterization of a lectin from *Canavalia grandiflora* Benth. seed. *Protein and Peptide Letters*, 9, 67-73, 2002.

CHANG, X., HEENE, E., QIAO, F., NICK, P. The phytoalexin resveratrol regulates the initiation of hypersensitive cell death in *Vitis* cell. *PLoS One*, 6, e26405, 2011.

CHEW, Y. L., LIM, Y. Y., OMAR, M., KHOO, K. S. Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asia. *LWT-Food Science and Technology*, 41, 1067-1072, 2008.

COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT NUMBER 4. The CCP4 suite: programs for crystallography. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr*, 50, 760–763 1994.

COOLINGE, D. B., KRAGH, K. M., MIKKELSEN, J. D., NIELSEN, K. K., RASMUSSEN, U., VAD, K. Plant chitinases. *Plant Journal*, 3, 31-40, 1993.

COUTO, M. A. L., CANNIATTI-BRAZACA, S. G. Quantificação de vitamina C e capacidade antioxidante de variedades cítricas. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 30, 15-19, 2010.

CREASY, L. L., COFFEE, M., Phytoalexin production potential of grape berries. *J Am Soc Hortic Sci*, 113, 230-234, 1988.

DAVIS, I. W., LEAVER-FAY A., CHEN, V. B., BLOCK, J. N., KAPRAL, G. J., WANG, X., MURRAY, L. W., ARENDALL, W. B. R. D., SNOEYINK, J. RICHARDSON, J. S., RICHARDSON, D. C. MolProbity: all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Res*, 35, 375–383 2007.

DELANO, W. L. The Pymol Molecular Graphics System. DeLano Scientific, San Carlos, CA. 2002.

DELATORRE, P., ROCHA, B. A. M., GADELHA, C. A. A., SANTI-GADELHA, T., CAJAZEIRAS, J. B., SOUZA, E. P., NASCIMENTO, K. S., FREIRE, V. N., SAMPAIO, A. H., AZEVEDO JR., W. F. CAVADA, B. S. Crystal structure of a lectin from *Canavalia maritima* (ConM) in complex with threalose and maltose reveals relevant mutation in ConA-like lectins. *J. Struct. Biol*, 154, 280-286, 2006.

DELATORRE, P., ROCHA, B. A., SOUZA, E. P., OLIVEIRA, T. M., BEZERRA, G. A., MORENO, F. B. M. B., FREITAS, B. T., SANTI-GADELHA, T., SAMPAIO, A. H., AZEVEDO JR, W. F., CAVADA, B. S. Structure of a lectin from *Canavalia gladiata* seeds: new structural insights for old molecules. *BMC Struct. Biol.* 7, 52, 2007.

DELATORRE, P., SILVA-FILHO, J. C., ROCHA, B. A. M, SANTI-GADELHA, T., DA NÓBREGA, R. B., GADELHA, C, A., DO NASCIMENTO, K, S., NAGANO, C. S., SAMPAIO, A. H., CAVADA, B. S. Interactions between indole-3-acetic acid (IAA)

with a lectin from *Canavalia maritima* seeds reveal a new function for lectins in plant physiology. *Biochimie*, 95, 1697-703, 2013.

DELAUNOIS, B., CORDELIER, S., CONREUX, A., CLÉMENT, C., JEANDET, P. Molecular engineering of resveratrol in plants. *Plant Biotechnol J*, 7, 2-12. 2009.

DE LA LASTRA C. A., VILLEGAS I. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. *Biochem Soc Trans.*, 35, 1156-1160, 2007.

DUARTE-ALMEIDA, J. M., SANTOS, R. J., GENOVESE, M. I., LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico e método de sequestro de radicais DPPH. *Ciênc. tecnol. alimen.*, 26, 446-452, 2006.

EDELMAN, G. M., WANG, J. L. Binding and functional properties of Concanavalin A and its derivatives. III interactions with indoleacetic acid and other hydrophobic ligands. *J. Biol. Chem*, 253, 3016–3022, 1978.

EVANS, P. R. Scala. Joint CCP4 and ESF-EACBM. *Newsletter*, 33, 22-24, 1997.

FERRO, C. O., CHAGAS, V. L. A., OLIVEIRA, M. F., OLIVEIRA, P. L., SCHANAIDER, A. Atividade da catalase no pulmão, rim e intestino delgado não isquemiado de ratos após reperfusão intestinal. *Rev. Col. Bras. Cir.*, 37, 31-38, 2010.

FRANKEL, E. N., WATERHOUSE, A. L., KINSELLA, J.E. Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *Lancet*, 24, 1103–1104, 1993.

GABIUS, H. J. Biological information transfer beyond the genetic code: the sugar code. *Naturwissenschaften*, 87, 108–121, 2000.

GADELHA, C. A. A., MORENO, F. B. M. B., SANTI-GADELHA, T., CAJAZEIRAS, J. B., RODRIGUES, J. K., TUPINAMBA, B. F., CANDURI, F., DELATORRE, P., FILGUEIRA, A. W., CAVADA, B.S. Crystallization and preliminary x-ray diffraction analysis of a lectin from *Canavalia maritima* seeds. *Acta Crystallogr.* 61, 87–89, 2005a.

GADELHA, C. A. A., MORENO, F. B. M. B., SANTI-GADELHA, T., CAJAZEIRAS, J. B., ROCHA, B. A. M., ASSREUY, A. M. S., MOTA, M. R. L., PINTO, N. V., MEIRELES, A. V. P., BORGES, J. C., FREITAS, B. T., CANDURI, F., SOUZA, E. P., DELATORRE, P., CRIDLLE, D. N., AZEVEDO JR., W. F., CAVADA, B. S. Native

crystal structure of a nitric oxide releasing lectin from the seeds of *Canavalia maritima*. *J. Struct. Biol*, 152, 185-195, 2005b.

GALLEGO DEL SOL, F., NAGANO, C. S., MORENO, F. B. M. B. Diocleinae lectins: clues to delineate structure/function correlations. *Methods In Proteome And Protein Analysis*, 81–91, 2004.

GALLEGO DEL SOL, F., CAVADA, B. S., CALVETE, J. J. Crystal structures of *Cratylia floribunda* seed lectin at acidic and basic pHs. Insights into the structural basis of the pH-dependent dimer–tetramer transición. *J Struct.Biol*, 158, 1-9, 2007.

GENG, J. G. Interaction of vascular endothelial cells with leukocytes, platelets and cancer cells in inflammation, thrombosis and cancer growth and metastasis. *Acta Pharmacol Sin*, 24, 1297-300, 2003.

GILL, S. S, TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem*, 48, 909-930, 2010.

GOEL, M., ANURADHA, P., KAUR, K. J., MAIYA, B.G., SWAMY. M.J., SALUNKE, D.M. Porphyrin binding to jacalin is facilitated by the inherent plasticity of the carbohydrate-binding site: novel mode of lectin-ligand interaction. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.*, 60 281-288, 2004.

GOEL, M., JAIN, D., KAUR, K. J., KENOTH, R., MAIYA, B. G., SWAMY, M. J., SALUNKE. D. M. Functional equality in the absence of structural similarity: an added dimension to molecular mimicry. *J Biol Chem.*, 19, 39277-39281, 2001.

GOLDSTEIN, I. J. My Favorite Enzyme: For Love of Lectins. *IUBMB Life*, 623, 247–250, 2010.

HARDMAN, K. D. A. I. N., SWORTH, C. F. Structure of Concanavalin A at 2.4 Å resolution. *Biochemistry*, 11, 4910–4919, 1972.

HSIEH T-Z, JUAN G, DARZYNKIEWICZ, Z. W. U. J. M. Resveratrol increases nitric oxide synthase, induces accumulation of p53 and p21, and suppresses cultured bovine pulmonary artery endothelial cell proliferation by perturbing progression through S and G2. *Cancer Res*, 59, 2596–601, 1999.



HIRABAYASHI, J., KASAI, K. Effect of amino acid substitution by sited-directed mutagenesis on the carbohydrate recognition and stability of human 14-kDa beta-galactoside-binding lectin. *J. Biol.Chem*, 266, 23648-23653, 1991.

JANCARIK, J., KIM, S. H. Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. *Journal of Applied Crystallography*, 24, 409-411, 1991.

JEANDET, P., DOUILLET-BREUIL, A. C., BESSIS, R., DEBORD, S., SBAGHI, M., ADRIAN, M. Phytoalexins from the vitaceae: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. *J Agric Food Chem*, 50, 2731-2741. 2002.

KANELLOPOULOS, P. N., PAVLOU, K., PERRAKIS, A., AGIANIAN, B., VORGIAS, C. E., MAVROMMATIS, C., SOUFI, M., TUCKER, P. A., HAMODRAKAS, S. J. The crystal structure of the complexes of concanavalin A with 40-nitrophenyl-alpha-D-mannopyranoside and 40-nitrophenylalpha-D-glucopyranoside. *J. Struct. Biol.* 116, 345-355, 1996.

KHANDUJA, K, L., BHARDWAJ, A. Stable free radical scavenging and antiperoxidative properties of resveratrol compared in vitro with some other bioflavonoids. *Indian J Biochem Biophys*, 4, 416-22, 2003.

KOMATH, S. S., KAVITHAB, M., SWAMY, M. J. Beyond carbohydrate binding: new directions in plant lectin research. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 4, 973-988, 2006.

KUC, J. Phytoalexins, stress metabolism, and disease resistance in plants. *Annu Rev Phytopathol*, 33, 275-297. 1995.

LAEMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685, 1970.

LANGCAKE, P., PRYCE, R. J. The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury, *Physiol Plant Pathol*. v. 9, p. 77-86. 1976.

- LEONARD, S. S., XIA, C., JIANG, B. H., STINEFELT, B., KLANDORF, H., HARRIS, G. K., SHI, X. Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses. *Biochem Biophys Res Commun*, 309, 1017-26, 2003.
- LESLIE, A. G. W. MOSFLM User's Guide: MOSFLM Version 550. MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, England. 1997
- LIU, W., NICHOLS, A. F., GRAHAM, J. A., DUALAN, R., ABBAS, A., LINN, S. Nuclear transport of human DDB protein induced by ultraviolet light. *J Biol Chem*, 275, 21429 – 21434, 2000.
- LORIS, R., HAMELRYCK, T., BOUCKAERT J. Legume lectin structure, *Biochim Biophys Acta*, 1383, 9–36, 1998.
- LORIS, R. Principles of structures of animal and plant lectins. *Biochim Biophys Acta*. 1572, 198–208, 2002.
- MAIA, M. S., BICUDO, S.D. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 33, 183-193, 2009.
- MANACH, C., MAZUR, A., SCALBERT, A. Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. *Current Opinion in Lipidology*, 16, 77–84, 2005.
- MATTHEWS, B. W. Solvent content of protein crystals. *J. Mol. Biol*, 33, 491–497 1968.
- MITCHELL, S. W., REICHERT, E. T. Researches upon the venoms of poisonous serpents, *Smithson. Contrib. Knowl*, XXVI, 155, 1886.
- MITCHELL, S. W. Researches upon the venom of the rattlesnake, *Smithson. Contrib. Knowl*, XII. 89–90, 1860.
- MOREIRA, R. A., CAVADA, B. S. Lectin from *Canavalia brasiliensis* (mart.). isolation, characterization and behavior during germination. *Biol. Plant*, 28, 113-120, 1984.
- MOREIRA, R. A. CORDEIRO, E. F., GRANGEIRO, T. B., RAMOS, M. V., MARTINS, J. L., CAVADA, B. S., OLIVEIRA, J. T. A. Isolation and partial

characterization of a lectin from *Dioclea violacea* Benth seeds. *Revista Brasileira de Fisiologia*, 8, 1, 23-29, 1996.

MOREIRA, R. A., MONTEIRO, A. C. O., HORTA, A. C. G., OLIVEIRA, J. T. A., CAVADA, B. S. Isolation and characterization of alectin from *Dioclea altissima* var *Megacarpa* seeds lectin. *Phytochemistry*. 46, 139-144, 1997.

MOREIRA, R. A., PERRONE, J. C. Purification and partial characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiology*, 59, 783-787. 1977.

MORENO, F., DE OLIVEIRA, T., MARTIL, D., VICOTI, M., BEZERRA, G., ABREGO, J., CAVADA, B., AZEVEDOJR, W. F. Identification of a new quaternary association for legume lectins. *Journal of Structural Biology.*, 161, 133-143, 2008.

MURDOCK, L. L., SHADE, R. E. Lectins and protease inhibitors as plant defenses against insects. *J Agric Food Chem*, 50, 6605-6611, 2002.

NAGANO, C. S., CALVETE, J. J., BARETTINO, D., PÉREZ, A., CAVADA, B. S., SANZ, L. Insights in to the structural basis of the pH-dependent dimer–tetramer Equilibrium through crystallographic analysis of recombinant Diocleinae lectins. *Biochem. J.*, 409, 417 – 428, 2008.

O'BRIEN, J. A., DAUDI, A., BUTT, V. S., BOLWELL, G.P. Reactive xygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism. *Planta*, 236, 765-79, 2012.

OLIVEIRA, J. T. A., CAVADA, B. S., MOREIRA, R. A. Isolation and partial characterization of a lectin from *Cratylia floribunda* Mart. seeds. *Revista Brasileira de Botânica*, 14, 61-66, 1991.

OLIVEIRA, T. M., DELATORRE, P., ROCHA, B. A. M., SOUZA, E. P., NASCIMENTO, K. S., BEZERRA, G. A., MOURA, T. R., BENEVIDES, R. G., BEZERRA, E. H. S., MORENO, F. B. M. B., FREIRE, V. N., AZEVEDO JR., W. F., CAVADA, B. S. Crystal structure of dioclea rostrata lectin: insights into understanding the pH-dependent dimer-tetramer equilibrium and the structural basis for carbohydrate recognition in Diocleinae lectins. *J. Struct. Biol.* 164, 177 - 182, 2008.

PACE-ASCIAK, C. R., HAHN, S., DIAMANDIS, E. P., SOLEAS, G., GOLDBERG, D. M. The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet

aggregation and eicosanoid synthesis: implications for protection against coronary heart disease. *Clin Chim Acta*, 235, 207–19, 1995.

PACE-ASCIAK C. R., ROUNOVA, O., HAHN, S. E., DIAMANDIS, E. P., GOLDBERG, D. M. Wines and grape juices as modulators of platelet aggregation in healthy human subjects. *Clin Chim Acta*, 246, 163– 82, 1996.

PENDURTHI, U. R., RAO, L. V. Resveratrol suppresses agonist-induced monocyte adhesion to cultured human endothelial cells. *Thromb Res.*, 15, 243-248, 2002.

PEUMANS, W. J., BARRE, A., HAO, Q., ROUGÉ, P., VAN DAMME, E. J. M. Higher plants developed structurally different motifs to recognize foreign glycans. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, 12, 83-101, 2000.

PEUMANS, W. J., STINISSEN, H. M. Gramineae lectins: occurrence, molecular biology, and physiological function. In: Chemical Taxonomy, Molecular Biology and Function of Plant Lectins. 99-138, 1983

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

PEUMANS, W. J., VAN DAMME, E. J., BARRE, A. ROUGÉ, P. Classification of plant lectins in families of structurally and evolutionary related proteins. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 491, 27-54, 2001.

PEUMANS, W. J., WINTER, H. C., BEMER, V., VAN LEUVEN, F., GOLDSTEIN, I. J., TRUFFA-BACHI, P., VAN DAMME, E. J. M. Isolation of a novel plant lectin with an unusual specificity from *Calystegia sepium*. *Glycoconjugate J.*, 14, 259-265, 1997.

PEUMANS, W. J., VAN DAMME, E. J. Plant lectins: specific tools for the identification, isolation, and characterization of O-linked glycans. *Biochem. Mol. Biol.*, 33, 209-58, 1998.

PEUMANS, W. J., HAUSE, B., VAN DAMME, E. J. The galactose-binding and mannose-binding jacalin-related lectins are located in different sub-cellular compartments. *FEBS Letters*, 477, 186-192. 2000.

PIER-GIORGIO, P. Flavonoids as Antioxidants. *J. Nat. Prod.*, 63, 1035–1042, 2000.

PRAKASHKUMAR, R., PUSHPANGADAN, P., VIJAYAKUMAR, T. Search for lectins in seeds of tropical trees of Kerala, India. *Biol. Planta*, 40, 155-158, 1998.

PUSZTAI, A. Plant lectins. *Cambridge University Press*, Cambridge, 1991.

RAMOS, M. V., MOREIRA, R. A., CAVADA, B. S., OLIVEIRA, J. T. A., ROUGE, P. Interaction of lectins from the sub tribe Diocleinae with specific ligands. *Rev.Bras.Fisiol.*, 8, 193-199, 1996.

RATANAPO, S., NGAMJUNYAPORN, W., CHULAVATNATOL. M. Interaction of a mulberry leaf lectin with a phytopathogenic bacterium, *P. syringae* pv *mori*. *Plant Sci.*, 160, 739–744, 2001.

RAY, P. D., HUANG, B. W., TSUJI, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal*, 24, 981-990, 2012.

REGEV-SHOSHANI, G, SHOSEYOV, O., BILKIS, I., KEREM, Z. Glycosylation of resveratrol protects it from enzymic oxidation. *Biochemistry Journal*, 374, 157–163, 2003.

RENAUD, J., BOURNIVAL, J., ZOTTIG, X., MARTINOLI, M. G. Resveratrol Protects DAergic PC12 Cells from high glucose-induced oxidative stress and apoptosis: Effect on p53 and GRP75 localization. *Neurotox Res.*, 25, 110-23, 2014.

ROCHA, B. A. M., DELATORRE, P., OLIVEIRA, T. M., BENEVIDES, R. G., PIRES, A. F., SOUSA, A. A. S., SOUZA, L. A. G., ASSREUY, A. M. S., DEBRAY, H., AZEVEDO, W. F., SAMPAIO, A. H., CAVADA, B. S. Structural basis for both pro- and anti-inflammatory response induced by mannose-specific legume lectin from *Cymbosema roseum*. *Biochimie*, 93: 806 - 816, 2011.

ROMERO-PEREZ, A. I., IBERN-GOMEZ, M., LAMUELA-RAVENTOS, R. M., L. A., TORRE-BORONAT, M. C. Piceid, the major resveratrol derivative in grape juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1533–1536, 1999.

SAMPIETRO, A. R., ISLA, M. A., QUIROGA, E. N., VATTUONE, M. A., An *N*-acetylglucosamine oligomer binding agglutinin (lectin) from ripe *Cyphomandra betacea* Sendt. Fruits. *Plant Science*, 160, 659-67, 2001.

- SCHÜTTELKOPF, A. W., VAN AALTEN, D. M. F. PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. *Acta Crystallogr Sect D*, 60, 1355–1363, 2004.
- SHARMA, P., JHA, A. B., DUBEY, R. S., PESSARAKLI, M. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany*, 2012, 26, 2012,.
- SHARON, N.; LIS, H. Carbohydrates in cell recognition. *Scientific American*, 74-80, 1993.
- SHARON, N., LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules; *Glycobiology*, 14, 53-62, 2004.
- SHARON, N., LIS, H. Legume lectins- A large family of homologous proteins. *FASEB J.*, 4, 3198–3208, 1990.
- SHARON, N. Lectins: Carbohydrate-specific Reagents and Biological Recognition Molecules. *The Journal of Biological Chemistry*, 282, 2753-2764, 2007.
- SINHA, S., GUPTA, G., VIJAYAN, M., SUROLIA, A. Subunit assembly of plant lectins. *Current Opinion in Structural Biology*. 17, 5, 498-505, 2007.
- SOLEAS, G. J., DIAMANDIS, E. P., GOLDBERG, D. M. Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? *Clin Biochem.*, 30, 91-113, 1997.
- SRINIVAS, V. R., ACHARYA, S., RAWAT, S., SHARMA, V., SUROLIA, A. The primary structure of the acidic lectin from winged bean *Psophocarpus tetragonolobus*: insights in carbohydrate recognition, adenine binding and quaternary association. *FEBS Lett.*, 474, 76, 2000.
- SRINIVAS, V. R., REDDY, G. B., AHMAD N. Legume lectin family, the ‘natural mutants of the quaternary state’, provide insights into the relationship between protein stability and oligomerization. *Biochimica Et Biophysica Acta - General Subjects*, 1527, 102-111, 2001.
- STILLMARK, H. Uber Ricin, ein giftiges Ferment aus den Samen von *Ricinus communis* L. und einigen anderen Euphorbiaceen, Tese de Doutorado, Universidade de Dorpat, Estônia, 1888.

STIRPE, F., BATTELLI, M. G. Ribosome-inactivating proteins: progress and problems. *Cell Mol. Life Sci.*, 63, 1850-1866, 2006.

SUMNER, J. B. The globulins of the jack bean, *Canavalia ensiformis*, *J. Biol. Chem.* 37, 137-142, 1919.

SUSEELAN, K. N., MITRA, R., PANDEY, R., SAINIS, K. B., KRISHNA, T. G. Purification and characterization of a lectin from wild sunflower (*Helianthus tuberosus* L.) tubers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 407, 241-247, 2002.

THOMSEN, R., CHRISTENSEN, M. H. MolDock: a new technique for highaccuracy molecular docking. *J Med Chem.*, 49, 3315-3321, 2006.

TÖPFER-PETERSEN, E., CALVETE, J. J. Sperm-associated protein candidates for primary zona pellucida-binding molecules: structure-function correlations of boar spermadhesins. *J. Reprod Fertil Suppl.*, 50, 55-61, 1996.

TOSCANO, M. A., ILARREGUI, J. M., BIANCO, G. A., CAMPAGNA, L., CROCI, D. O., SALATINO, M., RABINOVICH, G. A. Dissecting the pathophysiologic role of endogenous lectins: glycan-binding proteins with cytokine-like activity? *Cytokine Growth Factor Rev.*, 18: 57-71, 2007.

VAN DAMME, E. J., BARRE, A., SMEETS, K., TORREKENS, S., VAN LEUVEN, F., ROUGE, P. The bark of *Robinia pseudoaccacia* contains a complex mixture of lectins. *Plant Physiol.*, 107, 833-43, 1995

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. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 17 575-692, 1998.

VARGIN, A., TEPLYAKOV, A. MOLREP: an automated program for molecular replacement. *J. Appl. Crystallogr.*, 30, 1022-1025, 1997.

VASCONCELOS, I. M., CAVADA, B. S., MOREIRA, R. A., OLIVEIRA, J. T. A. Purification and partial characterization of a lectin from the seeds of *Dioclea guianensis*. *Journal of Food Biochemistry*, 15, 137-154, 1991.

VASTA, G. R., AHMED, H., D. U., S., HENRIKSON, D. Galectins in teleost fish: Zebrafish (*Danio rerio*) as a model species to address their biological roles in development and innate immunity. *Glycoconj J.*, 21, 503-21, 2004.

WAH, D. A., ROMERO, A., GALLEGO DEL SOL, F., CAVADA, B. S., RAMOS, M. V., GRANGEIRO, T. B., SAMPAIO, A. H. AND CALVETE, J. J. Crystal structure of native and Cd/Cd-substituted *Dioclea guianensis* seed lectin. A novel manganese-binding site and structural basis of dimer-tetramer association. *J. Mol. Biol.*, 310, 885–894, 2001.

WALJUNO, K., SCHOLMA, R.A., BIENTEM, J., MARIONO, A., HAHN, A.M.. Amino acid sequence of heveine. *Proc. Int. Rubber Conf., Kuala Lumpur*, 2, 518-531, 1975.

WANG, T. JÓNSDÓTTIR, R., ÓLAFSDÓTTIR, G. Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. *Food Chemistry*, 116, 1, 240-248, 2009.

WILLIAMS, A., WESTHEAD D. R. Sequence relationships in the legume lectin fold and other jelly rolls. *Protein Engineering*, 15 771–774, 2002.



# **ANEXO**

**Structural basis of ConM binding with resveratrol, an  
anti-inflammatory and antioxidant polyphenol**

**(Paper Publicado no International Journal of  
Biological Macromolecules)**



## Structural basis of ConM binding with resveratrol, an anti-inflammatory and antioxidant polyphenol



Bruno A.M. Rocha<sup>a</sup>, Claudener S. Teixeira<sup>a,b</sup>, José C. Silva-Filho<sup>c</sup>, Raphael B. Nóbrega<sup>a</sup>, Daniel B. Alencar<sup>d</sup>, Kyria S. Nascimento<sup>a</sup>, Valder N. Freire<sup>e</sup>, Carmem J.S. Gottfried<sup>f</sup>, Celso S. Nagano<sup>c</sup>, Alexandre H. Sampaio<sup>c</sup>, Silvana Saker-Sampaio<sup>c</sup>, Benildo S. Cavada<sup>a,\*</sup>, Plínio Delatorre<sup>b,\*\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, BioMol-Lab, Campus do Pici S/N, 60440-970 Fortaleza, Ceará, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Regional do Cariri, Campos Sales, Ceará, Brazil

<sup>c</sup> Departamento de Biologia Molecular, Universidade Federal da Paraíba, Campus I, Cidade Universitária, 58059-900 João Pessoa, Paraíba, Brazil

<sup>d</sup> Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará, BioMol-Group, Campus do Pici S/N, Fortaleza, Ceará, Brazil

<sup>e</sup> Departamento de Física, Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici S/N, 60455-760 Fortaleza, Ceará, Brazil

<sup>f</sup> Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90035-003 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 21 November 2013

Received in revised form 12 August 2014

Accepted 13 August 2014

Available online 2 September 2014

#### Keywords:

Resveratrol

Anti-inflammatory

Antioxidant

### ABSTRACT

Resveratrol can also inhibit the activation of proinflammatory mediators and cytokines at the early gene expression stage. It is well known that lectins are sugar-binding proteins that act as both pro- and anti-inflammatory molecules. Thus, the objective of this work was to verify the binding of a polyphenol compound with a lectin of *Canavalia maritima* (ConM) based on their ability to inhibit pro-inflammatory processes. To accomplish this, ConM was purified and crystallized, and resveratrol was soaked at 5 mM for 2 h of incubation. The crystal belongs to the monoclinic space group C2, the final refinement resulted in an  $R_{\text{factor}}$  of 16.0% and an  $R_{\text{free}}$  of 25.5%. Resveratrol binds in the rigid  $\beta$ -sheet through H-bonds and hydrophobic interaction with amino acids that compose the fifth and sixth  $\beta$ -strands of the rigid  $\beta$ -sheet of ConM. The ConM and resveratrol inhibited DPPH oxidation, showing synergic activity with the most effective ratio of 2:3 and carbohydrate binding site is not directly related to antioxidant activity. It is the interaction between ConM and resveratrol that indicates the synergism of these two molecules in acting as free radicals scavengers and in reducing the inflammatory process through the inhibition of many pro-inflammatory events.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Stilbenes constitute a small family of phenylpropanoids produced in a number of unrelated plant species, including dicotyledon angiosperms, such as grapevine (*Vitis vinifera*), peanut (*Arachis hypogaea*), Japanese knotweed (*Fallopia japonica*, formerly *Polygonum cuspidatum*), as well as monocotyledons like sorghum (*Sorghum bicolor*) and gymnosperms, such as several *Pinus* and *Picea* species. In addition to their participation in both

constitutive and inducible defense mechanisms in plants, several stilbenes display important pharmacological properties. Since resveratrol (3,5,4' trihydroxy-trans-stilbene) was postulated to provide health benefits associated with a moderate consumption of red wine [1], plant stilbenes have received considerable scientific interest [2].

The phenylpropanoid pathway, derived from phenylalanine, illustrates perfectly this phenomenon, as it gives rise to a large diversity of phenolic compounds playing key roles in plants, including participation in structural polymers, defense against herbivores and pathogens, protection from abiotic stress, as well as important functions in plant–pollinator interactions [2]. Nowadays, resveratrol ranks among the most extensively studied natural products, and hundreds of studies have shown that it can slow the progression of a wide variety of illnesses, including cancer and cardiovascular disease, as well as extend the lifespans of various organisms [3].

\* Corresponding author. Tel.: +55 85 33669818; fax: +55 85 33669818.

\*\* Corresponding author at: Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici, 60440-970, Fortaleza, Ceará, Brazil.

E-mail addresses: [bscavada@ufc.br](mailto:bscavada@ufc.br) (B.S. Cavada), [plidelatorre@gmail.com](mailto:plidelatorre@gmail.com) (P. Delatorre).

Resveratrol is a naturally occurring polyphenol found especially in grape skin, nuts, pomegranate and *Poligonum cuspidatum*. It has been hypothesized that resveratrol contributes to a polyphenol-rich Mediterranean diet by its ability to reduce the incidence of such age-related disorders as coronary heart disease, cancer and dementia [4,5]. In grape juices and in *P. cuspidatum*, it was found that the average concentration of piceid (resveratrol-3-O- $\beta$ -monod-glucoside; polydatin), the glycoside form of resveratrol, is seven times that of resveratrol and that this is probably the most abundant form of resveratrol in nature [6,7]. Piceid has its glucoside group bonded in position C-3 substitutes of a hydroxyl group. This substitution gives rise to conformational changes of the molecule, in turn resulting in changes to the biological properties. Piceid is more resistant to enzymatic oxidation than resveratrol and more soluble in water, and unlike resveratrol, which passively penetrates the cell, it enters the cell via an active mechanism using glucose carriers [6].

Resveratrol has been shown to downregulate vasoactive peptides, such as endothelins, inhibit oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL) and cyclooxygenase, inhibit the clearance and neurotoxicity of beta-amyloid, modulate apoptotic signaling pathways and activate sirtuin and AMP-activated protein kinase, which are believed to be involved in the caloric restriction-longevity effect [8].

The ability of polydatin and resveratrol to reinforce cytoprotective response in stress conditions has also been reported [9]. Red wines are rich in flavonoids and other polyphenolic constituents that have been shown in vitro to inhibit proatherogenic effects [10]. They include resveratrol-mediated inhibition of ox-LDL [4], inhibition of platelet aggregation and the synthesis of proatherogenic eicosanoids [11,12] inhibition of cell proliferation [13] increase in vasorelaxation [14] and inhibition of DNA damage due to reactive oxygen species (ROS) produced by the Fenton reaction [15].

ROS include free radicals such as superoxide anion ( $O_2^{\bullet-}$ ), hydroxyl radical ( $\bullet OH$ ), as well as non radical molecules like hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), singlet oxygen ( $^1O_2$ ), and so forth. Stepwise reduction of molecular oxygen ( $O_2$ ) by high-energy exposure or electron-transfer reactions leads to production of the highly reactive ROS [16]. ROS play an important signaling role in plants controlling processes such as growth, development, and response to biotic and abiotic environmental stimuli [17]. However, all ROS are extremely harmful to organisms at high concentrations, which may cause various biological effects, including, apoptosis and cell necrosis [18]. Stress-induced ROS accumulation is counteracted by enzymatic antioxidant systems that include a variety of scavengers, such as superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX), glutathione peroxidase (GPX), glutathione transferase (GST), and catalase (CAT) and non-enzymatic low molecular metabolites, such as ascorbate, glutathione,  $\alpha$ -tocopherol, carotenoids and flavonoids e.g., resveratrol [19].

In addition to the action as free radical scavenger and antioxidant, resveratrol can suppress monocyte adhesion to endothelial cells (EC), which is one of the earliest steps in the formation of atherosclerotic lesion [20]. Dysfunctional endothelium expresses a number of adhesion molecules, including E-selectin, intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), to support monocyte adhesion to endothelium [21]. Thus, lowering monocyte adhesion to activated EC could provide protective effect against atherosclerosis, and this suppression of cell adhesion appears to be the result of downregulated E-selectin expression on EC by resveratrol [22]. The main cause of reduced E-selectin antigen expression on the EC surface has been reported by Ferrero and coworkers [23] who showed that resveratrol inhibited VCAM-1 and ICAM-1 expression in endothelial cells and also blocked the adhesion of monocytes (U937) and neutrophils to the activated endothelium. The inhibition of

agonist-induced E-selectin mRNA expression has also been reported [23].

The pathophysiology of various inflammatory diseases is a complex process mediated by inflammatory and immune cells, such as macrophages and monocytes. However, resveratrol can also inhibit the activation of proinflammatory mediators and cytokines at the early gene expression stage [14]. Resveratrol has been shown to downregulate LPS-induced release of proinflammatory factors (NO, PGE2, iNOS and COX) and proinflammatory mediators (TNF- $\alpha$  and IL-1b) in RAW 264.7 macrophage cells pretreated with resveratrol.

It is well known that lectins, which are sugar-binding proteins that act as both pro- and anti-inflammatory molecules [24], bind reversibly to carbohydrates and can interfere in inflammatory events. The native (PDB ID: 2CWM) crystal structure of ConM was determined. The structure revealed that, although, Ser202 and His205 conformation were involved in ConM binding activity, they were not directly related to carbohydrate binding site [25]. This hypothesis was confirmed when ConM was solved in complex with disaccharides (trehalose, maltose – PDB ID: 2CYF, and dimannosides – PDB ID: 2P37), which revealed the importance of them in the carbohydrate recognition even without establishes direct interaction with disaccharides [26].

Thus, the objective of this work was to verify the binding of a polyphenol compound with a lectin of *Canavalia maritima* (ConM) based on their ability to inhibit pro-inflammatory processes and demonstrate the antioxidant activity of ConM and resveratrol, investigating the synergism between them.

## 2. Material and methods

### 2.1. Protein purification

Seeds from *Canavalia maritima* were ground to a fine powder in a coffee mill, and the soluble proteins were extracted at 298 K by continuous stirring with 0.15 M NaCl [1:10 (w:v)] for 1 h, followed by centrifugation at  $10,000 \times g$  at 277 K for 20 min. Protein purification was carried out by the affinity chromatography protocol previously described by Ramos and coworkers [27], using a Sephadex G-50 column ( $10 \times 50$  cm). This fraction (*Canavalia maritima* lectin – ConM) was freeze-dried, purity-tested by SDS-PAGE, and used in crystallization experiments. Resveratrol was purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA) and incubated with the protein for crystallization assays.

### 2.2. Crystallization and X-ray diffraction

Lyophilized purified *Canavalia maritima* lectin (ConM) was solubilized to a concentration of  $10 \text{ mg ml}^{-1}$  in 20 mM Tris–HCl, pH 7.6. Suitable crystals from ConM were obtained according to the protocol described by Gadelha and coworkers (2005) [25]. Native crystals were soaked with  $1 \mu\text{L}$  of resveratrol (5 mM) at 298 K for 2 h. X-ray data were collected at a wavelength of  $1.433 \text{ \AA}$ , using a synchrotron radiation source (MX1 Station, Brazilian Synchrotron Light Laboratory – LNLS, Campinas, Brazil) at 100 K using 30% PEG 400 as a cryoprotectant to avoid ice formation. A complete dataset was obtained using a MARCCD 165 detector (Marresearch, GmbH) in 120 frames with an oscillation range of  $1^\circ$ . The diffraction data were indexed, integrated, and scaled at  $2.5 \text{ \AA}$ , using MOSFLM and SCALA [28]. The crystal belongs to the monoclinic space group C2.

### 2.3. Molecular replacement and refinement

The crystal structure was determined by molecular replacement using MolRep [29]. The atomic coordinates used as a model were obtained from ConM complexed with maltose (PDB ID 2CYF) [26],

**Table 1**  
Statistics of data collection, refinement and structure quality.

Parameters	Values
Data collection	
Beamline wavelength	1.42 Å
Space group	C2
Exposure time per frame (sec)	30
Mosaicity	0.89°
Unit cell parameters (Å)	
A	119.7
B	67.5
C	70.4
α=γ	90°
β	125.8°
Total reflections	142,177
Number of unique reflections	15,213
Molecules per asymmetric unit	Dimer
Resolution limits (Å)	27.7–2.5 (2.6–2.5)
R <sub>merge</sub> <sup>b</sup> (%)	9.4 (40.6) <sup>a</sup>
Completeness (%)	95.6 (94.4) <sup>a</sup>
Multiplicity	2.6 (2.6)
I/σ (Average)	5.7 (1.9) <sup>a</sup>
Molecular replacement	
Correlation coefficient (%)	67.5
R <sub>factor</sub> <sup>c</sup> (%)	37.5
Refinement	
Resolution range (Å)	27.7–2.5 (2.6–2.5)
R <sub>factor</sub> <sup>c</sup> (%)	16.0
R <sub>free</sub> <sup>d</sup> (%)	25.5
B factor (Å <sup>2</sup> )	39.1
Wilson B (Å <sup>2</sup> )	45.19
Number of residues in asymmetric unit	474
Number of water molecules	89
RMS deviations	
Bond length (Å)	0.013
Bond angle (degree)	1.835
Ramachandran plot (%)	
Residues in most favored regions	86.7%
Residues in additional allowed regions	12.6%
Residues in generously allowed regions	0.8%

<sup>a</sup> Values in parenthesis represent the high resolution shell.

<sup>b</sup>  $R_{\text{merge}} = (\sum_{hkl} \sum_i |I(hkl) - \langle I(hkl) \rangle|) / (\sum_{hkl} \sum_i I(hkl))$  where  $I(hkl)$  is the intensity of  $i$ th measurement of the reflection  $h$  and  $\langle I(hkl) \rangle$  is the mean value of the  $I(hkl)$  for all  $I$  measurements.

<sup>c</sup>  $R_{\text{factor}} = (|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|) / |F_{\text{obs}}|$

<sup>d</sup> Calculated with 5% of the reflections omitted from refinement.

which had, after rotation and translation function calculations, a final correlation coefficient of 67.5% and an  $R_{\text{factor}}$  of 37.5%.

The initial structure was submitted to a rigid body and restrained refined using REFMAC5 (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994). The structure was modeled using WINCOOT 0.6.2 [30]. Resveratrol coordinates were obtained from PDBE/CHEM and added to the structure. A total of 89 water molecules were added, and a second restrained refinement was performed resulting in an  $R_{\text{factor}}$  of 16.0%, an  $R_{\text{free}}$  of 25.5%, and a FOM of 0.800. The stereochemistry of the structure was assessed using a Ramachandran plot analysis with Procheck [31], allowing the analysis of the  $\varphi$  and  $\psi$  angles, in addition to the root mean square deviation of the bonds. The graph confirmed the absence of residues in disallowed regions, and the deviations were within normal range. The molecular replacement and refinement data are shown in Table 1. The structure factors and coordinates were deposited in the Protein Data Bank under accession code number 4DPN. All structural figures were generated using PyMOL [32] and the omit map was calculated using Fo-Fc map at  $3\sigma$  by Omit program [33].

#### 2.4. Molecular docking of glycosylated resveratrol with ConM

The structure of ConM (PDB ID: 4DPN) was submitted to molecular docking with the glycosyl resveratrol in the carbohydrate

binding site and rigid  $\beta$ -strand site. Molecular docking analysis was performed with Molegro using the MolDock method [34]. MolDock is based on a search algorithm combining differential evolution with a cavity prediction algorithm. The program takes hydrogen bond directionality into account as an additional term in the docking scoring function. A re-ranking procedure was added to increase docking accuracy. MolDock Score (GRID) was calculated using scoring function. Grid resolution was 0.30 Å with radius of 15. The search algorithm used was Moldock Optimizer, with default settings. The number of runs was 10 and the maximum interactions were of 2000. The population size and max number of pose were 200 and 10, respectively. The protein–ligand interaction energy was expressed in the form of the MolDock score (MDS) [34] in arbitrary units. A more negative value reflects a stronger interaction.

#### 2.5. Effect of free-radical scavenging

The free-radical scavenging capacity of the lectin (ConM) and resveratrol were analyzed using the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) test according to the method of Blois (1958) [35], with some modifications. Quercetin was used as positive control. The carbohydrate binding site (CBS) of ConM was protected by 100 mM of mannose solution to investigate the relation of CBS with this activity. Briefly, 0.2 mL of MeOH and 0.3 mL of various ConM sample concentrations (5–100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and resveratrol (5–100  $\mu\text{M}$ ) were mixed in a 10-mL test tube. DPPH (2.5 mL of 160  $\mu\text{M}$  in MeOH) was then added to achieve a final volume of 3.0 mL. The solution was kept at room temperature for 30 min, and the absorbance was read at 517 nm using a microplate reader (Biochrom Asys UVM 340). The percentage of DPPH radical scavenging effect was calculated with the following equation:

$$\text{Scavenging effect (\%)} = \left[ 1 - \frac{\text{Abs}_{\text{sample}} - \text{Abs}_{\text{sample blank}}}{\text{Abs}_{\text{control}}} \right] \times 100\%$$

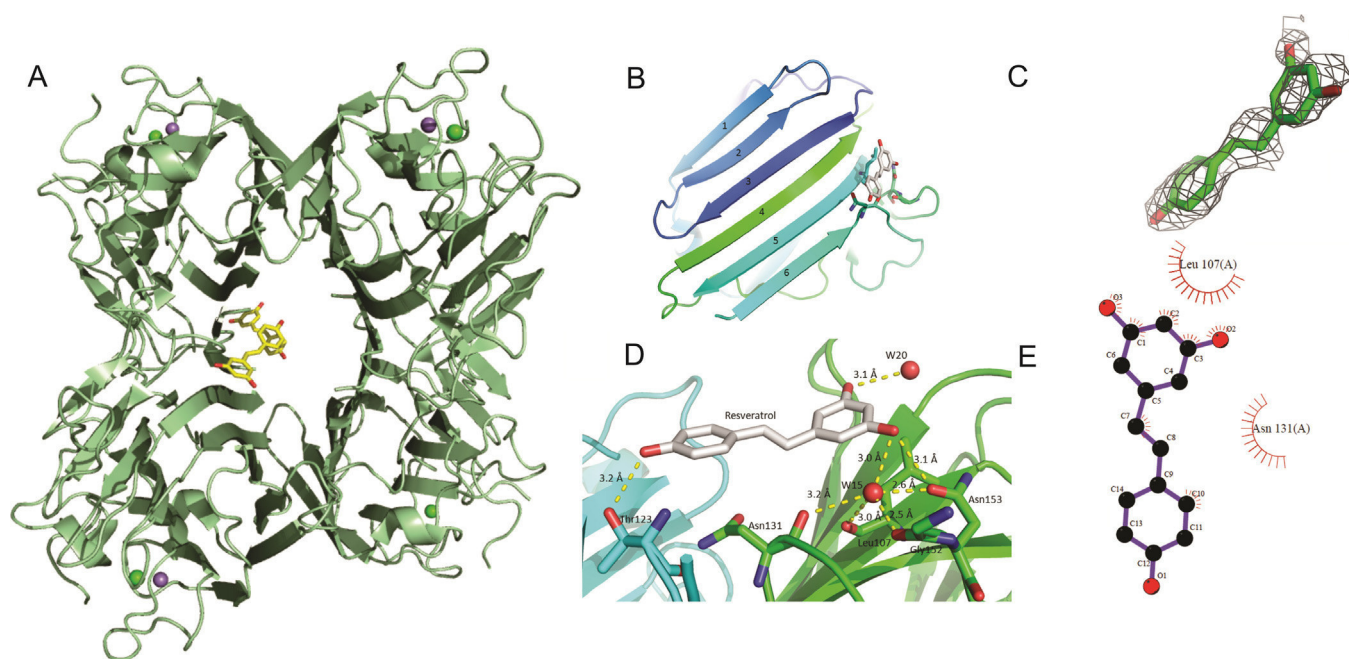
where  $\text{Abs}_{\text{control}}$  = DPPH without sample;  $\text{Abs}_{\text{sample}}$  = sample and DPPH; and  $\text{Abs}_{\text{sample blank}}$  = sample without DPPH.

### 3. Results

#### 3.1. Overall structure

The cell parameters for the monoclinic complex crystal structure of ConM were as follows:  $a = 119.7 \text{ \AA}$ ,  $b = 67.5 \text{ \AA}$  and  $c = 70.4 \text{ \AA}$ , and the Matthews coefficient was  $2.26 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$ , indicating the presence of a dimer in the asymmetric unit. The refined monomeric structure of ConM at a 2.5 Å resolution consists of 237 amino acids folded as a  $\beta$ -sandwich, as previously observed in other legume lectins. The tetrameric structure of the ConM complexed with resveratrol consists of two “canonical” dimers that are linked by salt bridges between  $\beta$ -sheets (Fig. 1a). Resveratrol (two molecules) was bound in the interface between the monomers that compose the canonical dimer, but there are two empty sites in the structure. Resveratrol is bound to only one of the dimers that compose the quaternary association of ConM, this could be due the ratio of protein and resveratrol was too big to permit that all binding sites were occupied. The monomers are characterized by three  $\beta$ -sheets that compose a  $\beta$ -sandwich domain: a rigid  $\beta$ -sheet with six  $\beta$ -strands (back), another rigid  $\beta$ -sheet curved with seven  $\beta$ -strands (front), and a small third  $\beta$ -sheet consisting of five  $\beta$ -strands connecting the other two [36]. Resveratrol interacts with the fifth and sixth rigid  $\beta$ -strand belonging to the A monomer and sixth rigid  $\beta$ -strand belonging to the symmetric monomer ( $-x, y, -z$ ). The A monomer and the symmetric monomer ( $-x, y, -z$ ) form the canonical dimer. Two canonical dimers, which are connected by polar contacts between  $\beta$ -strands, form the ConM quaternary structure.





**Fig. 1.** Crystal structure of ConM interacting with resveratrol through H-bonds and hydrophobic interactions in rigid  $\beta$ -sheet site. (A) Overall quaternary structure of ConM is composed of two resveratrol in one canonical dimer (yellow) molecules, and one  $\text{Ca}^{2+}$  (green) and one  $\text{Mn}^{2+}$  (purple) ion per monomer. (B) Rigid  $\beta$ -sheet visualization evidencing the fifth and sixth  $\beta$ -strands with which resveratrol bonds. (C) Omit map of resveratrol interaction with ConM contoured at  $1\sigma$ . (D) H-bonds established between resveratrol oxygens (O2 and O3) and solvent ( $\text{H}_2\text{O}$ ). Structural interstitial water favors interaction with LEU107, ASN131, GLY152 and ASN153. (E) Ligplot representation of hydrophobic interactions between resveratrol and Leu107 and ASN131. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

The carbohydrate binding site is placed at the curved side of the monomer next to the metal binding site [37]. The amino acids involved in metal binding are conserved, and the structures of the  $\text{Mn}^{2+}$  and  $\text{Ca}^{2+}$  binding sites showed similarities with those determined for other leguminous lectins. The binding of the  $\text{Ca}^{2+}$  metal ion drives the *trans*-to-*cis* isomerization of the Ala207–Asp208 peptide bond. This *cis*-peptide bond contributes to the stabilization of the binding pocket by orientating the positions of the Asn14 and Arg228 residues. Each of the metal ions is coordinated by four amino acid side chains and two water molecules: Glu8, Asp10, Asp19 and His24 with  $\text{Mn}^{2+}$  and Asp10, Tyr12, Asn14 and Asp19 with  $\text{Ca}^{2+}$ . In the case of the  $\text{Ca}^{2+}$  ion, one of the water molecules forms a bridge between the metal and the main-chain carbonyl group of Asp208. The sugar-binding site is a highly conserved region in concanavalin (ConA)-like lectins.

### 3.2. Resveratrol interacts with rigid $\beta$ -strand of ConM

The rigid  $\beta$ -sheet of ConA-like lectins is responsible for establishing weak interactions that stabilize the canonical dimers. Resveratrol binds in this region through H-bonds and hydrophobic interaction with amino acids that compose the fifth and sixth  $\beta$ -strands of the rigid  $\beta$ -sheet of ConM and sixth  $\beta$ -strand of the symmetric monomer (Fig. 1b). Fig. 1c confirms the interaction, showing the omit map calculated for resveratrol. The main polar contacts, which are intermediate for interstitial water ( $\text{H}_2\text{O}_{15}$ ) at 3.0 Å from resveratrol, interact with Leu107 (O), Asn153 (OD1) and Gly152 (O) at 3.0 Å, 2.6 Å and 2.5 Å from water, respectively. Resveratrol also interacts with  $\text{H}_2\text{O}_{20}$  and with Asn153, both at 3.1 Å and with Thr 123 (OG1) ( $-x, y, -z$ ) at 3.2 Å (Fig. 1d). The hydrophobic interactions between resveratrol and ConM amino acids are with Leu107 (CA/CD2) and Asn131 (CB) (Fig. 1e) Table 2. The superposition of native ConM structure (2CWM) with ConM structure bound to resveratrol did not show any significant changes in the overall structure neither in the position of amino acids side chains.

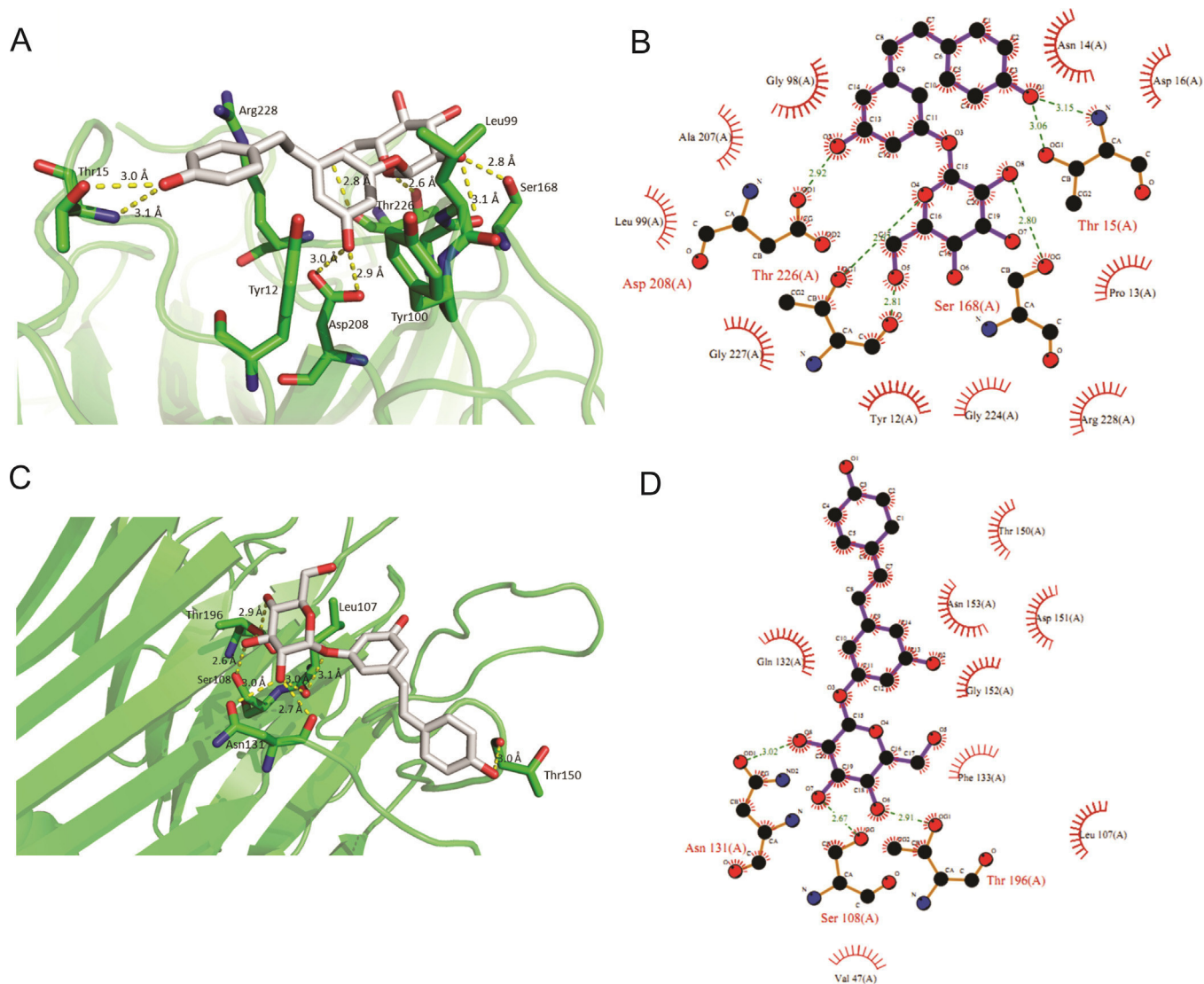
**Table 2**

Hydrophobic contacts between the lectin from *C. maritima* seeds and resveratrol.

Amino acids	Resveratrol	Distance (Å)
Leu107 CB	C1	4.6
Leu107 CG	C1	4.5
Leu107 CD2	C1	3.6
Leu107 CB	C2	4.2
Leu107 CG	C2	3.8
Leu107 CD2	C2	3.0
Leu107 CB	C3	4.1
Leu107 CG	C3	3.8
Leu107 CD2	C3	3.6
Leu107 CA	C3	4.9
Leu107 C	C4	4.9
Leu107 CB	C4	4.4
Leu107 CG	C4	4.6
Leu107 CD2	C4	4.6
Leu107 CB	C5	4.8
Leu107 CB	C6	4.9
Leu107 CD2	C6	4.6
Asn131 CA	C7	4.9
Asn131 C	C7	4.6
Asn131 CB	C7	4.4
Asn131 CG	C7	4.9
Asn131 CB	C8	4.8
Asn131 CG	C8	4.9
Asn131 CB	C9	4.4
Asn131 CG	C9	4.4
Asn131 CB	C10	3.8
Asn131 CG	C10	4.1
Asn131 CB	C11	4.1
Asn131 CG	C11	4.3
Asn131 CB	C12	4.9
Asn131 CG	C12	4.7
Asn131 CG	C13	4.9
Asn131 CG	C14	4.8

### 3.3. Molecular docking of glycosylated resveratrol with ConM

The molecular docking in the present study revealed that the interaction between ConM and the glycosylated form of

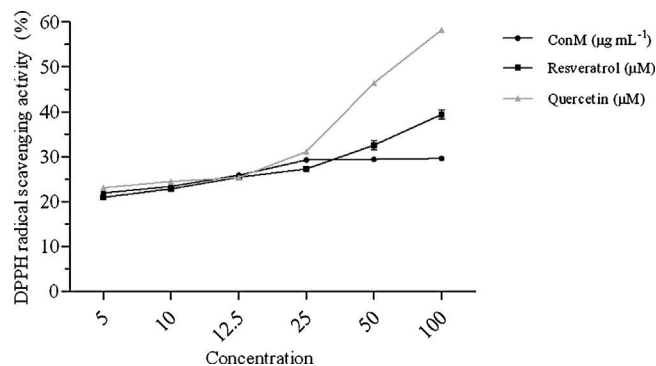


**Fig. 2.** Molecular docking of glycosylated form of resveratrol in carbohydrate binding site and rigid  $\beta$ -sheet site. Resveratrol (3,5,4' trihydroxy-trans-stilbene) polar (A and C) and hydrophobic (B and D) interactions in carbohydrate binding site and in  $\beta$ -sheet site, respectively.

resveratrol is energetically consistent with both the carbohydrate binding site (Moldock Score =  $-118.785$ ) (Fig. 2a) and the  $\beta$ -sheet interface (Moldock Score =  $-103.444$ ) (Fig. 2b). This is an indicative that the binding can be directed to CBS by the carbohydrate recognition or can occurs in the same way that presented for the non glycosylated form.

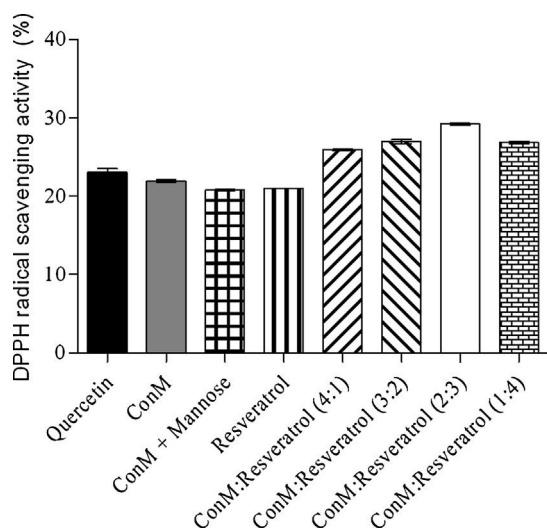
### 3.4. Effect of free-radical scavenging

The ConM (5–100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) inhibited DPPH oxidation, showing a dose-dependent activity until 25  $\text{mg}/\text{mL}$ , after this concentration the activity remained constant (Fig. 3). Resveratrol (5–100  $\mu\text{M}$ ) and Quercetin (5–100  $\mu\text{M}$  – positive control) showed dose-dependent inhibition of DPPH oxidation (Fig. 3) The ConM (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) complexed with resveratrol (5  $\mu\text{M}$ ) in different ratios 4:1, 3:2, 2:3 and 1:4 (ConM:Resveratrol) showed synergic activity, inhibiting the oxidation of DPPH. The most effective ratio was 2:3, as can be seen in Fig. 4. In order to assess the involvement of the CBS of ConM with antioxidant activity, the CBS was previously blocked with mannose. However, significant difference was not observed in the inhibition of DPPH oxidation by ConM complexed with mannose (Fig. 4), indicating that the CBS is not directly



**Fig. 3.** Free radical scavenging activity of quercetin, CoM and resveratrol by DPPH assay. Radical scavenging activity was measured at six different concentrations of ConM (5, 10, 12.5, 25, 50 and 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), quercetin and resveratrol (5, 10, 12.5, 25, 50 and 100  $\mu\text{M}$ ). The results are expressed as mean  $\pm$  SD of three replicates ( $p < 0.05$ ).

related to antioxidant activity. These results corroborate with crystallographic studies, indicating that the interaction of ConM with resveratrol may enhance the antioxidant activity of both molecules.



**Fig. 4.** Evaluation of the carbohydrate binding site of ConM and synergistic effect between resveratrol and ConM by DPPH assay. The assay was performed in the following concentrations: ConM (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), resveratrol (5  $\mu\text{M}$ ) and quercetin (5  $\mu\text{M}$ ); and the ratios are represented also in  $\mu\text{M}$ . The lectin was preincubated with 0.1 M mannose. The results are expressed as mean  $\pm$  SD of three replicates ( $p < 0.05$ ).

#### 4. Discussion

Some previous studies have reported that other molecules interact with plant lectins in regions similar to those where resveratrol interacts with ConM. Delatorre and co-workers [38] described a physiologically important plant defense-related non-protein amino acid that also interacts between the canonical dimers. Adenine [39] and plant hormones [40] have also had their structural binding described and deposited in the Protein Data Bank.

The antioxidant activity of flavonoids such as resveratrol was previously characterized as efficient scavengers of free radicals [41]. The ConM complexed with resveratrol act synergistically to increase the antioxidant activity. In plants, this interaction may promote a reduction of the reactive oxygen species (ROS) levels, that are produced by the partial reduction of oxygen [42]. Plants environment are composed of biotic or abiotic stress which usually increased ROS levels [17]. In plants, the antioxidant defenses could be either non-enzymatic (e.g. glutathione, proline,  $\alpha$ -tocopherols, carotenoids and flavonoids) or enzymatic (e.g. superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX) and glutathione reductase (GR) [19]. Some studies also demonstrate the ability of resveratrol to reduce levels of ( $\cdot\text{OH}$ ) and ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), as well as radicals produced by the enzymatic reaction with Cr(VI) and inhibition of DNA damage due to ( $\cdot\text{OH}$ ) radicals produced by the Fenton reaction [15]. Other studies have shown that the antioxidant effect of resveratrol protects dopaminergic neurons against high glucose-induced oxidative stress by diminishing cellular levels of superoxide anion [43].

In addition, to reducing ROS levels in the cell, resveratrol induces also accumulation of pathogenesis-related protein (PR-proteins) transcripts [44]. Among the 14 families of PR-proteins already described, the PR-4 attracts attention because they are composed of chitinases, some of these chitinases exhibit hevein domains, that recognize and bind to GlcNAc residues [45] indicating that the relationship between lectin and resveratrol might be involved in the defense response against pathogens. Therefore, the interaction between ConM and resveratrol may be an alternative mechanism to reduce oxidative stress, reducing possible cellular damage.

The interaction between ConM and resveratrol also gives evidence that these two molecules can act synergistically to reduce the inflammatory process through inhibition of many

pro-inflammatory events. ConA-like lectins have been described as anti-inflammatory proteins when systemically administrated in mice [24,46]. The anti-inflammatory activity of lectins is explained by the competition between lectins and adhesion molecules, e.g., selectins, which are responsible for adhesion and rolling of cells recruited for cell migration after inflammatory stimulus [47].

The anti-inflammatory activity of resveratrol is more directly related to the suppression of cell adhesion as a result of downregulating E-selectin expression [22]. Resveratrol also downregulates some proinflammatory factors, including NO, PGE2, iNOS and COX, as well as proinflammatory mediators, such as TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ . Many plant lectins are commonly known to reduce NO production after local injection [47] and also activate eNOS, causing a vasorelaxant effect in intact endothelized aorta after systemic injection. ConM cannot reduce NO production in peritoneal fluid, but it is very effective in stimulating vasorelaxant events mediated through NOS activity and this activity is reportedly related to the carbohydrate binding activity of lectins [25].

The synergism that arises between ConA-like lectins and resveratrol can be explained also through the interaction of ConM and the glycosylated form of resveratrol. Specifically, the main form of resveratrol found in nature is glycosylated, and while the glycan is responsible for a more stable and soluble form, it is also responsible for the internalization of resveratrol through a mechanism that uses glucose carriers [6]. The glycosylated form has two binding sites based on molecular docking, but the active form probably binds only to the  $\beta$ -strand interface because the main interactions that drive this binding are hydrophobic and van der Waals interactions. The existence of two binding sites to inactive form of resveratrol in ConM is, therefore, a potential secondary source of interaction that could elicit the biological properties of resveratrol with lectins acting as a delivery system to cells commonly recognized by ConM in which the inflammatory response is suppressed by this protein.

The complex of ConM with resveratrol is probably responsible for the synergism observed which revealed a significant antioxidant effect. This activity also seems to be unrelated with CBS. The structural evidence of binding also shown to glycosylated form of resveratrol indicate many other activities of ConM and resveratrol that could be elicited by the complex of them. Thus, we postulated that the interaction between ConM and resveratrol is a potential dual-elicitor of antioxidant by scavenging free radicals and anti-inflammatory response by downregulating E-selectin expression made by resveratrol and the competition with selectins and vasorelaxation made by lectins; both interfere in process of cell adhesion regulating leukocyte adhesion, rolling and transmigration.

#### Acknowledgments

This study was partly funded by the Universidade Regional do Cariri (URCA) (007.03/2013) Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (573925/2008-9) and Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). We would also like to thank the Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLS), Campinas, Brazil. BAMR, KSN, VNF, CG, CSN, AHS, BSC and PD are senior investigators of CNPq.

#### References

- [1] S. Renaud, M. de Lorgeril, *Lancet* 339 (1992) 1523–1526.
- [2] C. Parage, R. Tavares, S. Réty, R. Baltenweck-Guyot, A. Poutaraud, L. Renault, D. Heintz, R. Lugan, G. Marais, S. Aubourg, P. Huguency, *Plant Physiol.* 160 (2012) 1407–1419.
- [3] J. Baur, D.A. Sinclair, *Nature Rev. Drug Dis.* 5 (2006) 493–506.
- [4] E.N. Frankel, A.L. Waterhouse, J.E. Kinsella, *Lancet* 24 (1993) 1103–1104.
- [5] A. Dorozynski, *BMJ* 314 (1997) 993.
- [6] A.I. Romero-Perez, M. Ibern-Gomez, R.M. Lamuela-Raventos, M.C. La Torre-Boronat, *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 1533–1536.



- [7] G. Regev-Shoshani, O. Shoseyov, I. Bilkis, Z. Kerem, *Biochem. J.* 374 (2003) 157–163.
- [8] D. Albani, L. Polito, A. Signorini, G. Forloni, *Biofactors* 36 (2010) 370–376.
- [9] G. Ravagnan, A. De Filippis, M. Carteni, S. De Maria, V. Cozza, M. Petrazzuolo, M.A. Tufano, G. Donnarumma, *Inflammation* 36 (2013) 26–34.
- [10] G.J. Soleas, E.P. Diamandis, D.M. Goldberg, *J. Clin. Lab. Anal.* 11 (1997) 287–313.
- [11] A.A.E. Bertelli, L. Giovannini, D. Giannessi, M. Migliori, W. Bernini, M. Fregoni, A. Bertelli, *Int. J. Tissue React.* 17 (1995) 1–3.
- [12] C.R. Pace-Asciak, S. Hahn, E.P. Diamandis, G. Soleas, D.M. Goldberg, *Clin. Chim. Acta* 235 (1995) 207–219.
- [13] T.Z. Hsieh, G. Juan, Z. Darzynkiewicz, J.M. Wu, *Cancer Res.* 59 (1999) 2596–2601.
- [14] C.R. Pace-Asciak, O. Rounova, S.E. Hahn, E.P. Diamandis, D.M. Goldberg, *Clin. Chim. Acta* 246 (1996) 163–182.
- [15] S.S. Leonard, C. Xia, B. Jiang, B. Stinefelt, H. Klandorf, G.K. Harris, X. Shi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 309 (2003) 1017–1026.
- [16] J.A. O'Brien, A. Daudi, V.S. Butt, G.P. Bolwell, *Planta* 236 (2012) 765–779.
- [17] J. Bailey-Serres, R. Mittler, *Plant Physiol.* 141 (2006) 311.
- [18] P. Sharma, A.B. Jha, R.S. Dubey, M. Pessarakli, *J. Bot.* 2012 (2012) 1–26.
- [19] S.S. Gill, N. Tuteja, *Plant Physiol. Biochem.* 48 (2010) 909–930.
- [20] R. Ross, *Annu. Rev. Physiol.* 57 (1995) 791–804.
- [21] M.C. Chia, *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 35 (1998) 573–602.
- [22] U.R. Pendurthi, L.V. Mohan-Rao, *Thromb. Res.* 106 (2002) 243–248.
- [23] M.E. Ferrero, A.A.E. Bertelli, A. Fulgenzi, F. Pellegatta, M.M. Corsi, M. Bonfrate, F. Ferrara, R. De Caterina, L. Giovannini, A. Bertelli, *Am. J. Clin. Nutr.* 68 (1998) 1208–1214.
- [24] B.A.M. Rocha, P. Delatorre, T.M. Oliveira, R.G. Benevides, A.F. Pires, A.S. Sousa, L.A.G. Souza, A.M.S. Assreuy, H. Debray, W.F. De Azevedo, A.H. Sampaio, B.S. Cavada, *Biochimie* 93 (2011) 806–816.
- [25] C.A.A. Gadelha, F.B.M.B. Moreno, T. Santi-Gadelha, J.B. Cajazeiras, B.A.M. Rocha, A.M.S. Assreuy, M.R.L. Mota, N.V. Pinto, A.V.P. Meireles, J.C. Borges, B.T. Freitas, F. Canduri, E.P. Souza, P. Delatorre, D.N. Criddle, W.F. Azevedo, B.S. Cavada, *J. Struct. Bio.* 152 (2005) 185–194.
- [26] P. Delatorre, B.A.M. Rocha, C.A.A. Gadelha, T. Santi-Gadelha, J.B. Cajazeiras, E.P. Souza, K.S. Nascimento, V.N. Freire, A.H. Sampaio, W.F. Azevedo, B.S. Cavada, *J. Struct. Biol.* 154 (2006) 280–286.
- [27] M.V. Ramos, R.A. Moreira, B.S. Cavada, J.T.A. Oliveira, P. Rouge, R. Bras. *Fisiol.* 8 (1996) 193–199.
- [28] Collaborative Computational Project, Number 4, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 50 (1994) 760–763.
- [29] A. Vargin, A. Teplyakov, *J. Appl. Crystallogr.* 30 (1997) 1022–1025.
- [30] P. Emsley, K. Cowtan, *Acta Crystallogr. D* 60 (2004) 2126–2132.
- [31] R.A. Laskowski, M.W. MacArthur, D.S. Moss, J.M. Thornton, *J. Appl. Cryst.* 26 (1993) 283–291.
- [32] W.L. Delano, DeLano Scientific, San Carlos, CA, 2002.
- [33] T.N. Bhat, *J. Appl. Cryst.* 21 (1988) 279–281.
- [34] R. Thomsen, M.H. Christensen, *J. Med. Chem.* 49 (2006) 3315–3321.
- [35] M.S. Blois, *Nature* 181 (1958) 1199–1200.
- [36] K.V. Brinda, N. Mitra, A. Surolia, S. Vishveshwara, *Protein Sci.* 13 (2004) 1735–1749.
- [37] V. Sharma, A. Surolia, *J. Mol. Biol.* 267 (1997) 433–445.
- [38] P. Delatorre, B.A.M. Rocha, E.P. Souza, T.M. Oliveira, G.A. Bezerra, F.B.M.B. Moreno, B.T. Freitas, T. Santi-Gadelha, A.H. Sampaio, W.F. Azevedo Jr., B.S. Cavada, *BMC Struct. Biol.* 7 (2007) 52–60.
- [39] T.W. Hamelryck, R. Loris, J. Bouckaert, M. Dao-Thi, G. Strecker, A. Imberty, E. Fernandez, L. Wyns, M.E. Etzler, *J. Mol. Biol.* 286 (1999) 1161–1177.
- [40] A. Meyer, W. Rypniewski, L. Celewicz, V.A. Erdmann, W. Voelter, T.P. Singh, N. Genov, J. Barciszewski, C.H. Betzel, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 364 (2007) 195–200.
- [41] P.G. Pietta, *J. Nat. Prod.* 63 (2000) 1035–1042.
- [42] P.D. Ray, B. Huang, Y. Tsuji, *Cell Signal.* 24 (2012) 981–990.
- [43] J. Renaud, J. Bournival, X. Zottig, M.G. Martinoli, *Neurotox. Res.* 25 (2014) 110–123.
- [44] X. Chang, E. Heene, F. Qiao, P. Nick, *PLoS ONE* 6 (2011) 26405.
- [45] L. Bertini, S. Proietti, M.P. Aleandri, F. Mondello, S. Sandini, C. Caporale, C. Caruso, *Biol. Chem.* 393 (2012) 1533–1546.
- [46] N.M. Alencar, E.H. Teixeira, A.M.S. Assreuy, B.S. Cavada, C.A. Flores, R.A. Ribeiro, *Mediat. Inflamm.* 8 (1999) 107–113.
- [47] N.M. Alencar, F.C. Cavalcante, M.P. Vasconcelos, K.B. Leite, K.S. Aragão, A.M.S. Assreuy, N.A.P. Nogueira, B.S. Cavada, M.R. Vale, *J. Pharm. Pharmacol.* 57 (2005) 919–922.