



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE AGRONOMIA**

FRANCISCO WILLIAM VIANA MARTINS

**Caracterização físico-química parcial de uma lectina isolada de
sementes de *Machaerium acutifolium* Vogel**

FORTALEZA

2017

FRANCISCO WILLIAM VIANA MARTINS

Caracterização físico-química parcial de uma lectina isolada de sementes de *Machaerium acutifolium* Vogel

Monografia submetida à Coordenação do Curso de Graduação em Agronomia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do grau de Engenheiro Agrônomo.

Orientador: Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada

Coorientador: Profa. Dra. Kyria Santiago do Nascimento.

FORTALEZA

2017

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

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

M343c Martins, Francisco William Viana.

Caracterização físico-química parcial de uma lectina isolada de sementes de *Machaerium acutifolium* Vogel / Francisco William Viana Martins. – 2017.

66 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, ,
Fortaleza, 2017.

Orientação: Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada.

Coorientação: Profa. Dra. Kyria Santiago do Nascimento.

1. Lectinas. 2. Carboidratos. 3. Proteínas. I. Título.

CDD

FRANCISCO WILLIAM VIANA MARTINS

Caracterização físico-química parcial de uma lectina isolada de sementes de *Machaerium acutifolium* Vogel

Monografia submetida à Coordenação do Curso de Graduação em Agronomia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do grau de Engenheiro Agrônomo.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Kyria Santiago do Nascimento (Coorientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

M.^a . Mayara Queiroz de Santiago
Universidade Federal do Ceará (UFC)

M.^a . Cláudia Figueiredo Lóssio
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A minha mãe e ao meu pai, que mesmo na dificuldade não mediram esforços para que eu pudesse realizar meus sonhos, me apoiando e ajudando em todas as etapas da minha vida,
Dedico este trabalho

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me concedido a calma necessária para enfrentar as dificuldades da vida, por cada vitória durante esses cinco anos de curso.

Ao Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada, especialmente pela orientação, pelos ensinamentos, conselhos profissionais, amizade e oportunidade que me proporcionaram trilhar novos horizontes e caminhos. Obrigado por me acolher e acreditar em mim!

A Professora Dra. Kyria Santiago do Nascimento, pela co-orientação na realização deste trabalho e pelos valiosos conhecimentos transmitidos ao longo da minha graduação.

A grande Me. Mayara Queiroz de Santiago de forma especial, por toda sua orientação, amizade e principalmente paciência que abriram a minha mente e me ajudou a ser uma pessoa melhor. Obrigado por tudo.

A Me. Cláudia Figueirêdo Lóssio, por ter aceitado participar da banca avaliadora desse trabalho e pela valiosa ajuda.

Aos grandes amigos do BioMol-Lab pelo companheirismo sempre. Em especial aos ICs Hadson, Morgana, Marliane, David, Ariany e Larissa que acima de tudo são guerreiros por se dedicarem dia após dia ao trabalho. Agradeço à todos que contribuíram durante esta minha caminhada.

Aos meus grandes amigos da turma de Agronomia 2012.2, Iana, Bia, Luiza, Daniel, Vitor, André, Jean, Tiago, e todos os que resistiram à essa caminhada difícil, agradeço em especial pela amizade, apoio, solidariedade, palavras de conselho e o incentivo em nossa caminhada diária pela Universidade.

A minha grande amiga Patrícia que mesmo não tendo seguido o mesmo caminho profissional que eu, continuou fazendo parte da minha vida. Agradeço por cada risada e conselho.

Meu agradecimento sincero a todos os meus professores do curso de Agronomia e departamentos próximos, em que obtive oportunidade de passar momentos valorosos, científicos de humildade, responsabilidade de vida, engrandecendo meu saber a uma nova visão de mundo.

Em especial agradeço à minha família, minha mãe Marta, meu pai José, minha irmã Vanessa e meu afilhado Adrian. Obrigado pai por não ter hesitado em me proporcionar a melhor educação do mundo. Obrigado mãe por ter sido e por ser a melhor mãe do mundo, me educando da melhor forma possível. Obrigado minha irmã por ter sido acima de tudo uma professora para mim, tenho muito orgulho de ter sido seu primeiro aluno. Amo muito vocês.

“Seu foco determina sua realidade”

“A Força é forte em minha família. Meu pai a tem, eu a tenho e minha irmã a tem.

Sim. É você, Leia”

“Que a Força esteja com você”

Star wars

RESUMO

As sementes de *Machaerium acutifolium* Vogel, uma espécie pertencente à família Leguminosae, subfamília Papilionoideae, tribo Dalbergieae, possuem uma lectina manose/N-acetil-D-glicosamina específica, que aglutina eritrócitos de coelho e humano, nativos ou tratados com enzimas proteolíticas. A lectina de sementes de *M. acutifolium* foi purificada por precipitação por sulfato de amônio, seguida por uma cromatografia de afinidade em matriz de quitina. Esse procedimento resultou na lectina purificada, nomeada de MAL. O processo de purificação da MAL foi monitorado por SDS-PAGE e atividade hemaglutinante específica. A lectina purificada é caracterizada por um perfil eletroforético composto por quatro bandas, sendo a banda maior com massa molecular aparente de 30 KDa e as bandas menores com 18, 15 e 12 KDa respectivamente, tanto na presença quanto na ausência de um agente redutor. MAL é uma glicoproteína e demonstra elevada estabilidade em ampla faixa de temperatura e pH, sendo capaz de manter sua atividade hemaglutinante após a exposição a temperaturas de até 70 °C por 1 hora e na faixa de pH de 6,0 a 9,0. MAL não apresentou atividade tóxica contra nauplios de *Artemia* sp.

Palavras-chave: Lectina, Atividade hemaglutinante, *Machaerium acutifolium*.

ABSTRACT

The seeds of *Machaerium acutifolium* Vogel, a species belonging to the family Leguminosae, subfamily Papilionoideae, Dalbergieae tribe, has a mannose/N-acetyl-D-glucosamine specific lectin that agglutinates rabbit and human erythrocytes native or enzymatically treated with proteolytic enzymes. The lectin from *M. acutifolium* seeds was purified by precipitation using ammonium sulfate followed by chitin matrix affinity chromatography. This procedure resulted in the purified lectin, named MAL. The purification process of MAL was monitored by SDS-PAGE and hemagglutinating activity. It was observed that is characterized by an electrophoretic profile composed of four bands, one larger band with apparent molecular weight of 30 KDa and three smaller bands of 18, 15 and 12 KDa respectively, both in the presence and absence of a reducing agent. MAL is a glycoprotein with high stability, being able to maintain its hemagglutinating activity after exposure to temperatures up to 70 ° C for 1 hour and in the pH range of 6.0 to 9.0. MAL didn't present toxicity against *Artemia sp* nauplii.

Key words: Lectin, Hemagglutinating activity, *Machaerium acutifolium*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Classificação estrutural de lectinas de plantas em Merolectinas, Hololectinas, Quimerolectinas e Superlectinas.

Figura 2: Classificação das lectinas vegetais.

Figura 3: Relação filogenética proposta para as tribos da subfamília Papilionoideae.

Figura 4: *Machaerium acutifolium* Vogel

Figura 5. Representação esquemática do fruto e semente de *M. acutifolium*. (a) Fruto maduro (b) Semente nua.

Figura 6: Perfil eletroforético em SDS-PAGE

Figura 7: Comparativo do perfil eletroforético entre a lectina MAL contras lectinas da tribo Dalbergieae.

Figura 8: Comparação do efeito da variação de temperatura sobre a atividade hemaglutinante de lectinas da tribo Dalbergieae.

Figura 9: Comparação do efeito da variação de pH sobre a atividade hemaglutinante de lectinas da tribo Dalbergieae

Figura 10: Comparação do efeito do EDTA sobre a atividade hemaglutinante de lectinas da tribo Dalbergieae.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Lectinas da tribo Dalbergieae.

Tabela 2: Atividade hemaglutinante do extrato total das sementes de *M. acutifolium*.

Tabela 3: Inibição da atividade hemaglutinante no extrato total de *M. acutifolium*.

Tabela 4: Processo de purificação da lectina de *Machaerium acutifolium*.

LISTA DE GRÁFICO

Gráfico 1: Atividade hemaglutinante do extrato total das sementes de *M. acutifolium* testado contra diferentes tipos sanguíneos.

Gráfico 2: Perfil cromatográfico da purificação de MAL em matriz de afinidade em quitina.

Gráfico 3: Estabilidade térmica da lectina de *Machaerium acutifolium*

Gráfico 4: Análise do efeito do EDTA na atividade hemaglutinante da lectina de *Macherium acutifolium*

Gráfico 5: Estabilidade da lectina de *Machaerium acutifolium* em uma ampla faixa de pH

Gráfico 6: Avaliação da toxicidade da MAL contra náuplios de *Artemia sp.*

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ACA: aglutinina de *Amaranthus caudatus*
A.H.E.: atividade hemaglutinante específica
ASL: lectina de *Andira surinamensis*
BSA: albumina sérica bovina
CMI: Concentração Mínima Inibitória
ConA: lectina de *Canavalia ensiformis*
CRD: Domínio de Reconhecimento a Carboidratos
Da: Dalton
DEAE: dietilaminoetano
DNA: ácido desoxirribonucleico
EDTA: Ácido Etilenodiaminotetracético
Fru: frutose
GlcNAc: N-acetilglicosamina
Glu: glicose
GNA: aglutinina de *Galanthus nivalis*
kDa: Quilodalton
Man: manose
MBL: lectina humana ligante a manose
N-terminal: amino terminal
PAL: lectina de *Pterocarpus angolensis*
PAL: lectina de *Pisum arvensis*
PELa: lectina de *Platypodium elegans*
pH: potencial hidrogeniônico
PPL-2: lectina de *Parkia platycephala 2*
RE: retículo endoplasmático
RIP: proteínas inativadoras de ribossomos
RPM: rotações por minuto
SDS: dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliácridamida em presença de dodecil sulfato de sódio
TxLCI: lectina do bulbo de tulipa
TEMED: N-N-N'-N'-tetrametilenodiamina

U.H./mL: Unidade Hemaglutinate

VML: lectina de *Vatairea macrocarpa*

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	13
1.1 Aspectos Gerais de Lectinas	14
1.2. Glicobiologia	15
1.3. Breve histórico	15
1.4. Definições	17
1.5. Classificação	18
1.6. Lectinas de Leguminosas	21
1.7. <i>Machaerium acutifolium</i> Vogel	26
2.1 Objetivo Geral	29
3 - MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1 Procedência do material	31
3.2. Obtenção da farinha	31
3.3 Extração total de proteínas solúveis da farinha de sementes de <i>Machaerium acutifolium</i>	31
3.4. Fracionamento com sulfato de amônio do extrato total de <i>M. acutifolium</i>	32
3.5. Dosagem de Proteínas Solúveis	32
3.6. Atividade hemaglutinante	32
3.7. Cálculo da atividade hemaglutinante específica	33
3.8. Inibição da atividade hemaglutinante (A.H), por açúcares simples, glicoproteínas e açúcares sulfatados	33
3.9. Cromatografia de afinidade em matriz de quitina	34
3.10 Eletroforese em SDS-PAGE	34
3.11 Efeito de temperatura sobre a atividade hemaglutinante	35
3.12 Efeito do pH sobre a atividade da lectina	35
3.13 Efeito de agente quelante sobre a atividade hemaglutinante	36
3.14 Dosagem de carboidratos totais	36
3.15 Teste de letalidade de <i>Artemia</i> sp	36
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1. Purificação da Lectina de Sementes de <i>Machaerium acutifolium</i>	39
4.2. Caracterização físico-química da lectina de sementes de <i>M. acutifolium</i>	

.....	42
4.4. Ensaio de toxicidade de MAL contra <i>Artemia</i> sp.	49
5 – CONCLUSÃO.....	50
REFERÊNCIAS.....	52

1- INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Gerais de Lectinas

As lectinas são proteínas que vem despertando grande interesse por suas atividades biológicas e aplicações em diversas áreas da ciência. Essas aplicações são bem amplas indo da medicina à agricultura, sendo muitas destas proteínas usadas como ferramentas básicas de biotecnologia (BENEVIDES, 2008). As lectinas são amplamente distribuídas na natureza, estando presente desde organismos simples como vírus, bactérias e fungos até organismos complexos como plantas e animais, no entanto, apesar dessa vasta distribuição, as lectinas de plantas são as mais pesquisadas. Por definição, as lectinas são proteínas de origem não imunológica que possuem a capacidade de se ligar à carboidratos e glicoproteínas de forma específica e reversível (PEUMANS; VAN DAMME, 1995). Devido a essa propriedade primordial as lectinas apresentam a capacidade de decifrar o glicocódigo e assim apresentar uma ampla gama de atividades biológicas tais como: Atividade antitumoral (LEI; CHANG 2009), bloqueador de infecção por HIV e inibidor de replicação viral (SWANSON *et al.*, 2010), atividade antiinflamatória (ASSREUY *et al.*, 1997), antimicrobiana (JACK; TURNER, 2003) e inseticida (MACEDO *et al.*, 2007).

A interação de lectinas com carboidratos pode ser tão específica quanto a interação antígeno/anticorpo e enzima/substrato. Essas proteínas não se ligam a apenas a oligossacarídeos nas células, mas também a glicanos livres, incluindo monossacarídeos (GHAZARIAN; IDONI; OPPENHEIMER, 2011).

A habilidade das lectinas de se ligarem a carboidratos se restringe a um pequeno número de aminoácidos na estrutura da proteína que compõem uma região denominada domínio de reconhecimento a carboidratos (CRD) (SHARON; LIS, 2004). Essa ligação tem um papel importante na interação das plantas com outros microrganismos (PEUMANS; VAN DAMME, 1995). É constatado que as lectinas de plantas estão presentes não só nas sementes, mas, também, em tecidos diversos tais como folhas, caule, frutos e raízes (PEUMANS; VAN DAMME, 1995). Suscitando sua participação como elemento de defesa contra patógenos (ROOPASHREE *et al.*, 2006) e atuando, também, na formação do nódulo na associação entre leguminosas e bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico (HOFF *et al.*, 2009).

1.2. Glicobiologia

Durante muito tempo os carboidratos foram tratados como macromoléculas relacionadas a processos de geração de energia, na forma de monossacarídeos ou oligossacarídeos, ou, ainda, atuando de forma estrutural, como a celulose na parede celular de plantas e fungos e a quitina nos exoesqueletos de insetos. A diversidade dos carboidratos em sistemas vivos é resultado direto de algumas de suas características: as características estruturais dessa molécula, a habilidade de diferentes tipos de resíduos de açúcar formar ligações glicosídicas com outros, o tipo de conformação anomérica de ligação, a ausência, presença ou posição da ramificação (GORELIK *et al.*, 2001).

Os carboidratos encontrados na superfície das células contribuem com grande parte das interações entre as células e o ambiente. Por constituírem uma camada que recobre as células, o glicocálice, os carboidratos são as primeiras moléculas a serem encontradas e reconhecidas por outras células, anticorpos e microrganismos invasores, como vírus e bactérias, podendo agir também receptores para toxinas e hormônios. Devido ao conhecido papel da glicosilação na comunicação celular, padrões de glicosilação anormais são conhecidos como marcadores, ou em alguns casos até mesmo a causa, de certas doenças como, por exemplo, o câncer (DENNIS *et al.*, 1999).

Uma função importante dos carboidratos é o fato de serem intermediários na comunicação celular em vários sistemas biológicos e podem influenciar fenômenos de diferenciação, proliferação e interação entre células em condições fisiológicas e patológicas. As informações contidas na estrutura dos oligossacarídeos conjugados a proteínas ou lipídios na superfície das células são reconhecidas por um grupo especializado de proteínas, as lectinas (GABIUS, 2000).

1.3 Breve histórico

Em meados do século XIX, alguns fatos apontavam a existência de proteínas na natureza com a capacidade de aglutinar eritrócitos. Essas proteínas eram conhecidas como hemaglutininas ou fitohemaglutininas, por terem sido detectadas inicialmente em plantas (SHARON; LIS, 2004).

O primeiro relato de lectinas foi realizado por Stillmark (1888) no seu

estudo de doutorado na Universidade de Dorpat (atual Tartu, Estónia) na Rússia, quando trabalhava com extratos de sementes de *Ricinus communis*. Stillmark identificou nesses extratos uma proteína com capacidade de aglutinar eritrócitos com uma toxicidade muito forte. Embora, agora esteja claro que a ricina era uma complexa mistura moléculas tóxicas de ricina e aglutininas não tóxicas. Sua pesquisa foi de grande importância na biologia, pois foi a relacionar a toxicidade da mamona à ocorrência de um fator proteico hemaglutinante. Sua descoberta também se tornou um marco na bioquímica vegetal porque a ricina foi a primeira proteína de planta cuja atividade biológica pôde ser determinada (VAN DAMME *et al.*, 1998; SHARON; LIS, 2004) .

Dez anos depois Esfstrand (1898) propôs o termo fitohemaglutinina, referindo-se a todas as proteínas tóxicas aglutinantes vegetais. Posteriormente, Hellin, também em Tartu, demonstrou a presença da hemaglutinina tóxica, a abrina, em extratos de feijão jequiriti (*Abrus precatorius*). A abrina se mostrou semelhante à ricina e esses estudos permitiram Paul Ehrlich, no Instituto Real de Terapia Experimental (Frankfurt), a empregá-las como modelos de antígenos para estudos imunológicos (SHARON; LIS, 2004).

A ideia de o caráter tóxico ser uma propriedade intrínseca em proteínas foi abandonada quando Landsteiner & Raubitschek (1908) abordaram pela primeira vez a presença de hemaglutininas não tóxicas em leguminosas como *Phaseolus vulgaris* (feijão), *Pisum sativum* (ervilha), *Lens culinaris* (lentilha), *Vicia sativa* (vícia). Após este estudo muitas outras hemaglutininas vegetais não tóxicas foram isoladas. Foi a partir de então que se evidenciou que as lectinas estão difundidas no reino vegetal e que a toxicidade atribuída às mesmas, é exceção, e não regra (VAN DAMME *et al.*, 1998).

Por volta de 1919 a primeira hemaglutinina foi isolada de sementes de feijão de porco (*Canavalia ensiformis*) por James B. Sumner na Universidade de Cornell (Estados Unidos), obtendo assim a primeira lectina purificada da história. No ano de 1936 Sumner e Howell demonstraram que a Concaivalina A aglutinava eritrócitos e leveduras e precipitava glicogênio de soluções. Eles também provaram que esta atividade podia ser inibida por sacarose, demonstrando pela primeira vez a especificidade por açúcar (SHARON; LIS, 2003, 2004).

A história das lectinas vegetais teve um marco como a descoberta realizada por Renkonen em 1948 e Boyd e Reguera em 1949 de que algumas

hemaglutininas exibem uma especificidade a um grupo particular de eritrócitos dentro do sistema ABO. Notou-se que algumas proteínas vegetais obtidas de sementes de plantas tinham a capacidade de reconhecer um grupo específico e aglutiná-lo, onde as hemácias do sistema ABO respondiam ao contato com essas hemaglutininas de maneira distinta, algumas aglutinando e outras não (VAN DAMME *et al.*, 1998). Esses estudos corroboram com as observações de Stillmark acerca da seletividade de aglutinação de eritrócitos de animais mediadas por lectinas (SHARON; LIS, 2004).

Outro grande acontecimento ocorrido em 1960 mudou a história das lectinas, quando Petter C. Nowell provou que a lectina de *Phaseolus vulgaris* (PHA) possui atividade mitogênica sobre linfócitos. Esses estudos tiveram um impacto revolucionário nos estudos de imunologia, pois até aquele momento acreditava-se que os linfócitos eram células incapazes de se diferenciar em outros tipos celulares ou de se dividir (SHARON; LIS, 2004).

1.4 Definições

De acordo com a primeira definição de lectinas, baseada na sua especificidade por açúcar e inibição da reação de aglutinação, lectinas seriam um grupo de proteínas ou glicoproteínas de origem não imune que se ligavam a carboidratos acarretando assim uma aglutinação celular e/ou a formação de um precipitado de glicoconjugados (GOLDSTEIN *et al.*, 1980). Entretanto essa nomenclatura é excludente a um grupo de lectinas, pois só contempla aquelas com domínios múltiplos de ligação a carboidratos.

No ano de 1993, Kocourek e Horejsi propuseram que a definição de lectinas levasse em consideração as lectinas tóxicas, com baixa atividade aglutinante e que possuíssem cadeia lectínica genuína, porém com a observação de que as lectinas poderiam ter pelo menos uma subunidade de função diferente, essa definição foi também considerada restrita (SHARON; LIS, 2004).

Em 1988, Borondes propôs uma definição de lectinas que afirmava que eram proteínas ligantes a carboidratos excluindo desta classe enzimas e anticorpos. Essa definição deixava de fora as Proteína Inativadoras de Ribossomos (RIPs) do tipo II e as quitinases classe I que possuem tanto um domínio de ligação a carboidratos quanto um domínio catalítico. Assim, a definição não poderia excluir

todas as enzimas.

Observando toda a evolução do conceito de lectinas, Peumans e Van Damme em 1995, propuseram uma definição mais completa a cerca de lectinas, como sendo proteínas de origem não imune que possuem pelo menos um domínio não catalítico ligante reversivelmente a um mono ou oligossacarídeo específico.

1.5 Classificação

As lectinas vegetais constituem um grupo heterogêneo de proteínas por serem diferentes entre si no que diz respeito às suas propriedades bioquímicas e físico-químicas, estrutura molecular, especificidade e atividades biológicas (VAN DAMME *et al.*, 1998), o que torna complexa a tarefa de tentar agrupa-las considerando todos os aspectos que as descrevem simultaneamente.

No intuito de classificar as lectinas vegetais Peumans e Van Damme (1995) as dividiram quatro grupos: Merolectinas, Hololectinas, Quimerolectinas e Superlectinas (Figura 1).

Merolectinas são proteínas que possuem apenas um único domínio de ligação a carboidratos e não possuem a capacidade de oligomerização, não sendo capaz de aglutinar células e nem precipitar glicoconjugados. A heveína, uma proteína isolada do latex da seringueira (*Hevea brasiliensis*), que se liga à quitina, é uma típica merolectina (VAN PARIJS *et al.*, 1991).

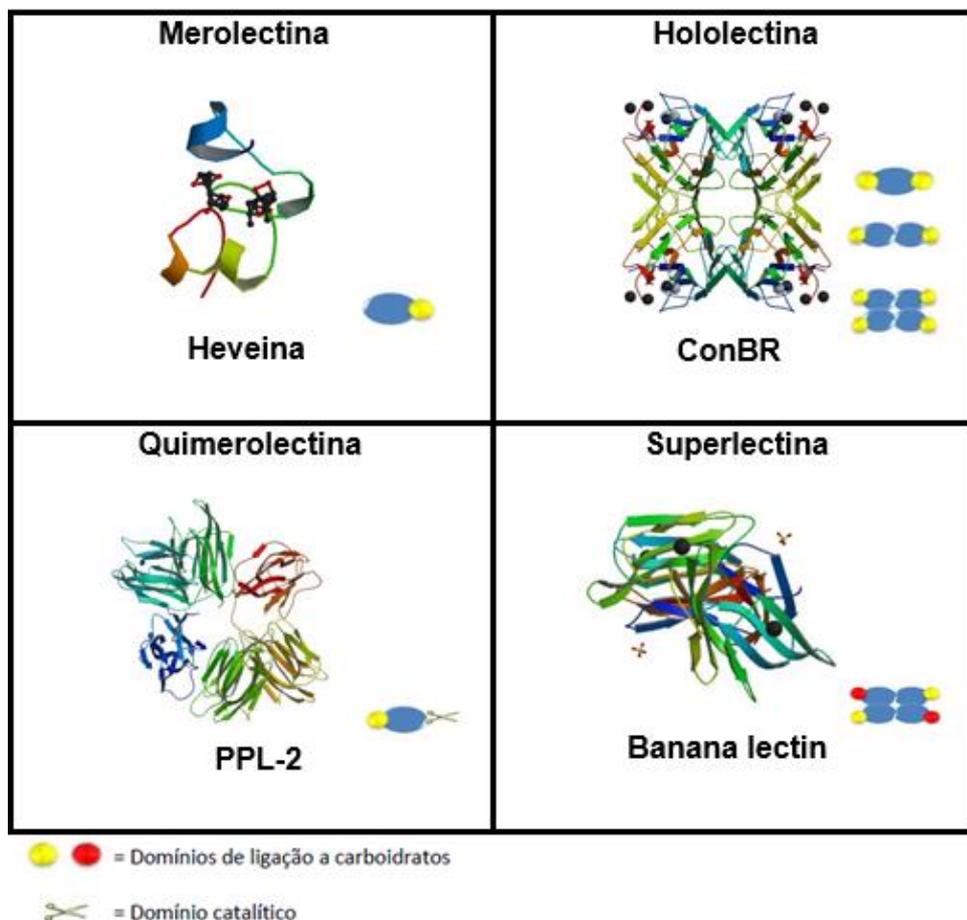
Hololectinas são proteínas com mais de um domínio de ligação a carboidratos estruturalmente semelhantes e assim são capazes de aglutinar células e precipitar glicoconjugados. São exemplos típicos de hololectinas aquelas isoladas de sementes de plantas pertencentes aos gêneros *Canavalia* e *Dioclea* (família Leguminosae, subfamília Papilionoideae, tribo Phaseoleae) (CAVADA *et al.*, 2001).

Quimerolectinas são proteínas que possuem um domínio não relacionado à atividade lectínica além de um ou mais domínios de ligação a carboidratos, com uma atividade catalítica bem definida, e que age independentemente dos domínios de carboidratos ligantes. São exemplos de quimerolectinas as proteínas conhecidas como RIPs (Proteínas inativadoras de ribossomos), como a ricina (toxina da mamona, *Ricinus communis*) e a abrina (toxina de *Abrus precatorius*), que possuem dois domínios de ligação para carboidratos comportando-se como uma hololectina e um domínio para a inativação do ribossomo (PEUMANS & VAN DAMME, 1998).

Outro exemplo é a lectina isolada de sementes de *Parkia platycephala*, conhecida como PPL-2, que possui além do sítio ligante a carboidrato, um sítio catalítico com atividade endoquitinásica (CAVADA et al., 2006).

Superlectinas são proteínas semelhantes às hololectinas, possuem mais de um domínio de ligação a carboidrato, porém esses domínios reconhecem açúcares estruturalmente e funcionalmente diferentes. Como exemplo, a lectina isolada do bulbo de tulipa (TxLCI) que é composta por dois domínios de ligação a carboidratos, que reconhecem manose e N-acetil-galactosamina, respectivamente (VAN DAMME et al., 1996).

Figura 1 : Classificação estrutural de lectinas de plantas em Merolectinas, Hololectinas, Quimerolectinas e Superlectinas.



Fonte: Elaborado pelo autor, adaptado de Peumans e Van Damme, 1999. Representação esquemática de merolectinas (Heveína; PDB: 1Q9B), Hololectina (ConBr; PDB: 3JU9), quimerolectina (PPL-2; PDB: 2GSJ) e superlectinas, estas últimas não possuem representantes com estrutura tridimensional elucidada.

De acordo com Van Damme e colaboradores (1998) as lectinas vegetais podem ainda ser classificadas em sete famílias (Figura 2). São elas: (A) Lectinas de

leguminosas; (B) Lectinas de monocotiledôneas ligantes a manose; (C) Lectinas ligantes a quitina; (D) RIPs tipo 2; (E) Lectinas relacionadas a jacalina; (F) Lectinas relacionadas a amarentina e (G) Lectinas de floema de Cucurbitaceae. Essa classificação toma como base as características estruturais e de afinidade a carboidratos apresentadas por essas proteínas.

As lectinas de leguminosas correspondem à família mais estudada até o momento, muitas delas já purificadas e caracterizadas. As proteínas desse grupo caracterizam-se por possuírem semelhanças quanto às características físico-químicas (DAMICO, 2002). São similares também no que diz respeito às estruturas primárias e terciárias sendo que, suas características estruturais quaternárias variam amplamente (LORIS *et al.*, 1998). Se enquadram nesse grupo a Concanavalina-A (ConA), extraída de sementes de *Canavalia ensiformes*, e as lectinas extraídas de outras plantas da subtribo Diocleinae (CAVADA *et al.*, 2001).

As lectinas ligantes à quitina são capazes de se ligar a resíduos de N-acetilglicosamina (principal unidade monomérica constituinte da quitina) e tem como característica principal o fato de possuir um domínio heveínico em suas moléculas (VAN DAMME *et al.*, 1998). São encontradas em cinco famílias não relacionadas taxonomicamente: Gramineae, Solanaceae, urticaceae, Papaveraceae, e Amaranthaceae. São também exemplos de lectinas que se ligam a quitina as quitinases classe I (COLLINGE *et al.*, 1993).

As proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs) do tipo 2 e lectinas relacionadas são conhecidas por serem potentes agentes citotóxicos. Elas possuem atividade catalítica e podem inativar os ribossomos eucarióticos pela clivagem de uma ligação N-glicosídica de um resíduo de adenina no RNA. A Ricina (*Ricinus communis*) e Abrina (*Abrus precatorius*) são exemplos clássicos de RIPs tipo 2 com potentes atividades biológicas (PEUMANS *et al.*, 2001).

O termo “lectinas de monocotiledôneas que se ligam à manose” Refere-se a um grupo de lectinas que possuem especificidade por manose, encontradas exclusivamente em plantas monocotiledôneas, como por exemplo, as famílias Amaryllidaceae, Alliaceae, Araceae, Liliaceae, Orchidaceae e Bromeliaceae (VAN DAMME *et al.*, 1998). Todas as lectinas ligantes a manose são constituídas de 1,2,3 ou 4 subunidades de 12 kDa e todas são manose específicas restritas, ou seja só apresentam especificidade a um único açúcar, nesse caso manose.

As lectinas isoladas do floema de Cucurbitaceae são proteínas compostas

de duas subunidades idênticas de 24 kDa que se ligam a resíduos de N-acetilglicosamina. Normalmente são glicosiladas e contém um domínio específico para quitina, sem apresentar o domínio heveínico (ZANETTI, 2017) característica de outras lectinas específicas para quitina. Todas as lectinas conhecidas dessa família apresentam uma alta similaridade entre si. No entanto, não possuem qualquer semelhança sequencial com lectinas de outras espécies botânicas, devido a isso as lectinas de floema de Cucurbitaceae são consideradas como a menor família de lectinas vegetal, confinadas a um único grupo taxonômico de proteínas relativamente pequeno (VAN DAMME *et al.*, 1998).

As lectinas semelhantes à jacalina são um grupo de proteínas que apresentam estrutura semelhante à jacalina, uma lectina galactose específica isolada de *Artocarpus integrifolia*, a jaca. Esse tipo de lectina é encontrada principalmente em espécies de Moreaceae e Convolvulaceae (VAN DAMME *et al.*, 1998).

A amarantina, uma lectina extraída de *Amaranthus caudatos*, não se assemelha a nenhuma outra lectina de planta, no que se refere à sequência de aminoácidos e estrutura. Devido a essa característica a Amarantina é como protótipo das lectinas da família *Amarantaceae*. Outras espécies de *Amaranthus* possuem lectinas muito semelhantes a Amarantina, como *A. espinosus*, *A. leucocarpus* e *A. cruentus* (VAN DAMME *et al.*, 1998).

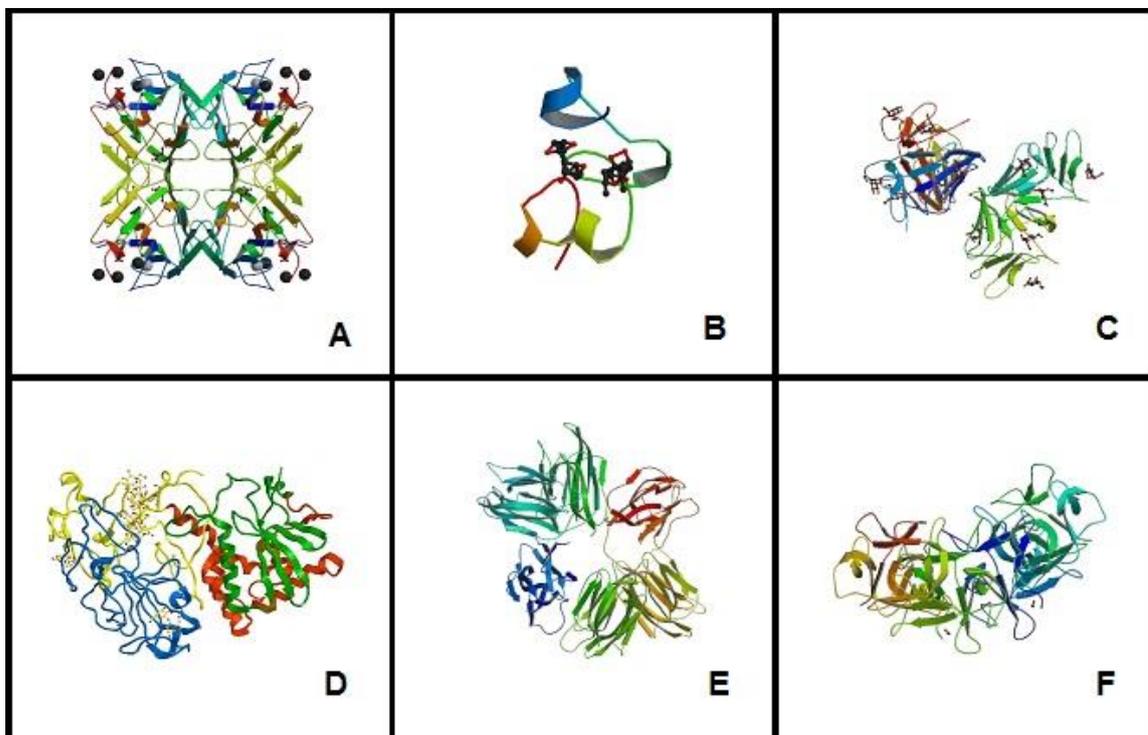
1.6 Lectinas de Leguminosas

Lectinas é um grupo de proteínas presentes em todas as formas de organismos, desde os mais simples como vírus e bactérias, até os mais complexos como animais e plantas superiores (MOREIRA *et al.*, 1991). Dentre as lectinas de plantas, as mais estudadas pertencem a família Leguminoseae (CAVADA *et al.*, 2001). Elas estão presentes em sementes, folhas, caules e raízes (SHARON & LIS, 1990; LORIS *et al.*, 1998).

Muitas lectinas desta família já foram isoladas e caracterizadas, principalmente lectinas de sementes, onde o percentual de proteínas solúveis pode variar de 1 a 10 % do total de proteínas, embora algumas espécies possam apresentar concentrações maiores que 50 %, ou menores que 0,1 % do total de proteínas solúveis presentes nas sementes (SHARON & LIS, 1990; VAN DAMME *et*

al., 1998).

Figura 2: Classificação das lectinas vegetais.



Fonte: PDB. (A) Lectinas de leguminosas, *Canavalia brasiliensis* (ConBr; PDB: 3JU9); (B) Lectinas ligantes a quitina composta por domínio heveínico, Heveína (PDB: 1Q9B); (C) Lectinas de monocotiledânea ligantes manose, *Galanthus nivalis* aglutinina (GNA; PDB: 1MSA); (D) RIP's do tipo II, Ricina; (PDB: 2AA1); (E) Lectinas relacionadas à jacalina, *Parkia platycephala* (PPL-1; PDB: 1ZGR); (F) Lectinas da família das amarantinas, *Amaranthus caudatus* (ACA; PDB: 1JLY).

As lectinas de Leguminosas são sintetizadas no retículo endoplasmático na forma de pré-pro-lectinas. Essas proteínas possuem uma extremidade denominada de N-terminal, na qual está presente um peptídeo sinal com 20 a 30 resíduos de aminoácidos, que é removido posteriormente durante o transporte da pré-pro-lectina para o lúmen do reticulo endoplasmático, originando uma pró-lectina. Em seguida, a pró lectina passa por uma série de modificações pós-traducionais, como glicosilação e clivagens proteolíticas, dando origem a lectina madura (SHARON; LIS, 1990).

Este grupo de lectinas necessitam de cátions divalentes para manutenção de atividade biológica. Os íons de cálcio (Ca^{+2}) e manganês (Mn^{+2}) tem a função de estabilizar o sítio de ligação a carboidrato além de fixar as posições dos aminoácidos que interagem com os carboidratos ligantes. Os aminoácidos relacionados com a ligação desses íons são bastante conservados (WEIS & DRICKAMER, 1996).

As lectinas de leguminosas geralmente se associam como dímeros ou

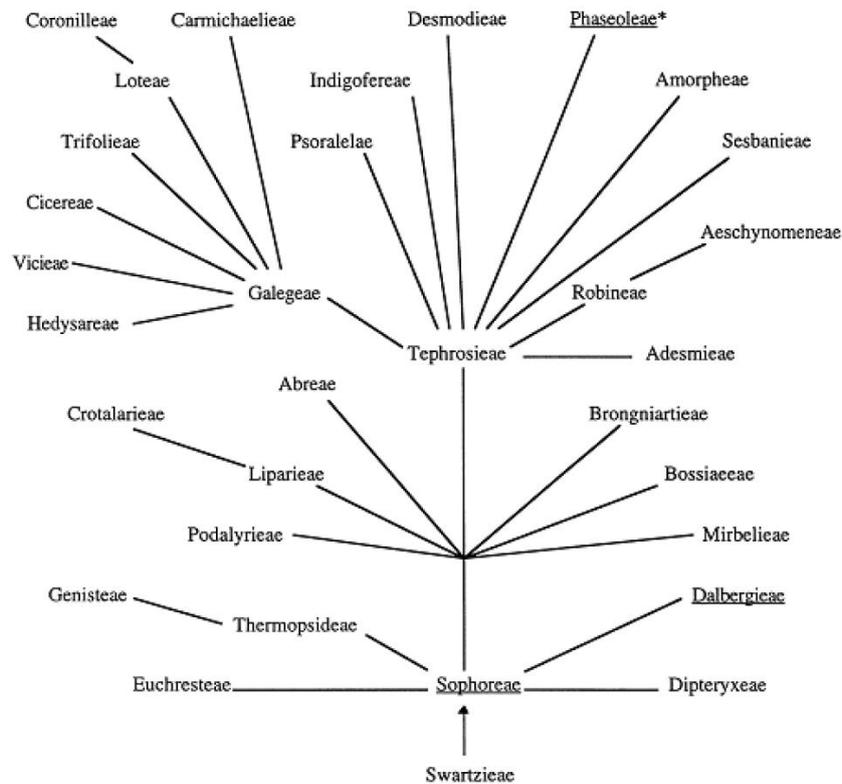
tetrâmeros, possuindo de 25 a 30 kDa na sua sua unidade monomérica. Estas lectinas apresentam uma conservação da sua estrutura monomérica, possuindo uma extensiva similaridade sequencial, ao mesmo tempo que exibem uma variedade de associações quaternárias com importantes implicações funcionais (SRINIVAS *et al.*, 2001). Pequenas alterações nas suas sequencias ou mesmo no seu arranjo quaternário pode indicar diferenças importantes em testes de atividades biológicas com lectinas de leguminosas *in vitro* e *in vivo* (CAVADA *et al.*, 2001).

O sítio de ligação a carboidratos das lectinas de leguminosas apresenta uma região na superfície da molécula formada por quatro loops que formam uma cavidade na sua superfície. Os loops são constituídos de resíduos de Asp, Asn e Gly/Arg que se ligam através de quatro ligações de hidrogênio às hidroxilas dos carbonos três e quatro presentes em monossacarídeos como manose ou glicose, estudos recentes mostraram a capacidade de essas proteínas interagirem com compostos hidrofóbicos. Algumas lectinas isoladas de leguminosas tem a capacidade de interagir com outras moléculas que não carboidratos tais como adenina (HAMELRYCK *et al.*, 1998) e ácido aminobutírico (DELATORRE *et al.*, 2007).

A família das Leguminosas está subdividida em três subfamílias: Papilionoideae, Caesalpinoideae, Mimosoideae. A subfamília Papilionoideae é o grupo que detém o maior número lectinas já isoladas e estudadas, principalmente da tribo Phaseoleae (MANN *et al.*, 2001).

A subfamília Papilionoideae é composta por 483 gêneros e 13.800 espécies divididas em 28 tribos (Figura 3). No Brasil são 88 gêneros e 180 espécies nativas (BARROSO *et al.* 1991; LEWIS *et al.*, 2005). Diversas lectinas dessa subfamília foram estudadas e caracterizadas bioquimicamente. São exemplos as lectinas de *Canavalia virosa* (OSTERNE *et al.*, 2014), *Platypodium elegans* (ARARIPE *et al.*, 2017), *Dioclea reflexa* (PINTO-JUNIOR *et al.*, 2015), *Dioclea guianensis* (ARAÚJO-FILHO *et al.*, 2010), *Centrolobium tomentosum* (ALMEIDA *et al.*, 2014) e *Centrolobium microchaete* (VASCONCELOS *et al.*, 2015).

Figura 3: Relação filogenética proposta para as tribos da subfamília Papilionoideae.



Fonte: Adaptado de CALVETE *et al.*, 1998.

Diversas atividades biológicas têm sido estudadas para as lectinas isoladas de espécies da subfamília Papilionoideae como atividade antinociceptiva (FIGUEIREDO *et al.*, 2009), relaxamento da aorta e formação de óxido nítrico (GADELHA *et al.*, 2005), atividade antifúngica (ARAÚJO-FILHO *et al.*, 2010), efeito anti-inflamatório e analgésico (NUNES *et al.*, 2009), efeito vasodilatador (ASSEREUY *et al.*, 2009).

A tribo *Dalbergieae*, pertence à família *Fabaceae*, subfamília Papilionoideae, compreende cerca de 49 gêneros e de 1.324 espécies aproximadamente (LEWIS *et al.*, 2005). Atualmente já foram isoladas 16 lectinas da tribo *Dalbergieae* sendo distribuídas nos gêneros *Lonchocarpus*, *Andira*, *Platymiscium*, *Platypodium*, *Centrolobium*, *Vatairea*, *Pterocarpus*, *Arachis*, *Machaerium* e *Dalbergia*. A tabela 1 mostra as espécies as quais estas lectinas pertencem, além de suas especificidades a carboidratos.

Tabela 1: Lectinas da tribo *Dalbergieae*.

Espécie	Especificidade	Referência
<i>Andira fraxinifolia</i>	Man/Glc	RANGEL <i>et al.</i> , 2009
<i>Andira pisonis</i>	Man/Glc	LOSSIO <i>et al.</i> , 2014
<i>Andira surinamensis</i>	Man/Glc	NOBRE, 2012
<i>Andira anthelmia</i>	Man/Glc	NASCIMENTO <i>et al.</i> , 2015
<i>Arachis hypogaea</i>	Gal/GalNAc	CHACKO & APPUKUTTAN, 2001
<i>Arachis hypogaea</i>	Lac/Celobiose	SINGH & DAS, 1994
<i>Arachis hypogaea</i>	α -MM	SINGH & DAS, 1994
<i>Centrolobium microchaete</i>	Man/Glc	VASCONCELOS, 2015
<i>Centrolobium tomentosum</i>	Man/Glc	ALMEIDA <i>et al.</i> , 2015
<i>Lonchocarpus araripensis</i>	Glc/Nac	PIRES <i>et al.</i> , 2008
<i>Lonchocarpus capassa</i>	Gal/GalNAc	JOUBERT <i>et al.</i> , 1986
<i>Lonchocarpus sericeus</i>	Glc/Nac	ALENCAR <i>et al.</i> , 1999
<i>Machaerium acutifolium</i>	Glc/Nac	BEZERRA <i>et al.</i> , 2003
<i>Platymiscium floribundum</i>	Man/Glc	PEREIRA-JUNIOR <i>et al.</i> , 2012
<i>Platypodium elegans</i>	Man/Glc	BENEVIDES <i>et al.</i> , 2012
<i>Pterocarpus angolensis</i>	Man/Glc	LORIS <i>et al.</i> , 2003
<i>Pterocarpus rotundifolius</i>	Man/Glc	MARONDEDZE <i>et al.</i> , 2004
<i>Vatairea guianensis</i>	Gal/GalNAc	SILVA <i>et al.</i> , 2012
<i>Vatairea macrocarpa</i>	Gal/GalNAc	CAVADA <i>et al.</i> , 1998

Fonte: Elaborado pelo autor.

A lectina isolada de *Vatairea macrocarpa* é formada por quatro subunidades de 26 kDa que formam um tetrâmero em solução independente do pH, tendo especificidade a galactose/N-acetilgalactosamina (RAMOS *et al.*, 2000). Seus efeitos biológicos incluem liberação de mediadores quimiotático por macrófagos (ALENCAR *et al.*, 2007), indução da infiltração de leucócitos em edema de pata (ALENCAR *et al.*, 2004), aumento da resistência vascular renal, taxa de filtração glomerular e fluxo urinário (MARTINS *et al.*, 2005), migração de neutrófilos *in vivo* por mecanismo indireto (ALENCAR *et al.*, 2003) e apresenta especificidade para resíduos de antígeno Tn (DAM *et al.*, 2007).

A lectina específica à GlcNAc isolada de sementes de *Platypodium*

elegans (PELa) demonstrou ser promissora na utilização como termiticida contra operários e soldados de *Nasutitermes corniger*, além de um grande percentual fungicida contra fungos como o *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* e *Fusarium lateritium* (BENEVIDES et al., 2008). Essas atividades elucidam a evidência da participação das lectinas na defesa vegetal, atuando contra fitopatógenos.

Outras atividades biológicas também foram observadas em uma lectina extraída de sementes de *Lonchocarpus sericeus*, como alta atividade anti-inflamatória em modelo de edema de pata (ALENCAR et al., 1999), efeito anti-inflamatório e antibacteriano em modelo de peritonite infecciosa (ALENCAR et al., 2005) e a diminuição da migração de leucócitos e hipernocicepção mecânica pela inibição da produção de citocinas e quimiocinas (NAPIMOGA et al., 2007).

Estudos realizados investigaram a interação entre o sítio de ligação de metal, atividade de reconhecimento e ligação a carboidratos, estabilidade e estrutura da lectina extraída de *Pterocarpus angolensis*. Esses resultados juntos com dados termodinâmicos contribuem para o entendimento das interações lectina-carboidrato (GARCIA-PINO et al., 2006; GARCIA-PINO et al., 2007; BUTS et al., 2006).

Os importantes estudos referentes à identificação e caracterização de lectinas e suas diversas aplicações como ferramentas biotecnológicas, incentivam cada vez mais a procura por novas lectinas. Em meio a grande versabilidade das lectinas, resolveu-se caracterizar a lectina de sementes de *Machaerium acutifolium* (MAL).

1.7 *Machaerium acutifolium* Vogel

Machaerium acutifolium Vogel (Figura 4) é uma espécie pertencente à família Leguminosae, subfamília Papilionoideae, tribo Dalbergieae. É conhecida popularmente como pau-muchiba, guaximbé, jacarandá-do-campo, jacarandá-bico-de-pato, pau-muchiba, bico-de-pato ou sapuva.

Árvore de folha caduca para alcances semidecídua possuindo de 8-15 m de altura, tronco reto, e 5-9 dm de largura, massa folheada, compósitos, imparipinadas, folhas alternadas com 6 cm de comprimento, glabras, lanceoladas oval, 10-25 mm x 7-10mm.

Possuem inflorescência com 5-35 flores, minúsculo, hermafrodita, sésseis, zigomorfas, panículas terminais; corola amariposada, branca; 10 estames;

ovário piloso, súpero, unicarpelar. Apresentam fruto seco, sâmara plana, e asa membranosa, 5 cm de comprimento, semente oval.

Figura 4: *Machaerium acutifolium* Vogel



Fonte: Adaptado de Jardim das idéias, 2017. (A) Frutos secos , (B) Inflorescência , (C) Ramo com folhas e frutos, (D) Exemplar encontrado no Mato grosso, (E) Caule.

Machaerium é um gênero neotropical estabelecido por Vogel, distribuindo-se do sul do México ao norte da Argentina, com ocorrência em quase toda a América Central e do Sul. Comumente as espécies habitam tanto ambientes secos como úmidos e no Brasil é uma espécie amplamente distribuída, podendo ser encontrada em todas as regiões do país, sendo mais encontrada no Centro-oeste e no Nordeste.

2 - OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

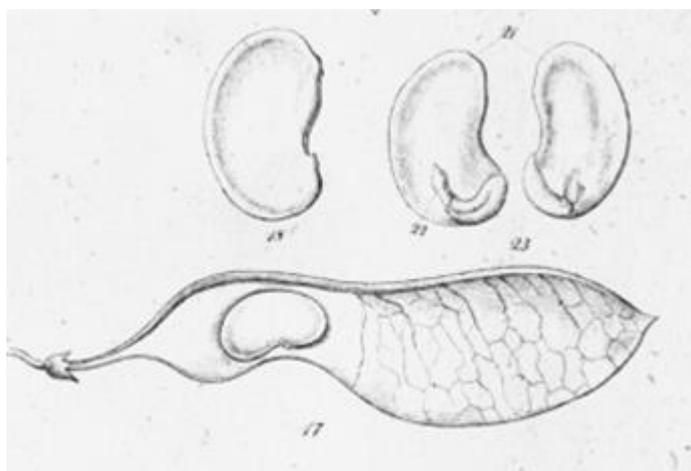
O presente trabalho teve por objetivo realizar a caracterização físico-química parcial de uma lectina de sementes de *Machaerium acutifolium* Vogel.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Procedência do material

As sementes de *Machaerium acutifolium* (Figura 5) foram obtidas através de coleta manual em florestas nativas do estado do Ceará. As sementes, ainda em vagens, foram acondicionadas em um recipiente seco e transportadas até Fortaleza-CE.

Figura 5. Representação esquemática do fruto e semente de *M. acutifolium*. (a) Fruto maduro (b) Semente nua.



Fonte: Flora do Brasil, 1862.

3.2. Obtenção da farinha

As vagens foram colocadas em estufa a 37° C por cinco dias para terminar seu processo de secagem. As sementes foram retiradas das vagens e submetidas a uma trituração em moinho elétrico. Em virtude das sementes serem ricas em lipídeos, a farinha foi delipidada utilizando n – hexano. A farinha de fina granulação e delipidada foi armazenada em recipientes fechados para posterior utilização.

3.3 Extração total de proteínas solúveis da farinha de sementes de *Machaerium acutifolium*

As proteínas solúveis presentes na farinha de sementes *M. acutifolium* foram extraídas com o tampão Tris-HCl 100 mM pH 8,0 com NaCl 150 mM na proporção de 1:10 (p/v), sob agitação constante, durante 4 horas.

A suspensão obtida foi centrifugada a 9000 rpm, à uma temperatura de 4° C por 20 minutos, obtendo assim um precipitado, que foi descartado, e um sobrenadante, que foi filtrado em papel Whatman 1 e no final denominado de extrato total, o qual foi utilizado para realização de ensaios de atividade hemaglutinante e de dosagem de proteínas solúveis para posterior cálculo da atividade específica.

3.4 Fracionamento com sulfato de amônio do extrato total de *M. acutifolium*

O extrato total foi submetido a um fracionamento proteico, que consiste na adição lenta sob agitação constante de sulfato de amônio sólido em diferentes concentrações, obtendo as frações 0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80% e 80-100% de saturação. Após 4 horas em repouso, as suspensões foram centrifugadas a 4000 x g por 20 minutos obtendo-se, nos precipitados, as frações respectivas. As frações foram exaustivamente dialisadas contra água destilada e então solubilizadas em Tris-HCl 100 mM pH 8,0 contendo NaCl 150 mM.

3.5 Dosagem de Proteínas Solúveis

A concentração de proteínas solúveis no extrato de sementes de *Machaerium acutifolium* e nas frações obtidas durante a purificação da lectina foi determinado pelo método descrito por BRADFORD (1976). A cada 100 µL de amostra, diluída ou não, 2,5 mL do reagente de Bradford foram adicionados. A mistura então foi deixada em repouso por cerca de 10 minutos e em seguida teve sua absorbância determinada à 595 nm em um espectrofotômetro de luz visível (VIS LBK Novaspec II, Pharmacia). A concentração de proteínas solúveis nas amostras analisadas foi determinada a partir de uma curva padrão obtida com o uso de soluções de concentrações conhecidas de albumina sérica bovina (BSA).

3.6 Atividade hemaglutinante

A presença da lectina no extrato total foi detectada a partir de ensaios de aglutinação celular, quando foi observada a formação de precipitado visível macroscopicamente. Os testes para detecção da atividade hemaglutinante nos extratos e nas diferentes frações proteicas foram realizadas em tubos de acordo

com o protocolo descrito por Moreira e Perrone (1977), como descrito a seguir:

O extrato total e as frações obtidas no fracionamento por sulfato de amônio, foram submetidos ao teste de atividade hemaglutinante usando hemácias de coelho e humano (tipos sanguíneos A, B e O) no decorrer do processo de purificação da lectina de *M. acutifolium*. As amostras foram diluídas em série e em duplicata (1:2, 1:4, 1:8 ...), em tampão Tris-HCl 100 mM pH 8,0 com NaCl 150 mM. A 100 µL de cada diluição adicionou-se 100 µL de uma suspensão de hemácias nativas ou tratadas com enzimas proteolíticas (papaína e tripsina) à 3% em NaCl 150 mM. O ensaio foi incubado à 37 °C por 30 minutos, em seguida deixado em repouso à temperatura ambiente por 30 minutos.

Os títulos de hemaglutinação foram medidos em termos de Unidade Hemaglutinante (U.H./mL) como sendo o inverso da maior diluição ainda capaz de apresentar hemaglutinação visível.

3.7 Cálculo da atividade hemaglutinante específica

Após a obtenção do título de hemaglutinação e da quantidade de proteínas solúveis, a atividade específica para uma das frações foi calculada com o objetivo de se monitorar a concentração/purificação da lectina em estudo.

O cálculo foi feito pela divisão do título de hemaglutinação (U.H./mL) pela dosagem de proteínas solúveis (mg/mL), cujo quociente foi expresso em U.H/mg (Unidade de hemaglutinação por miligrama de proteína). Esses resultados foram comparados e auxiliaram na escolha da melhor estratégia de purificação.

3.8 Inibição da atividade hemaglutinante (A.H), por açúcares simples, glicoproteínas e açúcares sulfatados

Foram relacionados alguns açúcares simples ou sulfatados bem como glicoproteínas disponíveis. Nos tubos de ensaio dispostos em duplicata foram adicionados, nos dois primeiros tubos, 100 µL de cada um dos açúcares e posteriormente diluídos em série nos tubos (1:2, 1:4, 1:8 ...) em tampão Tris-HCl 100 mM pH 8,0 com NaCl 150 mM. Após a diluição dos açúcares e glicoproteínas, 100 µL de extrato na concentração da penúltima U.H (previamente determinada) foram adicionados em todos os poços. O ensaio foi incubado à 37°C em estufa por 30 min

e após esse período deixado em repouso à temperatura ambiente por mais 30 min.

Duzentos microlitros de sangue de coelho nativo foram acrescidos à todas as diluições dos açúcares e glicoproteínas contendo a fração diluída. A mistura foi novamente incubada à 37 °C durante 30 minutos e depois deixada em repouso à temperatura ambiente por mais 30 minutos. A inibição da A.H pelos açúcares foi determinada e observou-se que, para aqueles açúcares que se mostraram capazes de inibir a A.H a maior diluição em que se permaneceu a ausência da A.H, ou seja, que menor concentração de tais açúcares ainda inibe a A.H (concentração mínima inibitória).

3.9 Cromatografia de afinidade em matriz de quitina

Na cromatografia de afinidade em matriz de quitina, a β -1,4 N-acetilglicosamina foi utilizada como açúcar imobilizado, que previamente foi determinado como um forte inibidor da A.H. A fração 0-40%, rica em lectinas, foi aplicada, em coluna (150 mm X 18 mm) com β -1,4 N-acetilglicosamina acoplada, previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 100 mM pH 8,0 com NaCl 150 mM, sendo incubado por 4 horas. O pico não retido foi obtido com eluição isocrática e coletada em 2 ml por tubo de ensaio. Posteriormente, o pico retido na fase estacionária foi obtido com tampão glicina 100 mM pH 2,6 com NaCl 150 mM, e também coletando em 2 mL por tubo de ensaio. As frações coletadas foram monitoradas por absorvância de 280 nm. As frações ou picos obtidos foram dialisadas contra água destilada e então liofilizadas. A atividade hemaglutinante, o teor de proteínas solúveis e a atividade específica de todas as frações cromatográficas foram avaliados.

3.10 Eletroforese em SDS-PAGE

A avaliação do grau de pureza e da visualização da massa molecular aparente de todas as amostras obtidas a partir da farinha de *Machaerium acutifolium* e das frações foram realizadas seguindo a metodologia desenvolvida por (LAEMMLI, 1970).

O gel superior ou gel de empilhamento foi preparado usando

acrilamida/bisacrilamida 4% em tampão Tris-HCl 500 mM, pH 6,8, SDS 1%, persulfato de amônio (100 mg/ml) e TEMED. O gel de separação da amostra foi preparado em tampão Tris-HCl 1500 mM, pH 8,8 contendo 1% TEMED e persulfato de amônio (100 mg/mL).

As amostras liofilizadas foram solubilizadas a uma concentração de 4 mg/mL em tampão de amostra contendo Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, 10% de glicerol, 0,02% de azul de bromofenol e 1% de SDS.

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

Depois da corrida eletroforética, o gel de separação foi lavado com água destilada para a retirar o excesso de tampão de corrida, após isso o gel corado com coomassie blue G-250 a 0,05%, dissolvido em metano, ácido acético e água a uma proporção de 1:3:5:8 (v/v/v). O gel foi então descorado com água destilada aquecida.

3.11 Efeito de temperatura sobre a atividade hemaglutinante

O efeito da temperatura sobre a atividade da lectina foi analisada utilizando 1 mg de lectina em tampão Tris-HCl 100mM pH 8,0, as quais foram submetidas a diferentes temperaturas: 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 °C por uma hora. Após esse período, foi analisada sua atividade pelo ensaio de hemaglutinação, a 37 °C.

3.12 Efeito do pH sobre a atividade da lectina

Com o objetivo de avaliar o efeito do pH sobre a atividade hemaglutinante da lectina foram utilizadas alíquotas de 100 µl da solução de lectina a uma concentração 1 mg/ml em diferentes tampões: Acetato 100 mM pH 4,0 e 5,0, Citrato de Sódio 100mM pH 6,0, Fosfato de Sódio 100 mM pH 7,0, Tris-HCl 100mM pH 8,0, Glicina 100mM pH 9,0 e 10,0. Posteriormente, foi realizada a análise da atividade hemaglutinante.

3.13 Efeito de agente quelante sobre a atividade hemaglutinante

A avaliação da dependência da atividade hemaglutinante da MAL por diferentes cátions divalentes foi analisada. Para tal propósito, uma alíquota da lectina (1mg/mL) foi solubilizada em Tris-HCl 100mM pH 8,0 com NaCl 150mM e dialisada contra soluções de EDTA 100 mM contendo NaCl 150mM por 24 horas, seguida pela diálise contra NaCl 150mM para retirada de excesso de EDTA. Após isto, atividade hemaglutinante foi testada pela adição de 100 µL de soluções de NaCl 150mM contendo CaCl₂ e MnCl₂ separadamente, a uma concentração de 100mM em tubos de ensaio, onde em seguida foram feitas diluições seriadas em duplicata a partir da adição de 100 µL da lectina (1 mg/mL) e acrescentou-se 100 µL de eritrócitos tripsinizados de coelho a 2 % em cada tubo e levou-se a incubação por 1 hora.

3.14 Dosagem de carboidratos totais

A MAL foi solubilizada em NaCl 150mM, obtendo-se uma solução na concentração de 1,0 mg/mL e em seguida foi submetida ao método de Dubois e colaboradores (1956) para a determinação do conteúdo de carboidratos, utilizando-se galactose com padrão.

3.15 Teste de letalidade de *Artemia* sp.

Para analisar o efeito citotóxico de MAL, cistos de *Artemia* sp. Foram submetidos à eclosão sob luz aeração e temperatura controlada, como descrito a seguir: 30 mg de cistos de artêmia foram pesados, adicionados em um béquer contendo 300 mL de água do mar natural autoclavada e incubados durante 48 h, período ideal de crescimento dos náuplios para experimentos de toxicidade. Após isto, uma solução de MAL foi preparada a uma concentração de 200 µg/mL em água do mar natural autoclavada.

Em uma placa de linbro de 24 poços adicionou-se uma alíquota da solução de proteínas a fim de atingir as concentrações finais de 12,5, 25, 50, 100 µg/mL, e, em seguida, acrescentou-se mais uma alíquota da solução de água do mar natural contendo 10 exemplares de náuplios, totalizando, ao final, 2 mL de solução por poço. O experimento foi conduzido em triplicatas, para cada condição, e

o controle negativo foi feito da mesma forma, com água do mar natural autoclavada, 10 exemplares de náuplios, volume final de 2 mL, porém sem a adição da lectina. Para inibir o efeito da lectina, a MAL, nas mesmas concentrações do experimento anterior (12,5, 25, 50, 100 µg/mL) foi incubada em água do mar natural autoclavada contendo 0,1 M de D-Manose, durante 1 h a 37 °C. Ao final, as análises foram conduzidas por comparação das condições testadas com as condições controle.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

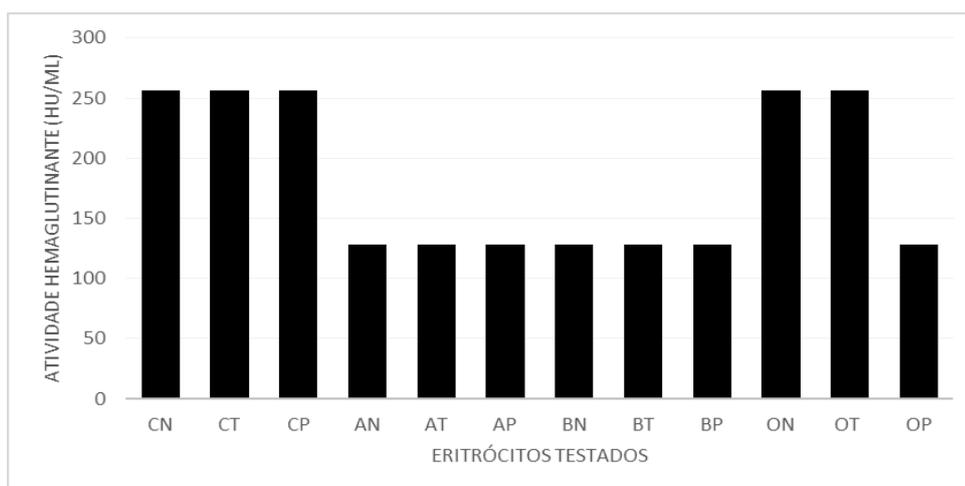
4.1 Purificação da Lectina de Sementes de *Machaerium acutifolium*

As técnicas utilizadas para a extração e purificação da lectina de *Machaerium acutifolium* foram aqueles usualmente testados para proteínas vegetais, que envolvem a extração utilizando soluções salinas e/ou ácidas, precipitação por solventes orgânicos ou por sais e fracionamento por técnicas cromatográficas, tais como exclusão molecular e troca iônica (BELITZ *et al.* 1990).

Devido à interação de lectinas e glicoconjugados da superfície celular, pode ocorrer a formação de ligações cruzadas entre eritrócitos adjacentes no ensaio de atividade hemaglutinante, causando a aglutinação destas células (PEUMANS & VAN DAMME, 1995). Essa propriedade foi utilizada para a identificação de uma nova lectina em sementes de *M. acutifolium*.

O extrato proteico preparado com a farinha de sementes de *M. acutifolium* apresentou níveis relativamente altos de atividade hemaglutinante tanto contra eritrócitos de coelho quanto de humanos do sistema ABO (Gráfico 1), ambos não tratados ou tratados com enzimas proteolíticas. O maior título de hemaglutinação foi observado contra eritrócitos de coelho nativo e tratadas com as enzimas papaína e tripsina.

Gráfico 1: Atividade hemaglutinante do extrato total das sementes de *M. acutifolium* testado contra diferentes tipos sanguíneos.



Eritrócitos testados na atividade hemaglutinante. Legenda: CN – Sangue de coelho nativo; CT – Sangue de coelho tratado com a enzima tripsina; CP – Sangue de coelho tratado com a enzima papaína; AN – Sangue humano do tipo A nativo; AT – Sangue humano do tipo A tratado com enzima tripsina; AP – Sangue humano do tipo A tratado com enzima papaína; BN – Sangue humano do tipo B nativo; BT – Sangue humano do tipo B tratado com enzima tripsina; BP – Sangue humano do tipo B tratado com enzima papaína; ON – Sangue humano do tipo O nativo; OT – Sangue humano do tipo O tratado com enzima tripsina; OP – Sangue humano do tipo O tratado com enzima papaína

A especificidade da MAL por carboidratos foi determinada pelo ensaio de inibição da atividade hemaglutinante contra diferentes soluções de açúcares. Os melhores resultados foram obtidos com *N-acetil-D-glicosamina*, D-glicose, D-manose, α -Metil-D-manosídeo, respectivamente (Tabela 3). A lectina de sementes de *Platymiscium floribundum* também foi inibida por *N-acetil-D-glicosamina* e manose (PEREIRA JÚNIOR, 2011). Em outra espécie da tribo Dalbergieae, *Centrolobium microchaete*, existe uma lectina que também mostrou ser específica por D-manose, *N-acetil-D-glicosamina*, D-glicose e α -Metil-D-manosídeo (VASCONCELOS *et al.*, 2015). Enquanto isso, as lectinas de sementes de *Pterocarpus angolensis* (LORIS *et al.*, 2003) e *Platypodium elegans* (BENEVIDES, 2008) foram inibidas por glicose e manose. Por outro lado, a lectina de sementes de *Varairea guianensis* (VGL), também da mesma tribo, apresenta especificidade por galactose e alguns derivados (SILVA *et al.*, 2012).

Tabela 3: Inibição da atividade hemaglutinante no extrato total

Açúcares e glicoproteínas	Concentração inibitória mínima * (mM ou mg/mL)
D-Glicose	25 mM
D-Manose	12,5 mM
α -Metil-D-manosídeo	50 mM
N-acetil-D-glicosamina	25 mM
D-Galactose	N.I**
N-Acetil-D-galactosamina	N.I
α -Lactose	N.I
Sacarose	N.I
Mucina	N.I
Desoxirribose	N.I
D-Ribose	N.I
L-Ramnose	N.I
Fetuina	N.I

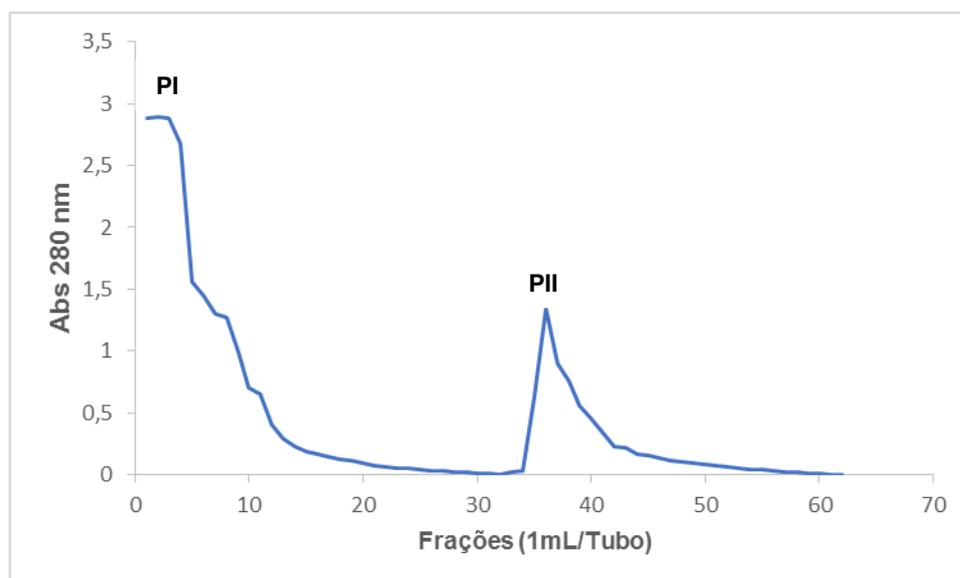
* Concentração Mínima Inibitória

** O carboidrato não inibiu a uma concentração de 100 mM.

A lectina de sementes de *M. acutifolium* foi purificada através de duas etapas cromatográficas. Para isto, o extrato total foi previamente precipitado pela adição de sulfato de amônio sólido e cinco frações proteicas foram obtidas F 0-20%, F 20-40%, F 40-60%, F 60-80%, F 80-100%. A atividade hemaglutinante se

concentrou quase que exclusivamente na fração 20-40% e, por esse motivo, esta fração foi utilizada para a cromatografia de afinidade em uma matriz de Quitina (Figura 5). Essa cromatografia proporcionou a purificação da MAL com um grau de pureza de 11 vezes (Tabela 4).

Gráfico 2 . Perfil cromatográfico da purificação de MAL em matriz de afinidade em quitina.



A fração 20-40% solubilizada em Tris-HCl 100mM pH 8,0 com NaCl 150mM e aplicada em uma matriz de Quitina (2,0 x 15,0 cm) previamente equilibrada com a mesma solução. A fração não retida (PI) foi eluída com o tampão de equilíbrio, e em seguida, a fração retida (PII) foi eluída com o tampão Glicina 100mM pH 2,6 com NaCl 150mM.

Tabela 4: Processo de purificação da lectina de *Machaerium acutifolium*.

Fração	a) Proteínas (mg/mL)	b) U.H/mL	c) A.H.E. (UH/mgP)	d) Purificação
Extrato Total	27,11	16	0,59	1
F 0-20	3,31	8	2,41	4,08
F 20-40	50,31	128	2,54	4,30
PII-Quitina	2,29	16	6,98	11,83

a) Concentração de proteínas determinada pelo método de Bradford (1976);

b) Atividade hemaglutinante contra eritrócitos de coelho tratados com tripsina, expressa em termos de Unidade Hemaglutinante (U.H);

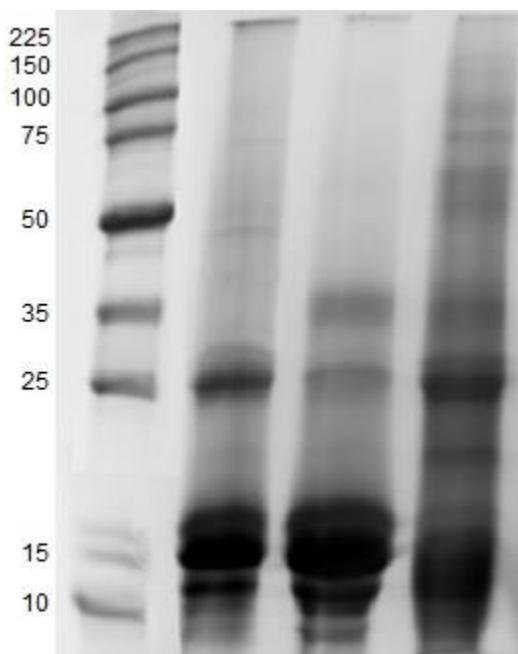
c) Atividade Hemaglutinante Específica calculada como a relação entre a atividade hemaglutinante e a concentração de proteínas;

d) Purificação, calculada como a relação entre a atividade hemaglutinante específica do extrato total e aquela de cada passo de purificação

4.2 Caracterização físico-química da lectina de sementes de *M. acutifolium*

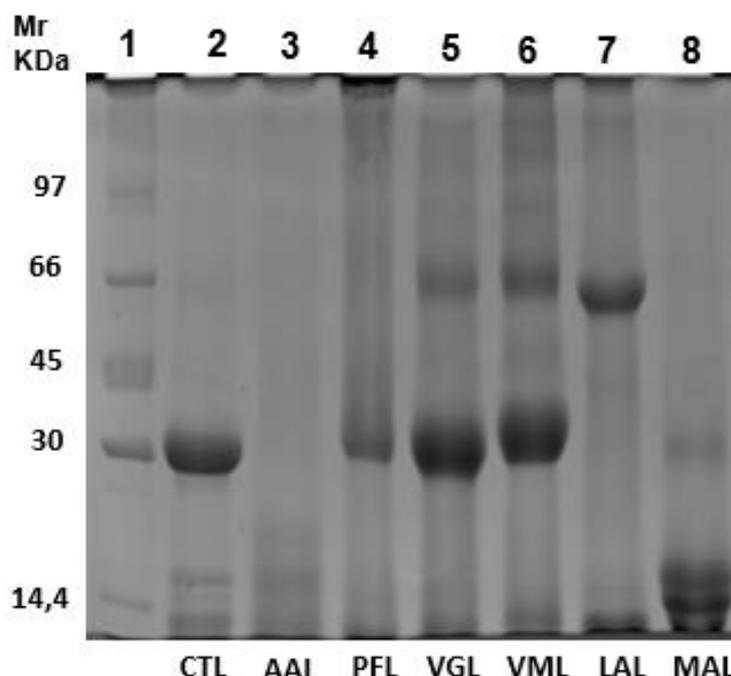
O processo de purificação da MAL foi monitorado por SDS-PAGE na presença ou ausência do agente redutor β -mercaptoetanol. A Figura 6 mostra o perfil eletroforético das frações proteicas correspondentes aos diferentes estágios de purificação da lectina. Nesta figura pode-se observar que a lectina purificada é caracterizada por um perfil composto por quatro bandas, sendo uma delas a cadeia principal de aproximadamente 30 kDa e três cadeias menores de aproximadamente 18, 15 e 12 kDa. A lectina de sementes de *Vatairea guianensis*, espécie pertencente à tribo Dalbergieae, possui um perfil eletroforético composto por três bandas, sendo uma delas de peso molecular aparente de 30 kDa e duas bandas de peso molecular menor, de 18 e 15 kDa (SILVA *et al.*, 2012).

Figura 6: Perfil eletroforético em SDS-PAGE



Poços: 1- Marcador molecular de proteína de baixo peso (225KDa, 150KDa, 100KDa, 75KDa, 50KDa, 35KDa, 25KDa, 15KDa, 10KDa), 2 – PII retido na quitina eluido com manose, 3 – PII retido na quitina eluido com glicina, 4 – Fração 20-40%.

Figura 7: Comparativo do perfil eletroforético entre a lectina MAL contra lectinas da tribo Dalberdieae.



Poços: 1- Marcador molecular de proteína de alto peso, 2 – Lectina CTL de *Centrolobium tomentosum*, 3 – Lectina AAL de *Andira amthelmia*, 4 – Lectina PFL de *Platymiscium floribundum*, 5 – Lectina VGL de *Vatairea guianensis*, 6 – Lectina VML de *Vatairea macrocarpa*, 7 – Lectina LAL de *Lonchocarpus araripensis*, 8 – Lectina MAL de *Machaerium acutifolium*.

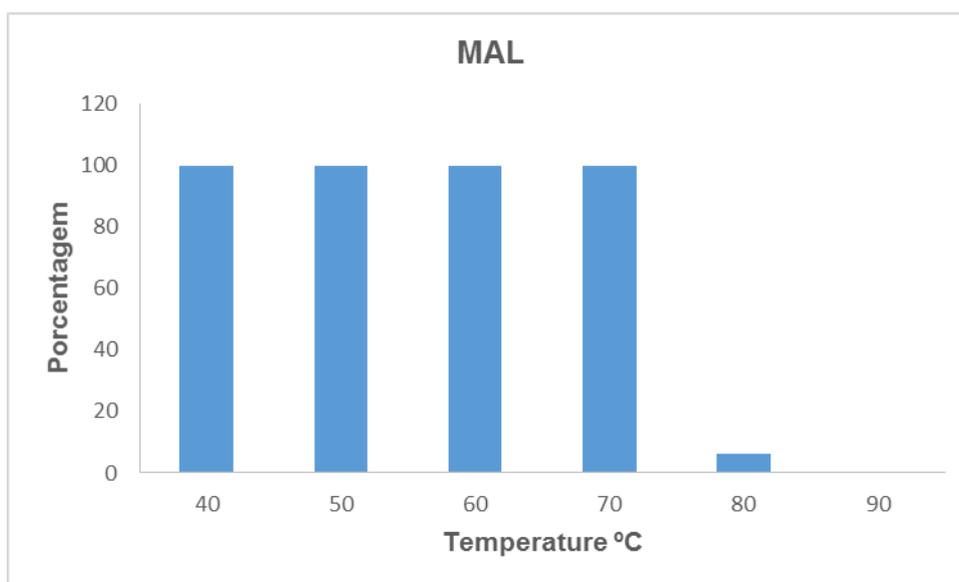
Entretanto, a lectinas isolada das sementes de *Platymiscium floribundum*, também da tribo Dalbergieae, possui um perfil eletroforético composto por apenas uma banda. A lectina PFL caracteriza-se por uma banda única de massa molecular aparente de aproximadamente 29 kDa, tanto na presença quanto na ausência do agente redutor (PEREIRA JÚNIOR, 2011) e a lectina PELA apresentou uma banda dupla de massa molecular aparente de 30 kDa (BENEVIDES, 2008). A lectina CTL apresenta um perfil eletroforético com três bandas, sendo a banda majoritária com aproximadamente 28 KDa e duas subunidades inferiores com 16 e 12 KDa, tendo uma similaridade com o perfil apresentado pela lectina MAL (Figura 7).

Ao ser submetida a reação do Fenol – Ácido Sulfúrico (DUBOIS, 1976), foi possível verificar que a MAL possui um total de 5,4% de carboidrato. A lectina de *V. macrocarpa* também se mostrou ser uma glicoproteína composta de aproximadamente 8% de carboidratos (CAVADA et al., 1998), em contraposição a lectina de *Platypodium elegans* que apresentou aproximadamente 2,2 % de

carboidratos totais (ARARIPE et al., 2017).

MAL apresentou considerável termoestabilidade, pois manteve sua atividade hemaglutinante mesmo após incubação a 70 °C por 1 hora. Por outro lado, a atividade hemaglutinante foi reduzida consideravelmente quando a lectina foi submetida a temperaturas iguais ou superiores a 80 °C (Gráfico 7).

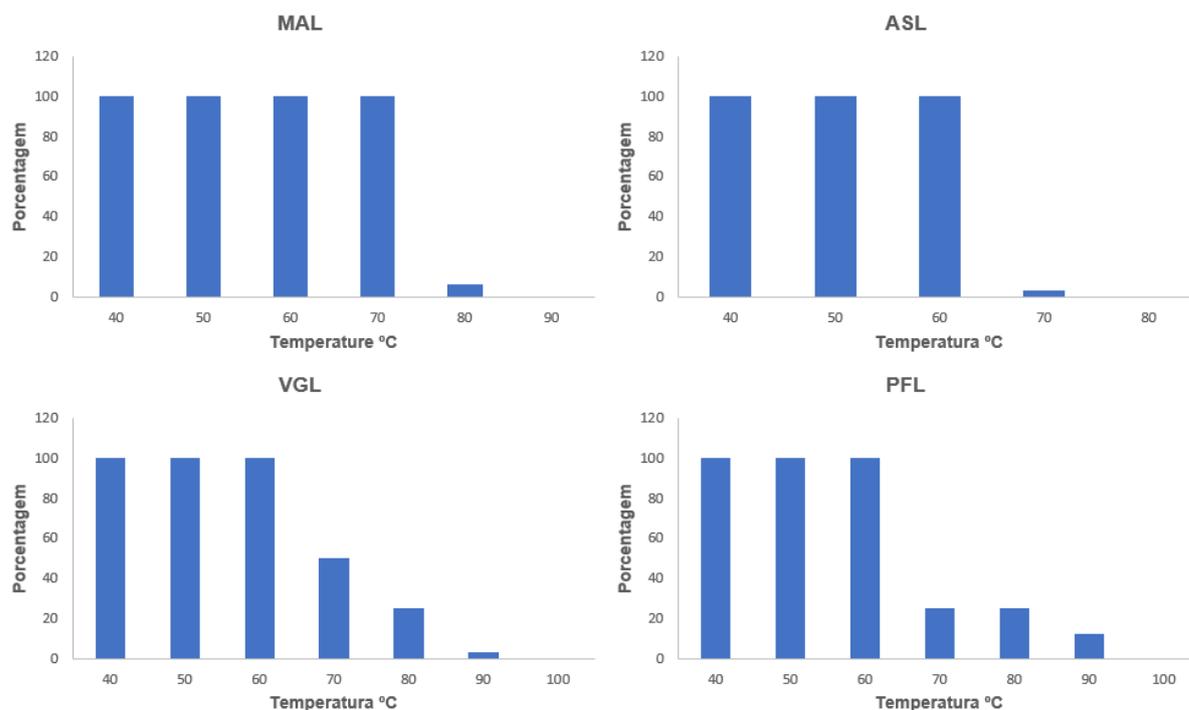
Gráfico 3 – Estabilidade térmica da lectina de *Machaerium acutifolium*



Amostra: 1 mg MAL/ 1 mL de Tris-HCl 100mM pH 7,6 com NaCl 150mM. **Temperaturas:** 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C e 100°C.

As lectinas isoladas de sementes de *Andira surinamensis* (ASL), *Vatairea guianensis* (VGL) e *Platymiscium floribundum* (PFL), também da tribo Dalbergieae, apresentam uma termoestabilidade inferior quando comparadas com a lectina de sementes de *Machaerium acutifolium* (Figura 8). De forma similar essas lectinas apresentaram perda total da sua atividade quando submetidas a uma temperatura de incubação de 100°C e de forma oposta, Cavada e colaboradores (1998) verificaram que a VML mostrou-se com significativa termoestabilidade, uma vez que manteve 55% de sua atividade após exposição a 100 °C por 5 minutos.

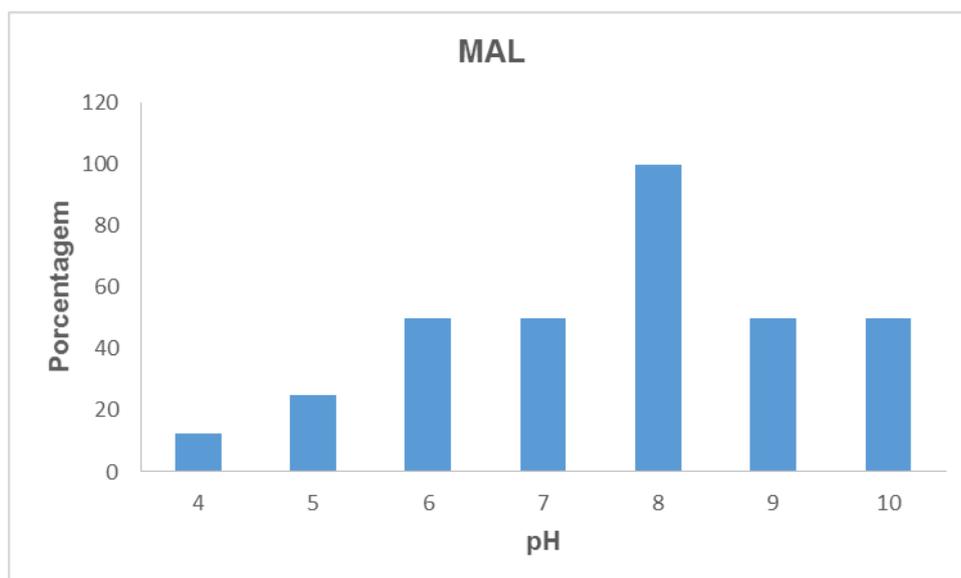
Figura 8: Comparação do efeito da variação de temperatura sobre a atividade hemaglutinante de lectinas da tribo Dalbergieae.



MAL: Lectina isolada de sementes de *Machaerium acutifolium*; **ASL:** Lectina isolada de sementes de *Andira surinamensis*; **VGL:** Lectina isolada de sementes de *Vatairea guianensis*; **PFL:** Lectina isolada de sementes de *Platymiscium floribundum*.

A atividade hemaglutinante da MAL também é resistente a uma ampla faixa de pH. Os títulos de hemaglutinação apontaram um pH ótimo de 8,0 numa faixa de 4,0 a 10,0 (Gráfico 8). Essa faixa de pH foi selecionada devido a resistência globular dos eritrócitos. Extremos dessa faixa provocam hemólise e impossibilitam a análise direta da hemaglutinação. Em termos de resistência às variações de pH, a proteína mostrou-se resistente aos extremos 4,0 e 10,0, quando posteriormente, dialisados em tampão no pH ótimo para sua atividade. Esses dados suscitam que os eventos de alteração no estado da carga da proteína que afeta a atividade hemaglutinante ou a possível desnaturação nos extremos de pH são reversíveis.

Gráfico 4 – Estabilidade da lectina de *Machaerium acutifolium* a uma ampla faixa de pH

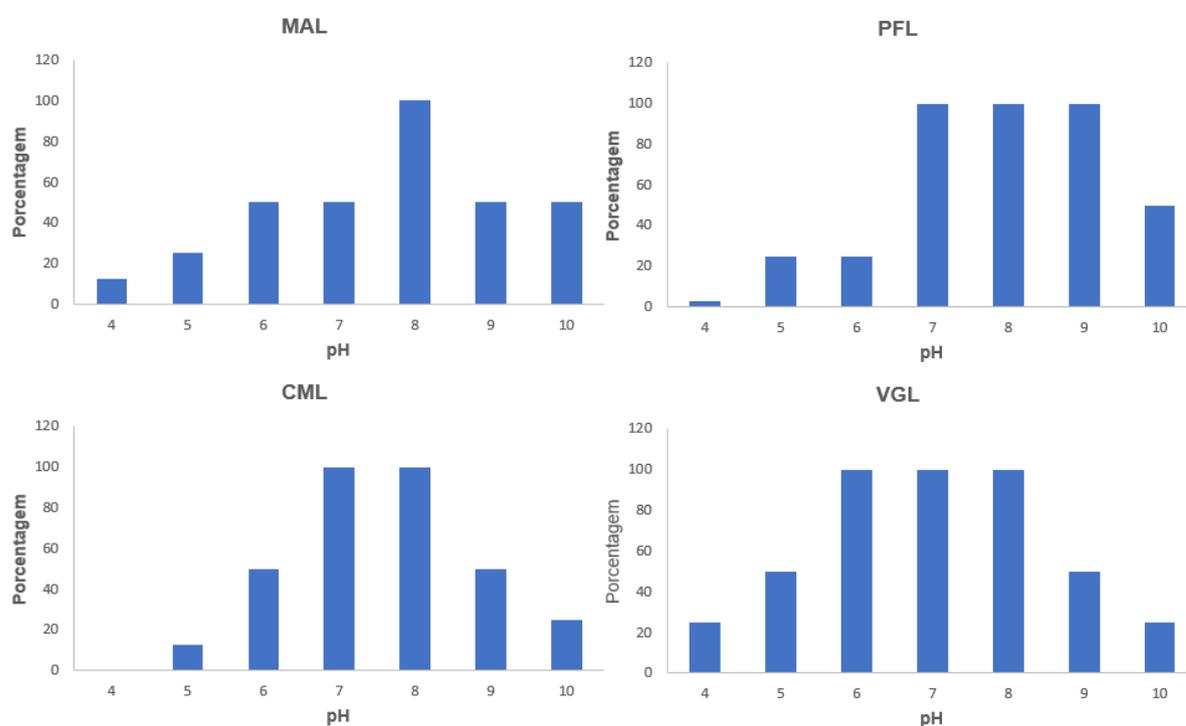


Amostra: 1 mg MAL/ 1 mL de Tris-HCl 100 mM pH 7,6 com NaCl 150 mM. Diálise por 24 horas contra diferentes soluções tampão contendo NaCl 150mM. Tampões: acetato de sódio 100 mM pH 4,0 e 5,0, citrato de sódio 100 mM pH 6,0, fosfato de sódio 100 mM pH 7,0, Tris-HCl 100 mM pH 8,0, glicina-NaOH pH 9,0 e 10,0.

Quando comparamos os efeitos da variação de pH sobre a atividade hemaglutinante da MAL com as lectinas isoladas de sementes de *Centrolobium microchaete* (VASCONCELOS et al., 2015), *Platymiscium floribundum* (PEREIRA-JÚNIOR et al., 2014) e *Vatairea guianensis* (SILVA et al., 2012), observamos que essas lectinas apresentam uma resistência a variações de pH, mantendo sua atividade hemaglutinante estável por uma faixa de pH mais ampla do que foi observado nos ensaios da lectina de *Machaerium acutifolium* (Figura 8).

Ao testar a atividade hemaglutinante da MAL na presença de EDTA, foi possível verificar que há uma redução desta (Gráfico 4) em 75%, indicando que a atividade hemaglutinante da MAL é dependente de cátions divalentes, não tendo sua atividade restabelecida após a adição de cálcio e manganês. Resultado semelhante foi observado com a lectina de *Pterocarpus angolensis*, também da tribo Dalbergieae, teve sua atividade hemaglutinante completamente perdida após tratamento com EDTA (ECHEMENDIA-BLANCO et al., 2009). A lectina ASL isolada de *Andira surinamensis* apresentou uma redução da sua atividade após o tratamento contra EDTA, mas diferente da lectina MAL, ela teve sua atividade totalmente restabelecida após a adição de íons metálicos Ca^{+2} e Mn^{+2} (NOBRE, 2012).

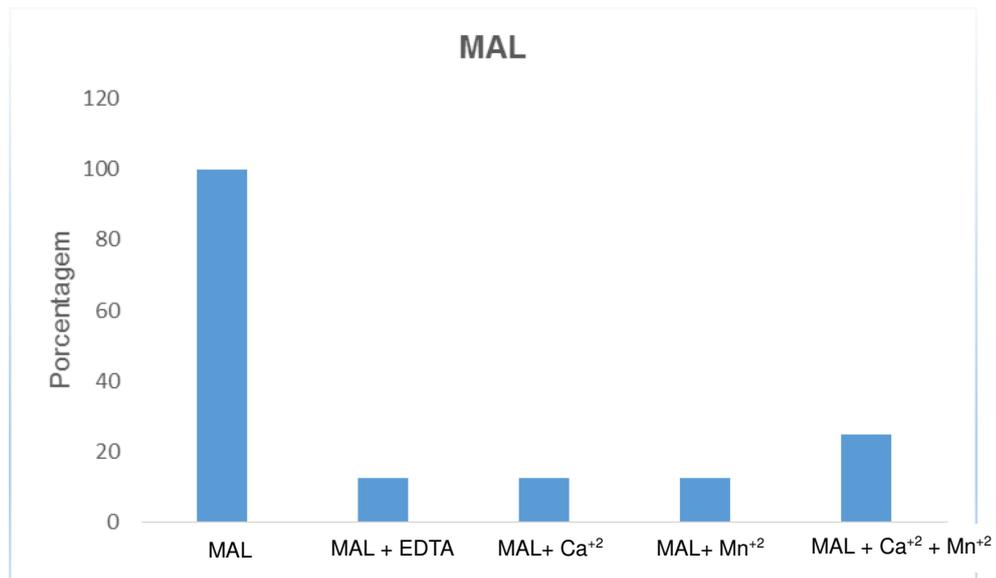
Figura 8: Comparação do efeito da variação de pH sobre a atividade hemaglutinante de lectinas da tribo Dalbergieae



MAL: Lectina isolada de sementes de *Machaerium acutifolium*; **CML:** Lectina isolada de sementes de *Centrolobium microchaete*; **VGL:** Lectina isolada de sementes de *Vatairea guianensis*; **PFL:** Lectina isolada de sementes de *Platymiscium floribundum*.

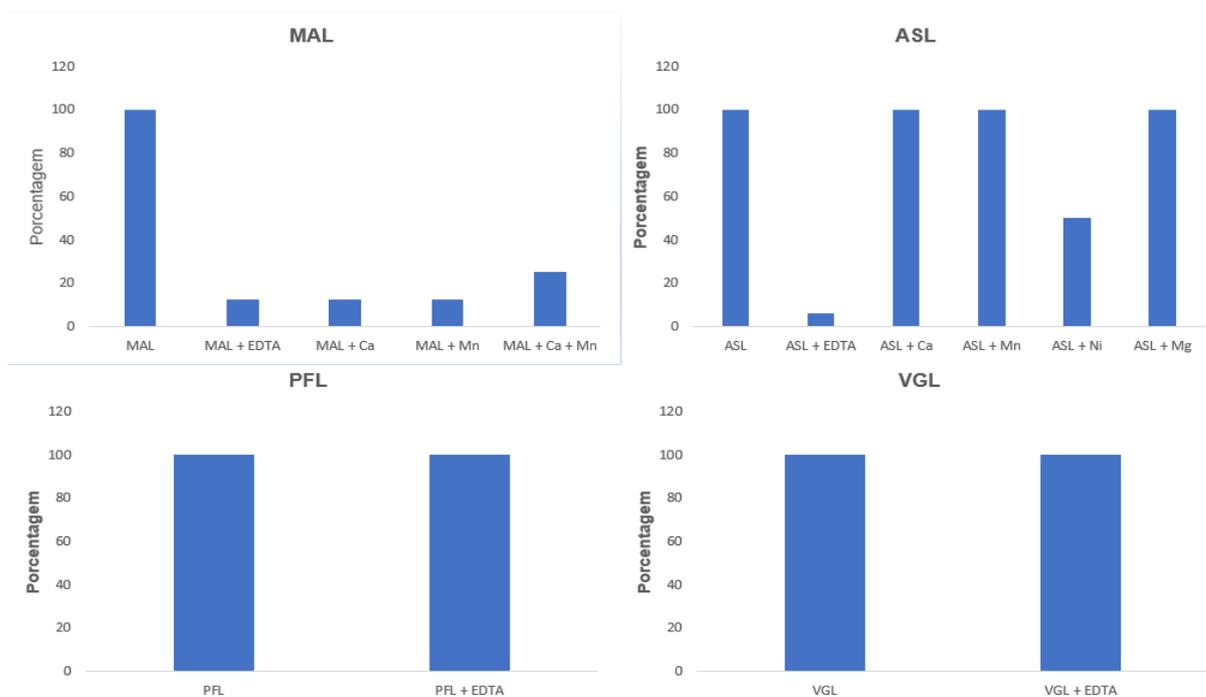
Por outro lado, as lectinas de *Platymiscium floribundum* e *Vatairea guianensis* não tiveram sua atividade afetada após diálise exaustiva da proteína nativa com EDTA como mostra a figura 10 (PEREIRA JÚNIOR, 2011; SILVA *et al.*, 2012).

Gráfico 5 – Análise do efeito do EDTA na atividade hemaglutinante da lectina de *Macherium acutifolium*



Amostra: 1 mg MAL/ 1 mL de Tris-HCl 100mM pH 8,0 com NaCl 150mM. Diálise por 24 horas contra EDTA 100mM contendo NaCl 150mM. Iões metálicos Ca²⁺ e Mn²⁺

Figura 10: Comparação do efeito do EDTA sobre a atividade hemaglutinante de lectinas da tribo Dalbergieae.



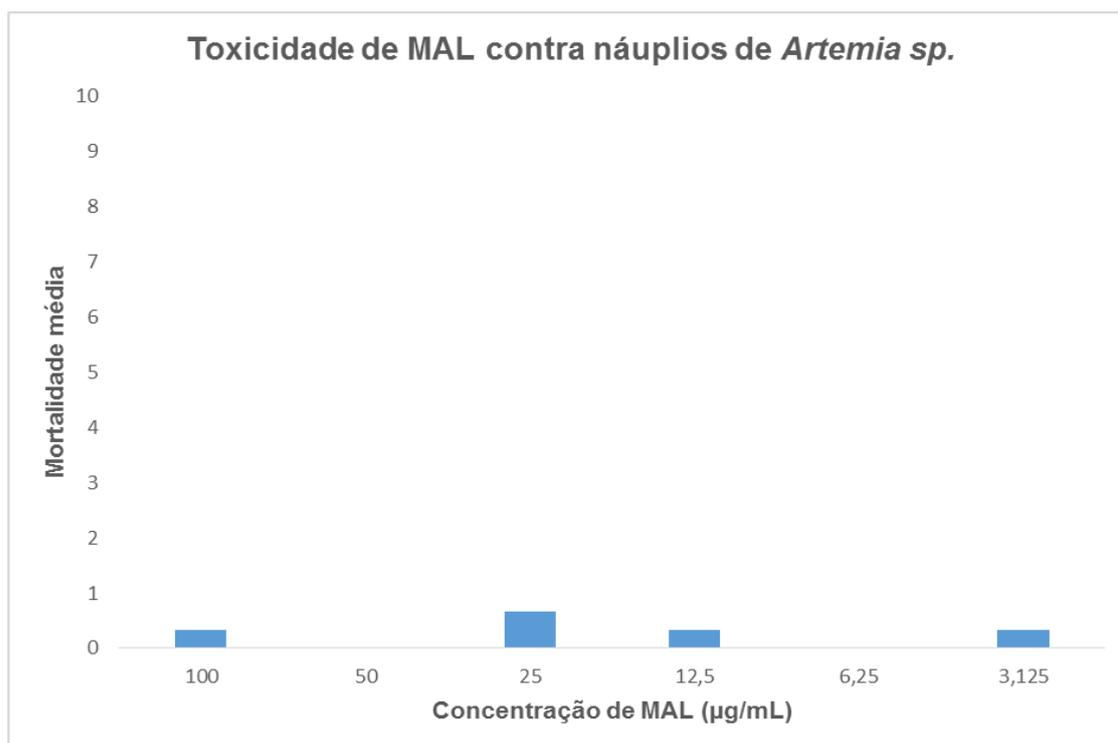
MAL: Lectina isolada de sementes de *Machaerium acutifolium*; **ASL:** Lectina isolada de sementes de *Andira surinamensis*; **VGL:** Lectina isolada de sementes de *Vatairea guianensis*; **PFL:** Lectina isolada de sementes de *Platymiscium floribundum*. Ions metálicos Ca²⁺, Mg²⁺, Ni²⁺, Mn²⁺.

4.4 Ensaio de toxicidade de MAL contra *Artemia* sp.

O ensaio de letalidade com *Artemia* sp. (SORGELOOS et al. 1978; PERSOONE, 1979) tem sido aplicado na busca de novas biomoléculas com diversas atividades farmacológicas, como por exemplo, atividade anticâncer, antiviral, inseticida, pesticida e anti-HIV (CARBALLO et al. 2002; PERVIN et al. 2006; HO et al. 2007). MAL não apresentou atividade tóxica contra náuplios de *Artemia* sp (Gráfico 5).

Devido seu caráter não tóxico a lectina MAL poderá ser usada em ensaios biológicos *in vivo*, sendo muito importante para esses ensaios que a lectina não tenha atividade tóxica que possam vir a causar algum dano às células do animal.

Gráfico 6: Avaliação da toxicidade da MAL contra náuplios de *Artemia* sp.



Concentrações obtidas da diluição da lectina MAL utilizadas no experimento 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 µg/mL

5 – CONCLUSÃO

A lectina MAL foi caracterizada físico-quimicamente. O perfil de massa molecular aparente foi observado em SDS-PAGE. MAL aglutina eritrócitos de coelho e de humanos (ABO) tratados com enzimas proteolíticas e é metaloproteína, termoestável e estável em ampla faixa de pH. É glicoproteína e não apresenta efeito tóxico sobre náuplios de artêmia em nenhuma das concentrações testadas, mostrando ser uma importante ferramenta biotecnológica.

REFERÊNCIAS

ALENCAR, N. M.; TEIXEIRA, E. H.; ASSREUY, A. M. S.; CAVADA, B. S.; FLORES, C. A.; RIBEIRO, R. A. Leguminous lectins as tools for studying the role of sugar residues in leukocyte recruitment. **Mediators of Inflammation**, v. 8, p. 107–113, 1999.

ALENCAR, N. M. N.; ASSREUY, A. M. S.; CRIDDLE, D. N.; SOUZA, E. P.; SOARES, P. M. G.; HAVT, A.; ARAGÃO, K. S.; BEZERRA, D. P.; RIBEIRO, R. A.; CAVADA, B. S. *Vatairea macrocarpa* lectin induces paw edema with leukocyte infiltration. **Protein and Peptide Letters**, v. 11(2), p. 1-6, 2004.

ALENCAR, N. M. N.; CAVALCANTE, C. F.; VASCONCELOS, M. P.; LEITE, K. B.; ARAGÃO, K. S.; ASSREUY, A. M. S.; NOGUEIRA, N. A. P.; CAVADA, B. S.; AND VALE, M. R. Anti-inflammatory and antimicrobial effect of lectin from *Lonchocarpus sericeus* seeds in an experimental rat model of infectious peritonitis. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 57, p. 919-922, 2005.

ALENCAR, N.M.; ASSREUY, A.M.; HAVT, A.; BENEVIDES, R.G.; DE MOURA, T.R.; DE SOUSA, R.B.; RIBEIRO, R.A.; CUNHA, F.Q.; CAVADA, B.S. *Vatairea macrocarpa* (Leguminosae) lectin activates cultured macrophages to release chemotactic mediators. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 374(4), p. 275-282, 2007.

ALENCAR, N.M.N.; ASSREUY, A.M.S.; ALENCAR, V.B.M.; MELO, S.C.; RAMOS, M.V.; CAVADA, B.S.; CUNHA, F.Q.; RIBEIRO, R.A. The galactosebinding lectin from *Vatairea macrocarpa* seeds induces in vivo neutrophil migration by indirect mechanism. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 35, p. 1674–1681, 2003.

ALMEIDA, A.C., SILVA, H.C., PEREIRA-JUNIOR, F.N., CAJAZEIRAS, J.B., DELATORRE, P., NAGANO, C.S., NASCIMENTO, K.S., CAVADA, B.S. Purification and partial characterization of a new mannose/glucose-specific lectin from *Centrolobium tomentosum* Guill. ex Benth seeds exhibiting low toxicity on *Artemia* spInt. **J. Indig. Med. Plants**, v. 47, p. 1567-1577, 2014.

ARARIPE, D. A.; PINTO-JÚNIOR, V.R.; NECO, A.H.B.; SANTIAGO, M.Q.; OSTERNE, V.J.S.; PIRES, A.F.; LÓSSIO, C.F.; MARTINS, G.Q.M.; CORREIA, J.L.A.; BENEVIDES, R.G.; LEAL, R.B.; ASSREUY, A.M.S.; NASCIMENTO, K. S.; CAVADA, B.S. Partial characterization and immobilization in CNBe-activated Sepharose of a native lectin from *Platypodium elegans* seeds (PELa) and comparative study of edematogenic effect with the recombinant from. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, p. 323-330, 2017.

ARAÚJO-FILHO, J.H.; VASCONCELOS, I.M.; MARTINS-MIRANDA, A.S.; GONDIM, D.M.; OLIVEIRA, J.T. A ConA-like lectin from *Dioclea guianensis* Benth. has antifungal activity against *Colletotrichum gloeosporioides*, unlike its homologues, ConM and ConA. **J Agric Food Chem**, v. 58(7), p. 4090-4096, 2010.

ASSREUY, A. M. S. ; MD, SHIBUYA ; GJ, MARTINS ; MLP, DE SOUZA ; BS, CAVADA ; RA, MOREIRA ; JA, OLIVEIRA ; RA, RIBEIRO ; CA, FLORES. Anti-inflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from Brazilian beans. **Mediators of Inflammation**, v. 6, p. 201-210, 1997.

ASSREUY, A.M.; FONTENELE, S.R.; PIRES, A.D.E.F.; FERNANDES, D.C.; RODRIGUES, N.V.; BEZERRA, E.H.; MOURA, T.R.; DO NASCIMENTO, K.S.; CAVADA, B.S. Vasodilator effects of Diocleinae lectins from the *Canavalia* genus. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 380(6), p. 509-521, 2009.

BARROSO, G.M.; PEIXOTO, A.L.; COSTA, C.G.; ICHASSO, C.L.F.; GUIMARÃES, E.F. & LIMA, H.C. *Sistemática das Angiospermas do Brasil*. v.2. Viçosa, Imprensa Universitária, 1991.

BELITZ, H.D. AND WEDER, J.K.P. Protein inhibitor of hidrolases in plant foodstuffs. **Food Rev. Int.**, v. 6, p. 151-211, 1990.

BENEVIDES, R. G. **Avaliação do Potencial Fungicida e Termiticida de uma Fração Protéica Lectínica de Sementes de *Platypodium elegans* Vogel e Obtenção da Lectina Purificada**. 151 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

BENEVIDES, R.G. **Caracterização bioquímica e estrutural de uma lectina recombinante de sementes de *Platypodium elegans* Vogel**. 2011. 292 p. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

BEZERRA, D. P.; LEITE, K. B.; NUNES, E. P.; MARINHO, E. S.; CAVADA, B. S. Purificação de uma lectina presente em sementes de *Machaerium acutifolium*. Anais da XXVI Reunião Nordestina de Botânica, In: **XXVI Reunião Nordestina de Botânica**, Fortaleza, 2003.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein-dye binding. **Anal. Biochem**, v. 72, p. 284-254. 1976.

BUTS, L.; GARCIA-PINO, A.; IMBERTY, A.; AMIOT, N.; BOONS, G. J.; BEECKMANS, S.; VERSÉES, W.; WYNS, L.; LORIS, R. Structural basis for the recognition of complex-type biantennary oligosaccharides by *Pterocarpus angolensis* lectin. **FEBS J**, v. 273(11), p. 2407-2420, 2006.

CALVETE, J. J.; SANTOS, C. F.; MANN, K.; GRANGEIRO, T. B.; NIMTZ, M.; URBANKE, C.; CAVADA, B. S. Amino acid sequence, glycan structure, and proteolytic processing of the lectin of *Vatairea macrocarpa* seeds. **FEBS Letters**, v. 425, p. 286-292, 1998.

CARBALLO, J.L.; HERNÁNDEZ-INDA, Z.L.; PÉREZ, P.; GARCÍA-GRÁVALOS, M.D. A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. **BMC Biotechnol.**, v. 2, p. 17–21, 2002.

CAVADA, B. S.; SANTOS, C. F.; GRANGEIRO, T. B.; NUNES, E. P.; SALES, P. V. P.; RAMOS, R. L. Purification and characterization of a lectin from seeds of *Vatairea macrocarpa* Ducke. **Phytochemistry**, v. 49, p. 675-680, 1998.

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. **Current Protein and Peptide Sciences**, v. 2, p. 123–135, 2001.

CAVADA, B. S. MORENO, F. B. B., ROCHA, B. A. M. da, AZEVEDO, J.R., W. F. de, CASTELLÓN, R. E. R., GOERSCH, G. V., NAGANO, C. S., SOUZA, E. P. de, NASCIMENTO, K. S., RADIS-BAPTISTA, G., DELATORRE, P., LEROY, Y., TOYAMA, M. H., PINTO, V. P. T., SAMPAIO, A. H., BARETTINO, D., DEBRAY, H., CALVETE, J. J. & SANZ, L. cDNA cloning and 1.75 Å crystal structure determination of PPL2, an endochitinase and N-acetylglucosaminebinding hemagglutinin from *Parkia platycephala* seeds. **FEBS Journal**, v. 273, p. 3962–3974, 2006.

CHACKO, B. K.; APPUKUTTAN, P. S. Peanut (*Arachis hypogaea*) lectin recognizes α -linked galactose, but not N-acetyl lactosamine in N-linked oligosaccharide terminals. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 28, p. 365-371, 2001.

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

DAM, T.K.; GERKEN, T.A.; CAVADA, B.S.; NASCIMENTO, K.S.; MOURA, T.R.; BREWER, C.F. Binding studies of alpha-GalNAc-specific lectins to the alpha-GalNAc (Tn-antigen) form of porcine submaxillary mucin and its smaller fragments. **The Journal Of Biological Chemistry**, v. 282, p. 28256–28263, 2007.

DAMICO, D. D. S., **Purificação, Propriedades Físico-Químicas e Estudos das Atividades Inseticidas, Fungicida e Citotóxica de uma lectina presente em sementes de *Koeleria paniculata***. Instituto de Biologia – (Dissertação de Mestrado) Departamento de Bioquímica, UNICAMP: 129 P, 2002.

DELATORRE, P.; ROCHA, B. A. M.; SOUZA, E. P.; OLIVEIRA, T.M.; BEZERRA, G.A.; MORENO, F.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.

DENNIS, J.W., GRANOVSKY, m., WARREN, C.E. Protein glycosylation in development and disease. **BioEssay**, v. 21, p. 412-421, 1999.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A., SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars, and related substances. **Anal. Chem**, v. 28, p 350-356, 1956.

ECHEMENDIA-BLANCO D, VAN DRIESSCHE E, NCUBE I, READ JS, BEECKMANS S. Stability, subunit interactions and carbohydrate-binding of the seed lectin from *Pterocarpus angolensis*. **Protein Pept Lett**, v. 16(9), p. 1120-1134, 2009.

ESFSTRAND, M., Uber blutkorperchenagglutinierende Eiweisse. In: Gorberdorfer Veroffentlichungen a. Band I., Kobert, R., Enke, Stuttgart, Germany, p. 1-159,1898.

FIGUEIREDO, J.G.; DA SILVEIRA BITENCOURT, F.; BESERRA, I.G.; TEIXEIRA, C.S.; LUZ, P.B.; BEZERRA, E.H.; MOTA, M.R.; ASSREUY, A.M.; DE QUEIROZ CUNHA, F.; CAVADA, B.S.; DE ALENCAR, N.M. Antinociceptive activity and toxicology of the lectin from *Canavalia boliviana* seeds in mice. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 380(5), p. 407-14, 2009.

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

GADELHA, C.A.; MORENO, F.B.; SANTI-GADELHA, T.; CAJAZEIRAS, J.B.; ROCHA, B.A.; ASSREUY, A.M., Native crystal structure of a nitric oxide-releasing lectin from the seeds of *Canavalia maritima*. **Journal Structural Biology**, v. 152, p. 185–194, 2005.

GARCIA-PINO, A.; BUTS, L.; WYNS, L.; IMBERTY, A.; LORIS, R. How a Plant Lectin Recognizes High Mannose Oligosaccharides. **Plant Biologists**. Vol. 144, 2007.

GARCIA-PINO, A.; BUTS, L.; WYNS, L.; LORIS, R. Interplay between metal binding and cis/trans isomerization in legume lectins: structural and thermodynamic study of

P. angolensis lectin. **J Mol Biol**, v. 361(1), p. 153-67, 2006.

GHAZARIAN, H.; IDONI, B.; OPPENHEIMER, S. B. A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. **Acta Histochemica**. v. 113, p. 236–247, 2011.

GOLDSTEIN IJ, HUGHES RC, MONSIGNY M, OSAWA T, SHARON N. What should be called a lectin?. **Nature**; 285:66, 1980.

GORELIK, E., GALILI, U., RAZ, A. On the role of cell surfacecarbohydrates and their binding proteins (lectins) in tumor metastasis. **Cancer Metastasis Rev**, v. 20, p. 245–77, 2001.

HAMELRYCK, T.W.; LORIS, R.; BOUCKAERT, J.; WYNS, L. Properties and structure of the legume lectin family. **Trends in Glycoscience and Glycobiology**, v. 10, p. 349-404, 1998.

HOFF, P. L., LAURENCE, M.B., HIRSCH M.B., Plant lectins: the ties that bind in root symbiosis and plant defence. University of California. **Mol Genet Genomics**, v. 282, p. 1-15, 2009.

HO, J.C.; CHEN, C.M.; ROW, L.C. Oleanane-type triterpenes from the flowers, pith, leaves, and fruit of *Tetrapanax papyrifera*. **Phytochemistry**, v. 68, p. 631–635, 2007.

JACK, D. L., TURNER, M. W., Anti-microbial activities of mannose-binding lectin. **Biochem soc trans**. Aug, v. 31, p. 753-757, 2003.

JOUBERT, F. J.; SHARON, N.; MERRIFIELD, E. H. Purification and properties of a lectin from *Lonchocarpus capassa* (apple-leaf) seed. **Phytochemistry**, 1986.

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

LANDSTEINER, K. & RAUBISTSCHKEK, H. Beobachtungen über hamolyse und hamagglutination. **Zentralblatt für Bakteriologie Parasitenkunde Infektionskrankheiten und Hygiene**, v. 45, p. 660-67, 1908.

LEI, H.Y. AND CHANG, C. P. Lectin of *Concanavalin A* as an anti-hepatoma therapeutic agent. **Journal of Biomedical Science**, v. 16, n. 10, p. 1-12, 2009.

LEWIS, G. P. B.; SCHRIRE, B.; MACKINDER & M. LOCK. Legumes of the world. **Royal Botanical Gardens**, Kew, 2005.

LIU, B; LI CY; BIAN HJ; MIN MW, CHEN LF, BAO JK. Antiproliferative activity and apoptosis-inducing mechanism of Concanavalin A on human melanoma A375 cells. **Arch Biochem Biophys**, v. 482(1-2), p. 1-6, 2009.

LORIS, R.; HAMELRYCK, T.; BOUCKAERT, J.; WYNS, L. Legume lectin structure. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1383, p. 9-36, 1998.

LORIS, R.; IMBERTY, A.; BEECKMANS, S.; VAN DRIESSE, E.; READ, J. S.; BOUCKAERT, J.; DE GREVE, H.; BUTS, L.; WYNS, L. Crystal structure of Pterocarpus angolensis lectin in complex with glucose, sucrose and turanose. **J. Biol. Chem**, v. 278, p. 16297-16303, 2003.

LOSSIO, C. F.; DA SILVA, M. T. L.; BARBOSA, L. M.; MOREIRA, C. L.; MIGUEL, T. B. A. R.; DO NASCIMENTO, A. S. F.; DA SILVA, I. B.; NASCIMENTO, K. S.; CAVADA, B.S. Isolation, purification and partial physicochemical characterization of a lectin in *Andira pisonis*. **Mart seed. BMC Proc.**, v. 8, suppl. 4, p. 226, 2014.

MACEDO, M.L.R.; FREIRE, M.G.M.; SILVA, M.B.R.; COELHO, L.C.B.B. Insecticidal action of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotes fubsasciatus* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Pruchidae). **Comp. Biochem. Physiol**, v. 146, p. 486–498, 2007.

MANN, K., FARIAS, C.M.S.A., GALLEGU DEL SOL, F., SANTOS, C.F., GRANGEIRO, T. B., NAGANO, C. S., CAVADA, B. S., CALVETE, J. J. The amino-

acid sequence of the glucose/ mannose-specific lectin isolated from *Parkia platycephala* seeds reveal three tandemly arranged jacalin related domains. **Eur. J. Biochem**, v. 218, p. 4414-4422, 2001.

MARONDEDZE, C., CHIDZWONDO, F., SITHOLE-NIANG, I., READ, J. S. *Pterocarpus rotundifolius* lectin gene. Submitted to the EMBL/GenBank/DDBJ databases, 2004.

MARTINS, A. M. C.; MONTEIRO, A. M. O.; HAVT, A.; BARBOSA, P. S. F.; SOARES, T. F.; EVANGELISTA, J. S. A. M.; MENEZES, D. B. DE.; FONTELES, M. C.; TEIXEIRA, E. H.; PINTO, V. P. T.; NASCIMENTO, K. S.; ALENCAR, N. M. N.; CAVADA, B. S.; AND MONTEIRO, H. S. A. Renal effects induced by the lectin from *Vatairea macrocarpa* seeds. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 57, p. 1329-1333, 2005.

MARTIUS, C.; EICHLER, A.G.; URBAN, I.; *Flora Brasiliensis*, vol. 15(1): fascicle 29, t. 72, 1862.

MOREIRA, R.A.; CAVADA, B.S.; OLIVEIRA, J.T.A.; AINOUIZ, I.L. Plant Lectins. In *Brazilian Congress on ProteinS*, 1st, Proceedings. Campinas, UNICAMP, p. 77-96, 1991.

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

NAPIMOGA, M. H.; CAVADA, B. S.; ALENCAR, N. M.; MOTA, M. L.; BITTENCOURT, F. S.; ALVES-FILHO, J. C.; GRESPAN, R.; GONÇALVES, R. B.; CLEMENTE NAPIMOGA, J. T.; DE FREITAS, A.; PARADA, C. A.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. *Lonchocarpus sericeus* lectin decreases leukocyte migration and mechanical hypernociception by inhibiting cytokine and chemokines production. **International Immunopharmacology**, v. 7, n. 6, p. 824–835, 2007.

NASCIMENTO, K. S.; NASCIMENTO, F. L.; SILVA, M. T.; NOBRE, C. B.; MOREIRA, C. G.; BRIZENO, L. A.; DA PONTE, E. L.; ASSREUY, A. M.; CAVADA, B. S.

Purification of a thermostable antinociceptive lectin isolated from *Andira anthelmia*. **J. Mol. Recognit**, v. 29(6), p. 248-252, 2016.

NOBRE, C. B. **Caracterização físico-química e efeito sobre bactérias orais de uma lectina de sementes de *Andira surinamensis* (Bondt) Splitg. Ex Amshoff**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

NUNES, B.S.; RENSONNET, N.S.; DAL-SECCO, D.; VIEIRA, S.M.; CAVADA, B.S.; TEIXEIRA, E.H.; MOURA, T.R.; TEIXEIRA, C.S.; CLEMENTE-NAPIMOGA, J.T.; CUNHA, F.Q.; NAPIMOGA, M.H. Lectin extracted from *Canavalia grandiflora* seeds presents potential anti-inflammatory and analgesic effects. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 379(6), p. 609-616, 2009.

OSTERNE, V.J.S.; SANTIAGO, M.Q.; PINTO-JÚNIOR, V.R.; CAJAZEIRAS, J.B.; CORREIA, J.L.; LEITÃO, C.C.; CARNEIRO, R.F.; PEREIRA-JÚNIOR, F.N.; VASCONCELOS, M.A.; ROCHA, B.A.; ASSREUY, A.M.; BRINGEL, P.H.; NAGANO, .C.S.; NASCIMENTO, K.S.; CAVADA, B.S. Purification, partial characterization, and CNBr-sepharose immobilization of a vasorelaxant glucose/mannose lectin from *Canavalia virosa* seeds. **Appl. Biochem. Biotechnol**, v. 172, p. 3342-3353, 2014.

PEREIRA-JÚNIOR, F. N. **Purificação, caracterização parcial e cristalização de uma lectina ligante de manose/N-acetil-D-glicosamina das sementes de *Platymiscium floribundum* VOGEL**. 2011. 78 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

PEREIRA-JÚNIOR, F. N.; Purification and characterization of a mannose/N-acetyl-D-glucosamine-specific lectin from the seeds *Platymiscium floribundum* Vogel. **Journal of Molecular Recognition**, v.25, p. 443-449, 2014.

PERSOONE, G. The Brine Shrimp *Artemia*: Proceedings of the International Symposium on the Brine Shrimp *Artemia* Salin. **Universa Press: Corpus Christi**, 1979.

PERVIN, F.; HOSSAIN, M.M.; KHATUN, S.; SIDDIQUE, S.P.; SALAM, K.A.; KARIM, M.R.; ABSAR, N. Comparative cytotoxicity study of six bioactive lectins purified from pondweed (*Potamogeton nodosus* Poir) rootstock on Brine Shrimp. **J. Med. Sci.**, v. 6, p. 999–1002, 2006.

PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E. J. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**, v. 109, p. 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**, v. 491, p. 27-54, 2001.

PINTO-JUNIOR, V.R.; CORREIA, J.L.; PEREIRA, R.I.; PEREIRA-JÚNIOR, F.N.; SANTIAGO, M.Q.; OSTERNE, V.J.; MADEIRA, J.C.; CAJAZEIRAS, J.B.; NAGANO, C.S.; DELATORRE, P.; ASSREURY, A.M.; NASCIMENTO, K.S.; CAVADA, B.S. Purification and molecular characterization of a novel mannospecific lectin from *Dioclea reflexa* hook seeds with inflammatory activity. **J. Mol. Recognit.**, (Epub), 2015.

PIRES, A. F.; RODRIGUES, N. V. F. C.; SIQUEIRA, R. C. L.; SILVA, M. S. J.; MARINHO, M. M.; CAVADA, B. S.; ALENCAR, N. M. N.; ASSREUY, A. M. S. Atividade antiinflamatória da lectina de sementes de *Lonchocarpus araripensis*. In: **Reunião Regional Fesbe**, 3, Fortaleza, CE, 2008.

RAMOS, M.V.; BOMFIM, L.R.; CAVADA, B.S.; ALENCAR, N.M.N.; GRANGEIRO, T.B.; DEBRAY, H. Further characterization of the glycan-binding specificity of the seed lectin from *Vaitarea macrocarpa* and its dependence of pH. **Protein Peptide Letters**, v. 7, p. 241–248, 2000.

RANGEL, T. B. A.; DE CARVALHO, A. U.; NASCIMENTO, K. S.; CAVADA, B. S.; FERNANDES, P. M. B. Isolamento e caracterização parcial de lectina proveniente de sementes da espécie vegetal *Andira fraxinifolia* (Leguminosae-Fabaceae). **Anais/Resumos da 61ª Reunião Anual da SBPC**, issn 2176-1221, 2009.

ROOPASHREE, S., SINGH S. A., GOWDA, L.R & RAO A. G.A., Dual-function protein in plant defence: seed lectin from *Dolichos biflorus* (horse gram) exhibits lipoxygenase activity. **Biochem. J**, v. 395, p. 629-639, 2006.

SINGH, R.; DAS, H. R. Purification of lectins from the stems of peanut plants. **Glycoconjugate Journal**, v. 11, p. 282-285, 1994.

SWANSON, M.D., WINTER, H. C. GOLDSTEIN, I. J., & MARKOVITZ, D. M. A., Lectin Isolated from Bananas Is a Potent Inhibitor of HIV Replication. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285(12), p. 8646-8655, 2010.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from haemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v. 14(11), p. 53–62. 2004.

SHARON N, LIS H. Lectins, 2nd edn. **Dordrecht: Kluwer Academic Publishers**, 2003.

SHARON, N. & LIS, H. Legume Lectins – A large family of homologous proteins. **In FASEB Journal**, v. 4, p. 3198-3208, 1990.

SILVA, H. C.; NAGANO, C.S.; SOUZA, L.A.G.; NASCIMENTO, K.S.; ISÍDRO, R.; DELATORRE, P.; ROCHA, B.A.M.; SAMPAIO, A.H.; ASSREUY, A.M.S.; PIRES, A.F.; DAMASCENO, L.E.A.; MARQUES-DOMINGOS, G.F.O.; CAVADA, B.S. Purification and primary structure determination of a galactose-specific lectin from *Vatairea guianensis* Aublet seeds that exhibits vasorlaxant effect. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 2347-2355, 2012.

SORGELOOS, P.; VAN DER WIELEN, C.R.; PERSOONE, G. The use of artemia nauplii for toxicity tests-A critical analysis. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 2, p. 249–255, 1978.

SRINIVAS, VR., REDDY, GB., AHMAD, N., SWAMINATHAN, CP., MITRA. N. & SUROLIA, A. Legume lectin family, the “natural mutants of the quaternary state”, provide insights into the relationship between protein stability and oligomerization.

Biochimica et Biophysica Acta, v. 1527, p. 102–111, 2001.

STILLMARK, H. **Über Ricin ein giftiges Ferment aus den Samen von *Ricinus communis* L. Und einiger anderem Euphorbiaceen.** Inaugural Dissertation Dorpat, Tartu, 1888.

VAN PARIJS, J.; BROEKAERT, W.F.; GOLDSTEIN, I.J. & PEUMANS, W.J. Hevein: An antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. *Planta*, v. 183, p. 258-264, 1991.

VAN DAMME, E.J.M.; BRIKÉ, F.; WINTER, H.C.; VAN LEUVEN, F.; GOLDSTEIN, I.J. AND PEUMANS, W.J. Molecular cloning of two different mannose-binding lectins from tulip bulbs. **European journal of biochemistry**, v. 236, p. 419-427, 1996.

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

VASCONCELOS, M.A.; ALVES, A.C.; CARNEIRO, R.F.; DIAS, A.H.S.; MARTINS, F.W.V.; CAJAZEIRAS, J.B.; NAGANO, C.S.; TEIXEIRA, E.H.; DO NASCIMENTO, K.S.; CAVADA, B.S. Purification and primary structure of a novel mannose-specific lectin from *Centrolobium microchaete* Mart seeds. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 81, p. 600-607, 2015.

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

ZANETTI, G.D. Lectinas dos Rizomas de *Arundo donax* L. **Purificação, Propriedades, Imuno-histoquímica e separação das isoformas.** Tese (Doutorado em Ciências Biológicas- Botânica). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.