



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

MISRAEL VIEIRA SALES

**BASES ESTRUTURAIS DA INTERAÇÃO DA LECTINA DE *Canavalia brasiliensis*
Mart. ex Benth. (ConBr) COM O FITOHORMÔNIO ÁCIDO INDOLE-3-ACÉTICO**

FORTALEZA

2019

MISRAEL VIEIRA SALES

BASES ESTRUTURAIS DA INTERAÇÃO DA LECTINA DE *Canavalia brasiliensis* Mart.
ex Benth. (ConBr) COM O FITOHORMÔNIO ÁCIDO INDOLE-3-ACÉTICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha.

Co-orientadora: Profa. Dra. Cristina Paiva da Silveira Paiva.

FORTALEZA

2019

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)

- S155b Sales, Misrael Vieira.
Bases estruturais da interação da lectina de *Canavalia brasiliensis* Mart. ex Benth. (ConBr) com o fitohormônio ácido indole-3-acético / Misrael Vieira Sales. – 2019.
80 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2019.
Orientação: Prof. Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha.
Coorientação: Profª. Dra. Cristina Paiva da Silveira Paiva.
1. Lectina. 2. *Canavalia brasiliensis*. 3. Auxinas. I. Título.

CDD 572

MISRAEL VIEIRA SALES

BASES ESTRUTURAIS DA INTERAÇÃO DA LECTINA DE *Canavalia brasiliensis* Mart.
ex Benth. (ConBr) COM O FITOHORMÔNIO ÁCIDO INDOLE-3-ACÉTICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Aprovada em: 27/02/2019

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Celso Shiniti Nagano
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Bruno Lopes de Sousa
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

A Deus.

Aos meus pais, Antônia e Manoel

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por todas as bênçãos concedidas durante toda minha vida. Tenho certeza que sempre iluminou meus caminhos e me direcionou para boas escolhas, me mantendo com fé, saúde e na esperança de um bom futuro. Sei que estará sempre ao meu lado e por isso nunca desistirei dos meus sonhos.

Aos meus maravilhosos pais, Antônia e Manoel, por todo amor, cuidado, educação, compreensão, princípios ensinados e apoio incondicional. Sou e sempre serei muito grato por tudo que sempre fizeram por mim. Tenho a certeza de que fariam tudo para me ver feliz e por eles lutarei sempre.

À minha querida irmã, Michelle: você sempre me apoiou, incentivou e acreditou no meu potencial. Todo apoio vindo de você foi extremamente importante.

Ao meu Orientador, Prof. Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha, por ter sido tão receptivo quando o procurei para orientação. Por toda atenção, paciência, compreensão, confiança e ensinamentos dados. Sua ajuda e incentivo foram essenciais para realização deste trabalho. Muito obrigado.

À minha Co-orientadora, Profa. Dra. Cristina Paiva da Silveira Carvalho, por me receber tão bem no laboratório o qual trabalha e por sua disponibilidade. Pela paciência, confiança e conhecimentos transmitidos.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Bruno Lopes de Sousa e Prof. Dr. Geancarlo Zanatta, por toda atenção e conhecimentos transmitidos.

Aos professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, por todos os ensinamentos transmitidos, os quais foram essenciais durante o curso de mestrado.

Aos professores de graduação do curso de Biotecnologia, pela dedicação e ensinamentos transmitidos, que me possibilitaram ter um grande aprendizado.

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Isabel e Emanuel pela amizade, apoio, incentivo, conhecimentos transmitidos e pelos momentos de alegria que vivemos.

Ao Dr. Eduardo Salviano, pela ajuda intelectual e excelentes conselhos nos momentos de dúvidas e dificuldades durante o mestrado. Sendo extremamente importantes para a conclusão desta dissertação.

Aos colegas do Laboratório de Biocristalografia, Jucilene, Cássia, Will, Renally, Leonardo, Handerson, Dayara, Gabriel, Matheus, Mari, Pedro pela amizade, pelo bom convívio, pela ajuda nos momentos difíceis e auxílio nas atividades, pelo apoio e troca de conhecimentos. Foi muito bom poder fazer parte desse Grupo.

Aos meus colegas de mestrado, em especial Danilo, Lyndefania, Larissa, João Pedro, Pedro, Leonardo e Jackson pela ajuda durante os momentos mais complicados, pela companhia e parceria nas aulas e atividades, pelas dicas e ensinamentos compartilhados, por todo o apoio e pelos momentos de diversão e descontração.

Aos meus queridos amigos: Bruno Burnier, Nadine, Aniele, Mayara, Adriane, Lucas, Gustavo que acompanharam muitos momentos importantes da minha vida. Pela amizade, confiança, apoio, conselhos, incentivo, por todos os incríveis momentos que já vivemos juntos. Levarei vocês para sempre comigo.

À Universidade Federal do Ceará, pela oportunidade de cursar uma graduação e seguir para um curso de mestrado, adquirindo muito aprendizado durante anos, contribuindo para o meu crescimento pessoal e profissional.

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudos durante o curso de mestrado.

A todos que contribuíram de alguma forma para realização deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – (Brasil) CAPES – Código de Financiamento 001.

“São as nossas escolhas, mais do que as nossas capacidades, que mostram quem realmente somos. ”

(Alvo Dumbledore)

RESUMO

Lectinas são proteínas, amplamente distribuídas na natureza, que reconhecem e ligam-se especificamente a estruturas particulares de carboidratos. A maioria de suas propriedades biológicas estão relacionadas a capacidade de interagir com sacarídeos na superfície celular, entretanto, diversas evidências demonstram que tais proteínas apresentam afinidade por outros compostos, principalmente, moléculas hidrofóbicas, como fitohormônios, que desempenham um papel fisiológico importante na planta. Nesse contexto, a construção desse trabalho surgiu diante da necessidade investigar a interação estrutural da lectina de sementes de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) com a molécula da auxina ácido indol-3-acético (AIA). Para tanto a lectina ConBr foi co-cristalizada com o AIA pelo método de difusão à vapor a 18 °C e avaliado a estabilidade estrutural dos complexos proteína/ligante pelo método thermofluor. A estrutura cristalográfica da ConBr complexada com o ácido indole-3-acético, foi resolvida com uma resolução de 2,2 Å. O refinamento satisfatório apresentou um “R_{factor}” de 0,191 e um “R_{free}” de 0,236. A qualidade estereoquímica da estrutura foi comprovada a partir do gráfico de Ramachandran, mostrando que nenhum resíduo estava em regiões não permitidas. Foi verificado que o AIA interage por ligações de hidrogênio com os resíduos Ser108 e Asn131 na cavidade central da estrutura do tetrâmero da ConBr. O ensaio de thermoflour mostrou que as auxinas contribuem para um incremento na estabilidade estrutural da ConBr em altas concentrações. Assim, conclui-se que o sítio de interação da ConBr com o AIA é conservado ao comparar com a lectina de *Canavalia marítima*, mas o posicionamento dos grupos indóis das moléculas do AIA na estrutura da ConBr impossibilita o empilhamento de interações hidrofóbicas entre os anéis da auxina. Além disso, evidências mostram que as auxinas AIA, ácido indol butírico (AIB) e 2,4 diclorofenoxiacético (2,4D) apresentam uma afinidade baixa para ConBr.

Palavras-chave: Lectina. *Canavalia brasiliensis*. Auxinas

ABSTRACT

Lectins are proteins, widely distributed in nature, that recognize and specifically bind to particular carbohydrate structures. Most of their biological properties are related to their ability to interact with saccharides on the cell surface. However, several evidences show that these proteins have affinity for other compounds, mainly hydrophobic molecules, such as phytohormones, which play an important physiological role in the plant. In this context, the construction of this work arose due to the need to investigate the structural interaction of *Canavalia brasiliensis* (ConBr) seed lectin with the indole-3-acetic acid auxin molecule (AIA). For this, ConBr lectin was co-crystallized with AIA by the steam diffusion method at 18 °C and the structural stability of the protein / ligand complexes was evaluated by the thermofluor method. The crystallographic structure of ConBr complexed with indole-3-acetic acid was resolved with a resolution of 2.2 Å. Satisfactory refinement had an R_{factor} of 0.191 and an R_{free} of 0.236. The stereochemical quality of the structure was proven from the Ramachandran chart, showing that no residue was in non-permitted regions. AIA has been found to interact by hydrogen bonding with Ser108 and Asn131 residues in the central cavity of the ConBr tetramer structure. The thermofluor test showed that auxins contribute to an increase in ConBr structural stability at high concentrations. Thus, it can be concluded that the interaction site of ConBr with AIA is conserved when compared with *Canavalia maritima* lectin, but the positioning of the indole groups of AIA molecules in the ConBr structure makes it impossible to stack hydrophobic interactions between the rings. auxin. In addition, evidence shows that auxins AIA, indole butyric acid (IBA) and 2,4 dichlorophenoxyacetic acid (2,4D) have a low affinity for ConBr.

Keywords: Lectin. *Canavalia brasiliensis*. Auxins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Número de artigos publicados nos últimos 20 anos (1968 – 2018) relacionados com o tema lectina	15
Figura 2	– Categorização estrutural das lectinas vegetais	18
Figura 3	– Número de artigos publicados nos últimos 20 anos (1968 – 2018) relacionados com o tema lectinas de plantas	21
Figura 4	– Esquema ilustrativo da arquitetura do motivo tipo <i>Jelly-roll</i>	24
Figura 5	– Tipos de interface formados durante a oligomerização de lectinas Leguminosas	25
Figura 6	– Representação dos cinco tipos de associações de tetrâmeros entre lectinas de leguminosas	26
Figura 7	– Disposição dos íons Ca^{2+} e Mn^{2+} na estrutura das lectinas da família de leguminosas	27
Figura 8	– Representação esquemática da biossíntese, modificações co- e pós-translacional, e topogênese de lectinas de leguminosas	29
Figura 9	– <i>Canavalia brasiliensis</i> Mart. ex Benth.	30
Figura 10	– Estrutura tridimensional da lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i> (ConBr)	31
Figura 11	– Interação de lectinas de leguminosas com moléculas hidrofóbicas	34
Figura 12	– Estrutura das auxinas	37
Figura 13	– Esquema ilustrativo para a determinação da atividade hemaglutinante para a lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i> (ConBr)	41
Figura 14	– Gráfico ilustrativo do ensaio de fluorimetria (Thermofluor)	45
Figura 15	– Purificação da lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i> (ConBr)	47
Figura 16	– Fotografia do cristal da lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i> (ConBr)	49
Figura 17	– Gráfico de Ramachandran das coordenadas da lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i> complexada ao ácido indole-3-acético	51

Figura 18 – Estrutura geral no monômero da lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i> em complexo com o ácido indole-3-acético	53
Figura 19 – Visão geral da estrutura dimérica e tetramérica da lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i> em complexo ácido indole-3-acético	53
Figura 20 – Modelo tetrâmero da lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i> (a) e <i>Canavalia maritima</i> (b) complexadas ao ácido indole-3-acético (AIA)	55
Figura 21 – Sítio de ligação do ácido indole-3-acético (AIA)	56
Figura 22 – Determinação do parâmetro de concentração da lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i> com o corante SYBRO® Orange para o ensaio de thermofluor ..	57
Figura 23 – Temperatura de <i>melting</i> (T_m) da lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i> em diferentes tampões	61
Figura 24 – Dados normalizados das curvas de desnaturação térmica da lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i> na presença de auxinas	63
Figura 25 – (a) Temperatura de <i>melting</i> (T_m) e (b) Variação da temperatura de <i>melting</i> (ΔT_m) da lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i> na presença das auxinas	65
Figura 26 – Distância molecular em angstroms (Å) do anel aromático em relação a um grupo carboxila das auxinas	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Classificação das lectinas vegetais.....	22
Tabela 2	– Dados da Estação Experimental W01B-MX2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (Campinas, São Paulo, Brasil)	43
Tabela 3	– Proporção da quantidade de proteína em relação a quantidade do fluoróforo SYBRO <i>Orange</i> para o ensaio de thermofluor	44
Tabela 4	– Lista de tampões, pH e aditivos utilizados no <i>screens</i>	45
Tabela 5	– Estatísticas da coleta de dados de difração de Raios X da lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i> (ConBr) em complexo a auxina ácido indole-3-acético (AIA)	50
Tabela 6	– Distâncias em angstroms (Å) relativas entre os átomos que coordenam a molécula do ácido indole-3-acético em seu sítio de ligação na lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i>	56
Tabela 7	– Temperatura de <i>melting</i> (T_m) da lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i> (ConBr) em diferentes soluções tampões, a partir do ensaio thermofluor	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIA	ácido indol-3-acético
AIB	ácido indol-3-butírico
4-Cl-AIA	ácido 4-cloroindol-3-acético
PAA	ácido fenilacético
ANA	ácido 1-naftalenoacético
MCPA	ácido 2-metil-4-clorofenoxiacético
2,4D	ácido 2,4-diclorofenoxiacético
K_d	Constante de dissociação

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1	Lectinas	15
2.1.1	<i>Breve histórico</i>	15
2.1.2	<i>Definição e classificação</i>	17
2.1.3	<i>Aplicações biológicas</i>	19
2.1.4	<i>Lectinas vegetais</i>	20
2.1.5	<i>Lectinas de leguminosas</i>	23
2.1.5.1	<i>Aspecto estrutural das lectinas de leguminosas</i>	24
2.2	Genero Canavalia	28
2.2.1	<i>Canavalia brasiliensis Mart. ex Benth.</i>	29
2.3	Papel das lectinas em plantas	31
2.4	Interação de lectinas com moléculas hidrofóbicas	33
2.5	Hormônio vegetal	35
2.5.1	<i>Auxina</i>	36
3	OBJETIVOS	39
3.1	Objetivo geral	39
3.2	Objetivos específicos	39
4	MATERIAIS E METODOS	40
4.1	Purificação das lectinas	40
4.1.1	<i>Extração proteica</i>	40
4.1.2	<i>Cromatografia de afinidade em gel de Sephadex G-100</i>	40
4.2	Deteção da atividade hemaglutinante	41
4.3	Cristalografia de Raios X	42
4.3.1	<i>Cristalização da ConBr</i>	42
4.3.2	<i>Coleta de dados de difração de Raios X</i>	42
4.3.3	<i>Substituição molecular, refinamento e análise da estrutura da proteína</i>	43
4.4	Thermofluor	44
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1	Extração e purificação da ConBr	47
5.2	Estudos cristalográficos	48

5.2.1	<i>Cristalização e difração de Raios X</i>	48
5.2.2	<i>Estrutura geral do complexo de ConBr e AIA</i>	52
5.2.3	<i>Sítio de ligação ao AIA</i>	54
5.3	Ensaio Thermofluor	57
5.3.1	<i>Determinação da proporção SYBRO® Orange e ConBr</i>	57
5.3.2	<i>Determinação do tampão e aditivos para o ensaio do thermofluor</i>	58
5.3.3	<i>Influência de auxinas na estabilidade térmica da ConBr</i>	62
6	CONCLUSÃO	67
	REFERÊNCIAS	68

1 INTRODUÇÃO

As lectinas destacam-se na biotecnologia devido às suas inúmeras aplicações na da área bioquímica, biologia celular e molecular, imunologia, farmacologia, medicina e análises clínicas, além de usos em potencial (CAVADA et al., 2018; HASHIM; JAYAPALAN; LEE, 2017; COELHO et al., 2017). As lectinas são proteínas de origem não imune que interagem reversivelmente e especificamente por resíduos de mono- e oligossacarídeos, porém não apresentam atividade enzimática nesse domínio (PEUMANS; VAN DAMME, 1995).

Essas proteínas foram relatadas em diferentes organismos (VAN DAMME, 2014). Em relação as plantas, a família das leguminosas apresenta lectinas com alto grau de homologia e similaridade, contudo, pequenas alterações nas sequências de aminoácidos nas proteínas podem dar origem a variados modos de associações quaternárias (BRINDA; SUROLIA; VISHVESHWARA, 2005; MORENO et al., 2008; PEUMANS; VAN DAMME, 1995).

Lectinas de leguminosas podem interagir com outras moléculas, devido a presença de uma região estrutural hidrofóbica altamente conservada, podendo desempenhar um papel biológico importante na interação com moléculas hidrofóbicas (DELATORRE et al., 2007). A função ou funções biológica das lectinas em plantas é uma questão central que tem sido frequentemente questionada, mas ainda não foi definitivamente respondida (RUDIGER; GABIUS, 2001).

A lectina das sementes de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) possui afinidade com D-glicose/D-manose e compartilha especificidade primária de reconhecimento a carboidratos com outras lectinas de leguminosas (CAVADA et al., 2001). Diversas propriedades biológicas (BATISTA et al., 2018; BATISTA et al., 2017) e aplicações biotecnológicas (ABREU et al., 2017) da ConBr foram descritas na literatura. Em 2013, Delatorre e colaboradores relataram a estrutura de uma lectina do gênero *Canavalia* em complexo com AIA, supondo que a lectina controla a disponibilidade dessa auxina durante os estágios iniciais da planta. O AIA é um fitohormônio importante na regulação e desenvolvimento de plantas (TSAVKELOVA et al., 2012).

Nesse contexto, a construção desse trabalho surgiu diante da necessidade de averiguar a interação das lectinas com moléculas biologicamente importantes para a fisiologia das plantas. Investigando a interação estrutural da ConBr com a auxina AIA, desta forma, nos ajudar a compreender outras funções para lectinas vegetais, além daquelas relacionadas com sua capacidade de interagir com sacarídeos na superfície celular.

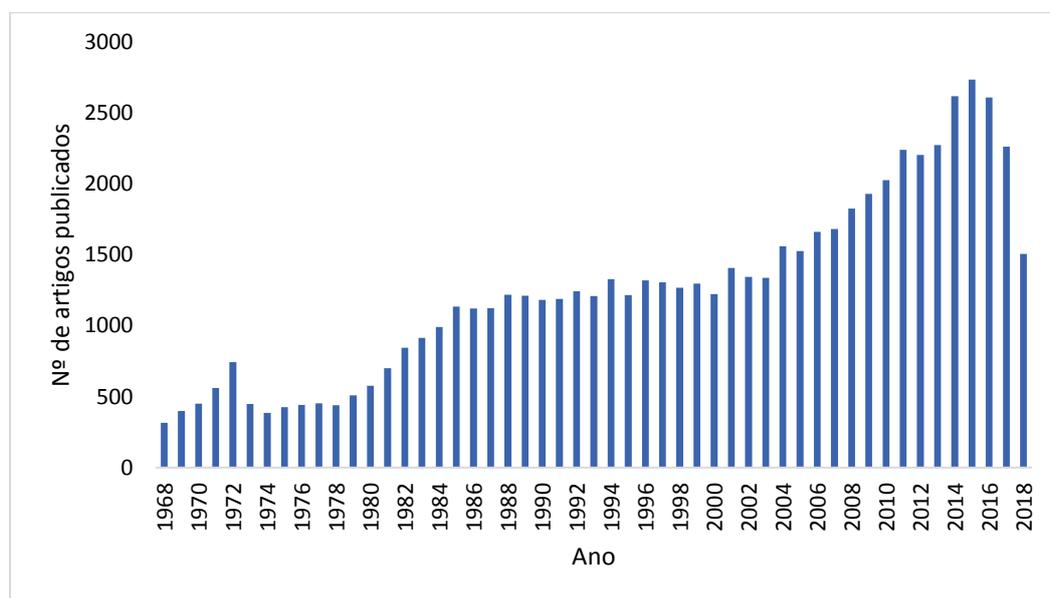
2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Lectinas

2.1.1 Breve histórico

O estudo sobre lectinas vem aumentando nos últimos 20 anos, refletindo diretamente no número de publicações em revista e periódicos nacionais e internacionais (Figura 1). Esse interesse parte do princípio da diversidade no uso das lectinas, como na detecção, isolamento e caracterização de oligossacarídeos, na tipagem sanguínea, na identificação de glicoconjugados e nas diversas interações com outras moléculas com importância biológica. Além disso, as lectinas são abundantes em vários organismos vivo, tornando-se, de certa forma, fácil de serem purificadas (GONDIM, 2014).

Figura 1 – Número de artigos publicados nos últimos 20 anos (1968 – 2018) relacionados com o tema lectina em revistas e periódicos nacionais e internacionais.



Os resultados foram obtidos da análise dos dados encontrados no website Scopus (www.scopus.com)

Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

O primeiro relato sobre lectinas ocorreu em 1860, quando Silas Weir Mitchell, em seus experimentos, observou que ao misturar uma gota do veneno da serpente *Crotalus durussius* à uma gota de sangue de *Columba livia* (pombo), este coagulava ligeiramente

(MITCHELL, 1860). No ano de 1888, Hermann Stilmark descreveu as propriedades de aglutinação em extratos das sementes de *Ricinus comunis* (mamona), denominando-se a substância responsável por essa atividade de Ricina (SHARON; LIS, 2004).

Em 1919, James Sumner, ao trabalhar com sementes de *Canavalia ensiformis* conseguiu isolar uma proteína da qual denominou de Concanavalina A (ConA), sendo este o primeiro relato de uma lectina pura. Porém, somente em 1936, Sumner e Howell demonstraram que a ConA aglutinava eritrócitos, mas também a hemaglutinação era inibida pela sacarose da cana-de-açúcar, preluindo a especificidade de uma lectina por açúcar (SHARON; LIS, 2004). Por volta de 1940, William C. Boyd e Karl O. Renkonen, descobriram que extratos brutos de *Phaseolus limensi* e *Vicia craca* aglutinavam os eritrócitos humanos com especificidade, exibindo uma preferência por eritrócitos de um grupo particular de tipo sanguíneo dentro do sistema ABO, onde essas hemácias respondiam ao contato com hemaglutininas de maneira distinta (VAN DAMME et al., 1998a).

Posteriormente, em 1952, mostrou-se que as propriedades hemaglutinantes das lectinas estavam baseadas na atividade específica de ligação a carboidratos (WATKINS; MORGAN, 1952). Só então em 1954, a habilidade das aglutininas de plantas em distinguir eritrócitos de diferentes tipos sanguíneos levou Boyd e Shapleigh a propor o termo lectina, do latim *legere*, que significar selecionar ou escolher, para nomear essas proteínas (SHARON; LIS, 2004).

Um marco na história moderna das lectinas ocorreu em 1960, quando Petter C. Nowell demonstrou que a lectina de *Phaseolus vulgaris* possui atividade mitogênica sobre linfócitos (SHARON; LIS, 2004). Outro fato importante na história das lectinas ocorreu 5 anos depois, em 1965, com a introdução da cromatografia de afinidade utilizando carboidratos imobilizados para o isolamento das lectinas de plantas refletindo em um rápido aumento no número dessas proteínas purificadas (SHARON, 2008).

Desde então, a ciência que estuda as lectinas vem crescendo constantemente à medida que novas lectinas com ampla especificidade, em suas ligações, são descobertas a partir de diversas fontes. Além disso, o avanço das metodologias e dos processos relacionados aos estudos com lectina, ajudaram a desvendar aspectos antes inexplorados na área, contribuindo para um potencial iminente no uso dessas proteínas nas distintas áreas da ciência (JOHN et al., 2013).

2.1.2 Definição e classificação

As lectinas são proteínas com características funcionais bem definidas, possuem origem não imune e têm especificidade por resíduos terminais e subterminais de carboidratos se ligando reversivelmente sem, no entanto, mostrar atividade enzimática nesse domínio (PEUMANS; VAN DAMME, 1995). As lectinas são proteínas globulares com um sítio de ligação a carboidratos que lhes permite reconhecer e ligar especificamente estruturas particulares de carboidratos. Deve-se enfatizar que a especificidade dos carboidratos das lectinas é altamente diversificada. Embora algumas lectinas reconheçam e interajam com monossacarídeos como manose, glicose, galactose, fucose, a maioria das lectinas se liga preferencialmente a oligossacarídeos mais complexos encontrados na superfície celular. (GHAZARIAN et al., 2011).

O local de ligação ao carboidrato tipicamente consiste em cinco a seis aminoácidos que ligam os resíduos de hidroxilas do açúcar. A interação específica entre a lectina e o carboidrato envolve a formação de uma rede de ligações de hidrogênio e, muitas vezes, reforçada por um empilhamento hidrofóbico do anel de piranose do açúcar ao anel aromático dos resíduos de aminoácidos aromáticos (tirosina, triptofano ou fenilalanina) localizado perto ao sítio de ligação à carboidratos (DEL CARMEN FERNÁNDEZ-ALONSO et al., 2012).

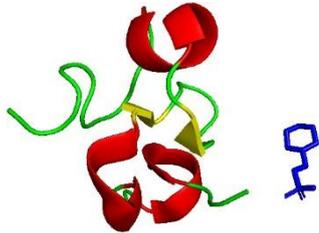
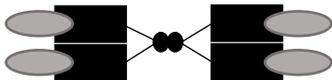
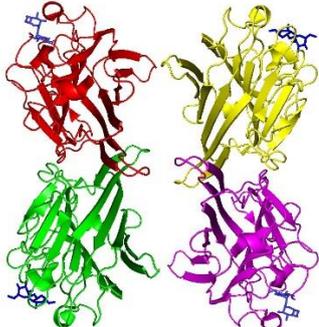
A afinidade das lectinas com seu substrato geralmente é bastante fraca quando comparada às interações antígeno-anticorpo ($K_d \sim 10^{-8}$ a 10^{-12} M). A afinidade de ligação de uma lectina em direção a monossacarídeos é tipicamente na ordem de aproximadamente 10^{-3} M (DUVERGER et al., 2003; LIS; SHARON, 1998). No entanto, deve-se enfatizar que a maioria das lectinas reconhece preferencialmente oligossacarídeos ou glicanos mais complexos por interações multivalentes, resultando em um aumento considerável da afinidade de ligação aos valores de K_d de 10^{-6} a 10^{-8} M (DUVERGER et al., 2003; LIANG et al., 2007).

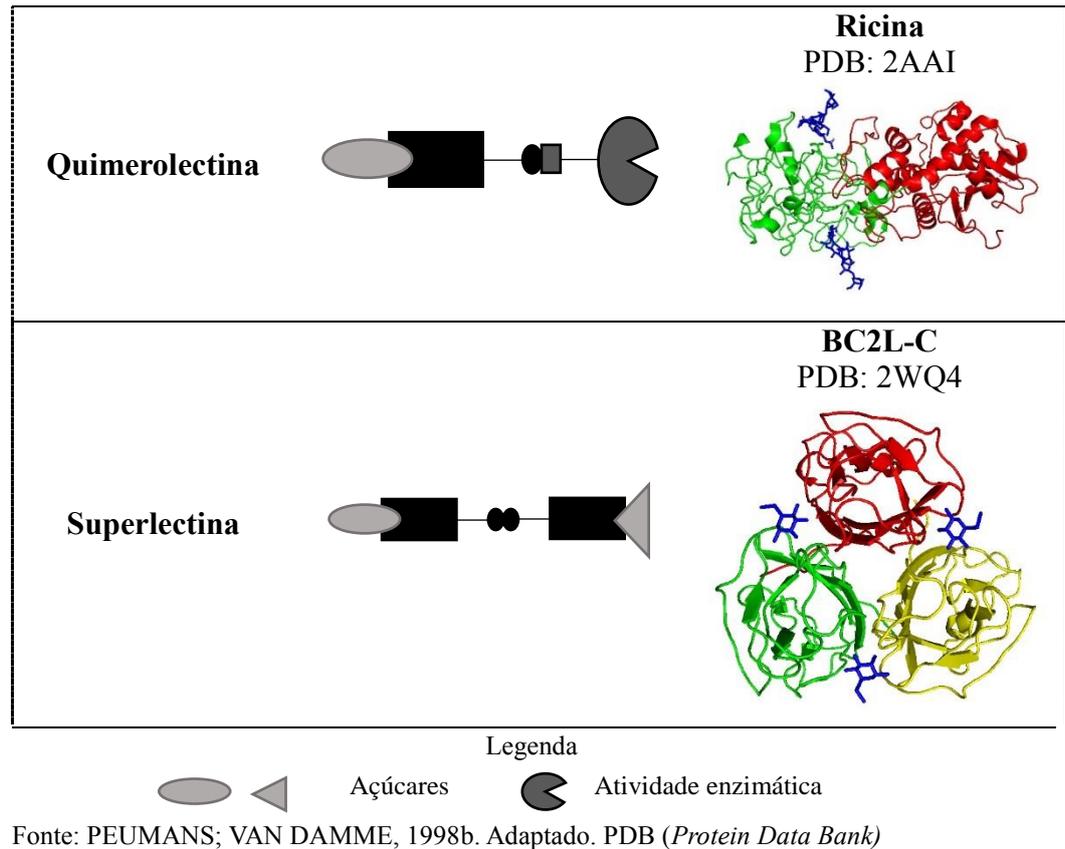
Baseado no conceito de lectinas proposto por Peumans e Van Damme em 1995, as lectinas vegetais podem ser estruturalmente categorizadas em merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas (Figura 2). Este conceito leva em consideração a presença ou não de sítios catalíticos de afinidade a carboidratos na própria molécula proteica, onde esta mesma molécula comportaria vários outros sítios de natureza não-catalítica.

As merolectinas são proteínas que contêm apenas um domínio de ligação a carboidratos. Devido à sua natureza monovalente, este grupo de lectinas não pode aglutinar células. As hololectinas são lectinas que são compostas de dois ou mais domínios de ligação de carboidratos idênticos ou muito homólogos, que lhes permitem aglutinar células e/ou precipitar

glicoconjugados. A maioria das lectinas vegetais atualmente isoladas e caracterizadas pertence ao grupo das hololectinas. Em contraste com este grupo de lectinas, as superlectinas são compostas por pelo menos dois domínios de ligação a carboidratos que reconhecem estruturas de carboidratos estruturalmente não relacionadas. O grupo de quimerolectinas compreende as lectinas que são compostas por um ou mais domínios de ligação a carboidratos fundidos a um domínio que exerce uma atividade biológica independente do domínio de ligação a carboidratos. Análises de sequências de genomas de plantas completas revelaram que as quimerolectinas são muito abundantes em plantas. Finalmente, as superlectinas são aquelas lectinas que se ligam pelo menos a dois tipos de carboidratos estruturalmente diferentes (VAN DAMME et al., 2008; PEUMANS; VAN DAMME, 1998b).

Figura 2 – Categorização estrutural das lectinas vegetais. Representação esquemática e exemplos de merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas depositados no Banco de Dados de Proteínas (PDB).

Classe	Representação	Exemplo
Merolectina		Heveina PDB: 4MPI 
Hololectina		ConA PDB: 2CY6 



2.1.3 Aplicações biológicas

As lectinas são ubíquas na natureza, distribuídas amplamente nos organismos, sendo encontradas em todas as classes e famílias dos organismos vivos (PEUMMANS; VAN DAMME, 1995). Embora a maioria das lectinas tenham sido caracterizadas a partir de plantas, essas proteínas também foram relatadas em animais, insetos, vírus, fungos e bactérias (VAN DAMME, 2014). Lectinas de diversas origens têm sido aplicadas em diversos modelos biológicos e apresentam as mais variadas utilizações. As funções fisiológicas atribuídas às lectinas estão relacionadas a sua localização tecidual, bem como, a existência de sítios de ligação à carboidratos específicos (SANTOS et al., 2014).

As lectinas destacam-se na biotecnologia devido às suas inúmeras aplicações e usos em potencial, principalmente devido à sua capacidade de se ligarem a glicoconjugados, desta forma, destacam-se como ferramentas importantes em pesquisas que abrangem diversas áreas da ciência, especialmente em bioquímica, biologia celular e molecular, imunologia, farmacologia, medicina e análises clínicas. As lectinas têm uma variedade de efeitos nas células, tais como aglutinação, estimulação mitogênica, redistribuição dos componentes da superfície celular, modificação da atividade das enzimas da membrana, inibição do crescimento bacteriano

e fúngico, agregação celular, toxicidade, imunomodulação, entre outros (KAUR et al., 2006; SITOHY; DOHEIM; BADR, 2007; LI et al., 2008; ARAUJO et al., 2013; SILVA et al., 2015; TAKAHASHI; KURODA; MUROGA, 2008).

Lectinas têm sido usadas para pesquisa de descoberta de biomarcadores de câncer e têm sido empregadas em diversas aplicações na citoquímica, histoquímica e imunohistoquímica para a detecção e caracterização de glicoconjugados em células humanas e animais e superfícies de tecido (BIELIK; ZAIA, 2010; SANTOS et al., 2014; HASHIM; JAYAPALAN; LEE, 2017) mas encontraram mais aplicações no campo de biossensores (PIHÍKOVÁ; KASÁK; TKAC, 2015; COELHO et al., 2017).

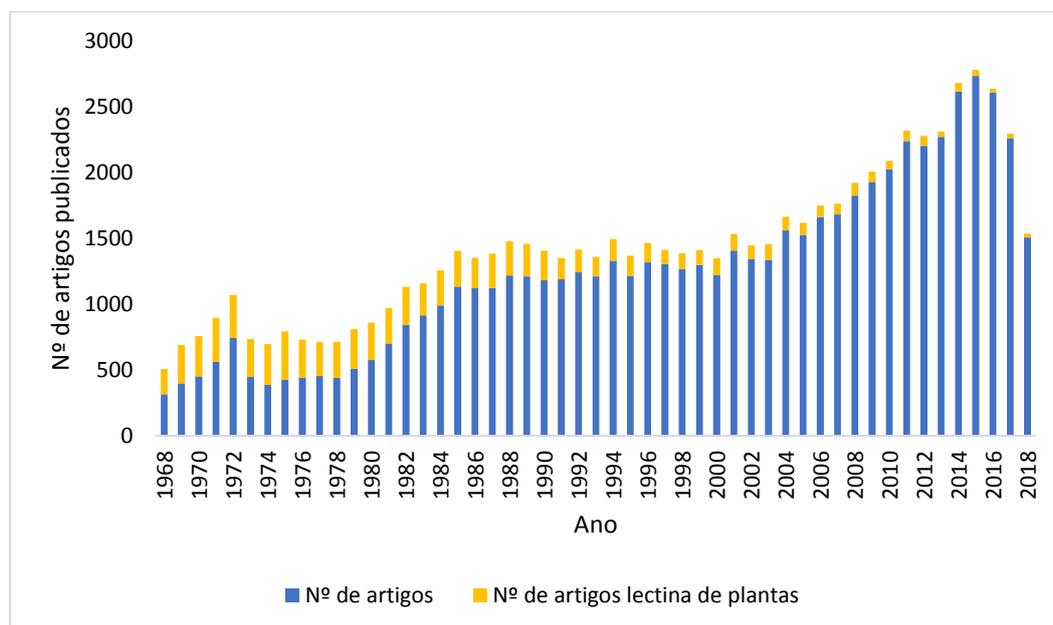
Outras aplicações, trazem o uso de lectinas para o direcionamento e entrega de medicamentos, levando em consideração a estrutura e especificidade ao carboidrato, determinam a endocitose desses medicamentos pelas células alvos (GABOR et al. 2004). Desta forma, a seleção de uma lectina adequada pode permitir que a absorção celular e subsequente encaminhamento intracelular, controlando desta forma o sistema de entrega. Espera-se que esta estratégia melhore a absorção e a biodisponibilidade de fármacos, peptídeos e proteínas pouco absorvíveis, bem como na terapia com DNA (BAWA; AUDETTE; RUBINSTEIN, 2016).

2.1.4 Lectinas vegetais

Nos vegetais, as lectinas têm sido encontradas desde organismos não vasculares, como as briófitas (MASUZAKI; HOSONO; NITTA, 2017) até os mais complexos, como as gimnospermas (SANTI-GADELHA et al., 2006) e angiospermas (BOBBILI et al., 2018; COSTA et al., 2010). A análise das sequências completas do genoma e dos dados de transcriptoma sugere que as lectinas são ubíquas no reino vegetal (VAN DAMME et al., 1998a, b) e provavelmente evoluíram como parte do repertório de defesa molecular contra pragas e herbívoros (LANNON; VAN DAMME, 2014; VAN DAMME, 2014; VANDENBORRE et al., 2011).

Diversas lectinas de plantas já foram identificadas, purificadas e pelo menos parcialmente caracterizadas (VAN DAMME et al., 1998a, b). Porém, ao analisar o número de publicações sobre lectinas, nos últimos 20 anos, observa-se um decréscimo no número de artigos relacionados a lectinas vegetais (Figura 3), provavelmente devido à diversidade de organismos dos quais as lectinas são encontradas. Mas também, essa informação mostra a necessidade de ampliar nossos conhecimentos sobre a área de lectinas de origem vegetal.

Figura 3 – Número de artigos publicados nos últimos 20 anos (1968 – 2018) relacionados com o tema lectina e lectinas de plantas em revistas e periódicos nacionais e internacionais.



Os resultados foram obtidos da análise dos dados encontrados no website Scopus (www.scopus.com).

Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

As lectinas de vegetais podem estar presentes nos mais diversos tecidos e órgãos da planta, tanto em cotilédones ou endospermas de sementes (correspondendo de 0,1 a 5% do total de proteínas nestes tecidos), quanto em tecidos vegetativos como folhas, cascas, bulbos, rizomas, raízes, flores, caule, frutos, floema, néctar e látex (VAN DAMME, 2008; DIAS et al., 2015). A vista disso, formam um grupo heterogêneo de glicoproteínas produzidas por diferentes espécies de plantas (LANNOO; VAN DAMME, 2014; VAN DAMME, 2014; VANDENBORRE et al., 2011).

Fisiologicamente, acredita-se que as lectinas vegetais atuam como: transportadores e armazenadores de carboidratos (NAKAMURA et al., 2002), ligação entre bactérias fixadoras de nitrogênio à raiz das plantas, inibição do crescimento de fungos, proteção das plantas contra ataques por insetos (WANG et al., 2000; VANDENBORRE; SMAGGHE; VAN DAMME, 2011) e regulação hormonal do crescimento e desenvolvimento das plantas entre outros (SANZ-APARICIO et al., 1997).

Diversas tentativas foram feitas para organizar este grupo muito heterogêneo de proteínas vegetais. Inicialmente, Van Damme e colaboradores (1998) classificaram as lectinas em vários grupos de especificidade, com base em sua capacidade de reconhecer e se ligar a

açúcares específicos. No entanto, tal classificação baseada na especificidade de ligação a carboidratos era superficial em relação às relações evolutivas entre as lectinas das plantas. Além disso, diferentes motivos de ligação à carboidratos podem reconhecer estruturas semelhantes de açúcar. Portanto, um novo sistema de classificação para lectinas de plantas, realizado por Van Damme e colaboradores (2008), levou em consideração todos os dados de sequência que se tornaram disponíveis nas últimas décadas. Análises completas do genoma/transcriptoma revelaram que as lectinas das plantas podem ser classificadas em doze famílias distintas de domínios de lectina evolutivos e estruturalmente relacionados.

Esses diferentes domínios de ligação a carboidratos são: (1) homólogos de aglutinina de *Agaricus bisporus*, (2) amarantinas, (3) homólogos de quitinase classe V, (4) família cianovirina, (5) família de aglutinina de *Euonymus europaeus*, (6) família de aglutinina de *Galanthus nivalis*, (7) proteínas com domínios heveínicos, (8) jacalinas, (9) proteínas com domínio lectina de leguminosa, (10) domínios LysM, (11) família aglutinina de *Nicotiana tabacum* e (12) família ricina-B (Tabela 1) (VAN DAMME et al., 2008).

Tabela 1 – Classificação das lectinas vegetais. Família e especificidade das lectinas de plantas em famílias levando em consideração aos domínios evolutivos e estruturalmente relacionados.

Família/Domínio	Especificidade
Aglutinina de <i>Agaricus bisporus</i>	Antígeno T
Amatantinas	Antígeno T
Homólogos de quitinase classe V	Grupo sanguíneo B, N-glicanos ricos em manose
Cianovirina	N-glicanos de alta-manose
Aglutininas de <i>Euonymus europaeus</i>	Grupo sanguíneo B, N-glicanos ricos em manose
Aglutininas de <i>Galanthus nivalis</i>	Man, oligomanosídeos, N-glicanos ricos em manose e complexos, N-glicanos
Haveínicos	Quitina, Man, N-glicanos, N-glicanos ricos em manose
Jacalinas	Gal, Antígeno T, Man, N-glicanos
Lectinas de leguminosas	Man/Glc, Gal/GalNAc, (GlcNAc) _n , Fuc, Sia α 2,3Gal/GalNAc, N-glicanos complexos
LysM	Quitina-oligossacarídeos
Aglutinina de <i>Nicotiana tabacum</i>	GlcNAc-oligômeros, N-glicanos ricos em manose
Ricina-B	Gal/GalNAc, Sia α 2–6Gal/GalNAc

Legenda: Antígeno T: Galb(1,3)GalNAc; Man: manose; Gal: galactose; Glc: glucose; GalNAc: N-acetilgalactosamina; GlcNAc: N-acetilglucosamina; Fuc: fucose; Sia: ácido siálico.

Fonte: VAN DAMME et al., 2008.

2.1.5 Lectinas de leguminosas

A família Leguminosae abrange cerca de 19.500 espécies e 770 gêneros, compondo um dos principais e maiores membros dos biomas terrestres, e está distribuída em todos os continentes, com exceção da Antártica (SCHRIRE; LAVIN; LEWIS, 2005; LPWG, 2013). No Brasil, esta família é a mais diversa, entre as angiospermas, com cerca de 220 gêneros e 2.800 espécies, das quais, mais da metade são endêmicas do país (BFG, 2015). Sendo a família com maior riqueza de espécies na Amazônia e na Caatinga, ficando em segundo lugar na Mata Atlântica, Cerrado e Pantanal (BFG, 2015).

O grupo das lectinas de leguminosas refere-se a uma família particular de lectinas de plantas estreitamente relacionadas, encontradas exclusivamente em vegetais pertencentes à família Leguminosae (VAN DAMME et al., 1998b). Em relação as plantas, a família das leguminosas tem sido as mais investigadas, quanto ao isolamento e caracterização de lectinas. Essa família apresenta lectinas com alto grau de homologia e similaridade (PEUMANS; VAN DAMME, 1995). Vale lembrar, que muito do conhecimento adquirido até o presente momento sobre as lectinas de um modo geral, provem de estudos realizados com membros dessa família de lectinas (LAGARDA-DIAZ; GUZMAN-PARTIDA; VAZQUEZ-MORENO, 2017; SHARON; LIS, 1990).

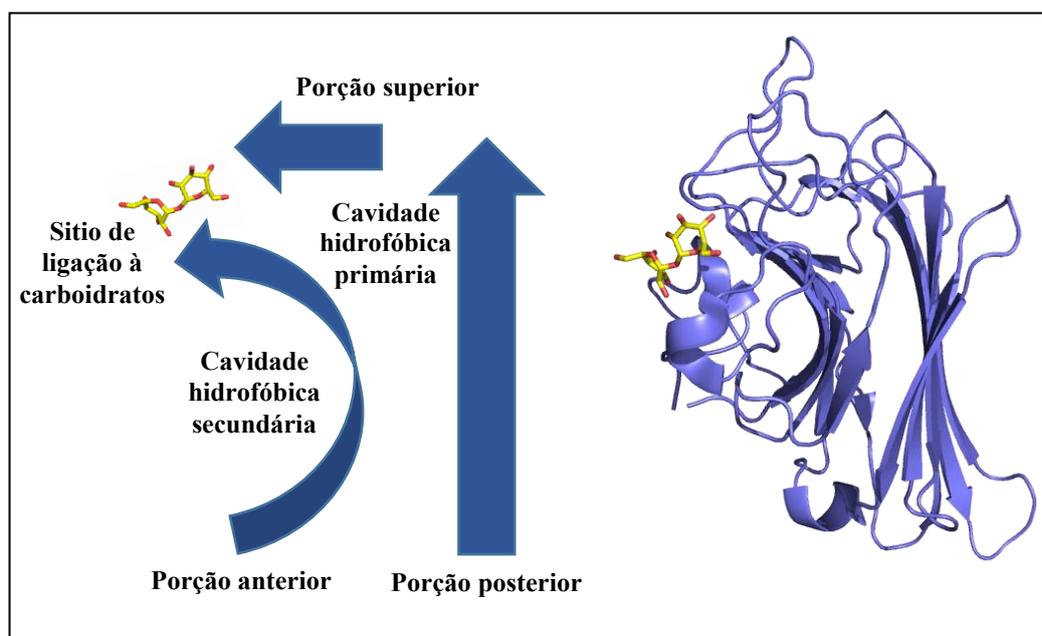
As lectinas de leguminosas possuem capacidade de interagir com açúcares simples e complexos (DAM; BRAWER, 2002). Essa interação depende, exclusivamente, de um sítio de ligação primário a carboidratos presente na superfície molecular da mesma. Esse sítio interage diretamente com um único açúcar simples, daí sua denominação. Diversos grupos de lectinas foram descritos quanto à especificado por monossacarídeos. Dentro das lectinas de leguminosas, os principais grupos de especificidade encontrados, de acordo com Rudiger (2008), são: manose, glicose e seus α -glicosídeos: galactose e N-acetilgalactosamina; N-acetilglucosamina; α -L-fucose e oligossacarídeos complexos.

2.1.5.1 Aspecto estrutural das lectinas de leguminosas

As lectinas de leguminosas são as mais bem estudadas estruturalmente entre todas as lectinas de plantas. Demonstram de forma surpreendente que pequenas alterações nas sequências de aminoácidos em subunidades das proteínas, com estruturas terciárias quase idênticas, podem dar origem a variados modos de associações quaternárias (BRINDA; SUROLIA; VISHVESHWARA, 2005; MORENO et al., 2008).

As lectinas de leguminosas apresentam-se de uma forma complexa e estruturalmente relacionadas com um motivo proteico chamado *Jelly-roll*, que por sua vez está intimamente relacionado ao processo de reconhecimento à carboidratos. Este dobramento da estrutura é encontrado em muitas outras estruturas de proteínas (LORIS, 2002). O motivo *Jelly-roll* foi primeiramente observado na lectina Concanavalina A (ConA), ele é composto de duas folhas- β dispostas paralelamente, uma anterior com seis fitas e uma dianteira com sete fitas, juntamente com uma pequena folha- β com cinco fitas dispostas sob as outras duas, onde dois núcleos hidrofóbicos estabilizam esta dobra. Toda conectadas por diversos *loops* de vários tamanhos (Figura 4) (BANERJEE et al., 1996).

Figura 4 – Esquema ilustrativo da arquitetura do motivo tipo *Jelly-roll*.

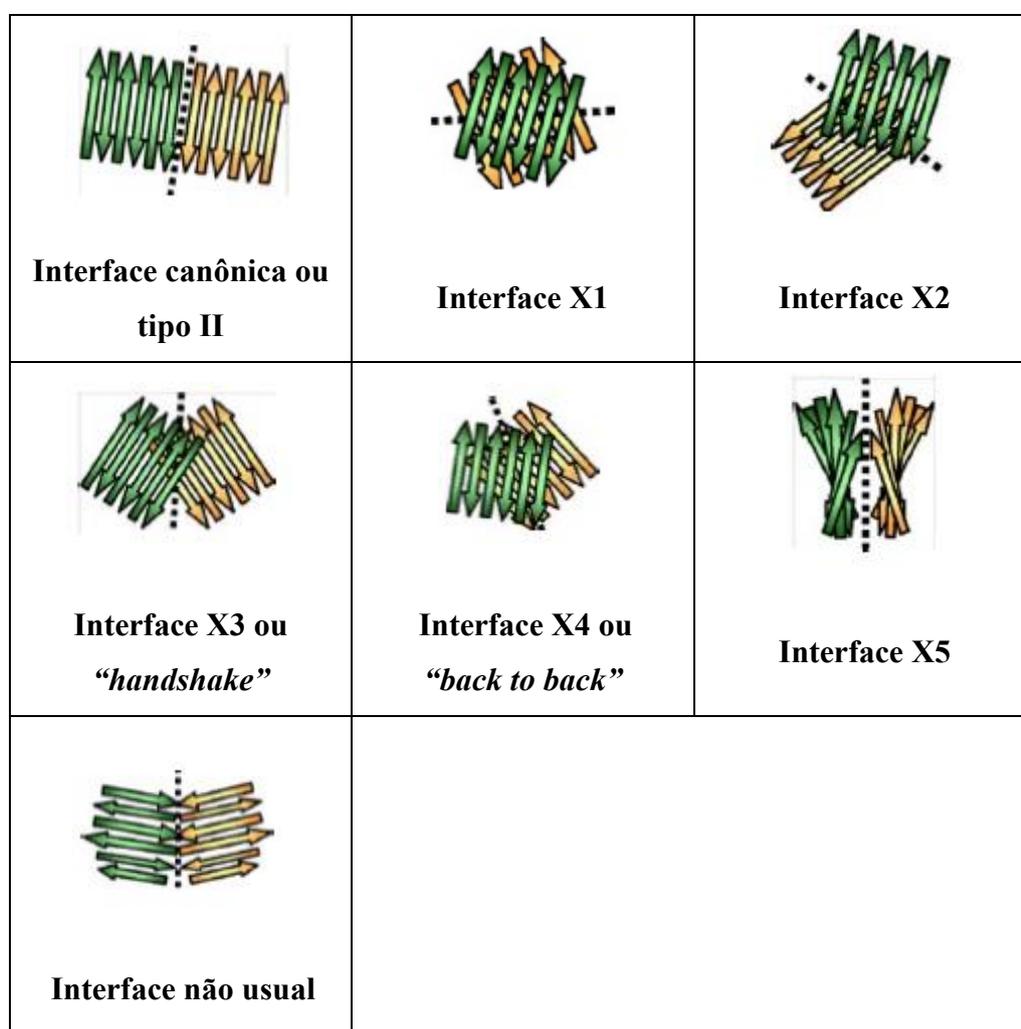


À esquerda, diagrama esquemático da estrutura terciária de um monômero típico de lectinas de leguminosas. Do lado direito, estrutura terciária do monômero da lectina de *Canavalia maritima* (ConM) complexada com trelose (PDB:2CY6).

Fonte: SINHA, 2007. Adaptado.

Todas as lectinas de leguminosas formam dímeros e tetrâmeros feitos de dímeros. A oligomeração entre a forma tetramérica e dimérica é principalmente mediada pelas interações das folhas- β de duas subunidades para produzir tipos diferentes de associações (Figura 5), a dimerização formada pela associação lado a lado das folhas- β gerando uma estrutura continua de 12 fitas é conhecida como associação canônica, comum nas lectinas de leguminosas (SINHA, 2007).

Figura 5 – Tipos de interface formados durante a oligomerização de lectinas leguminosas.

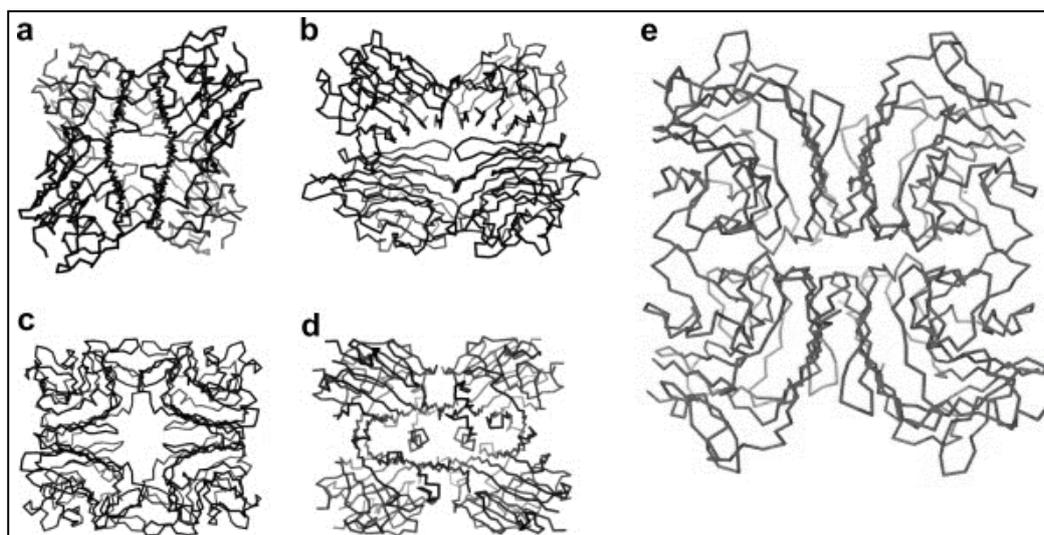


Fonte: SINHA, 2007. Adaptado.

Os dímeros das lectinas de leguminosas são formados por duas subunidades iguais e cada subunidade é constituída de uma cadeia α (10-12 KDa) e uma β (15-19 KDa) mantidas por ligações não-covalentes (SHARON; LIS, 1989; IMBERTY et al., 2000; SHARON; LIS, 2002; UETA; DINIZ, 2008). Em geral, as lectinas de leguminosas são essencialmente dímeros

de dímeros, e os diferentes modos de tetramerização são uma consequência de uma combinação diversificada de interfaces diméricas vistas nas estruturas quaternárias (Figura 6) (MORENO et al., 2006; DELATORRE et al., 2007).

Figura 6 – Representação dos cinco tipos de associações de tetrâmeros entre lectinas de leguminosas. (a) Representação da ConA que é composta por dois dímeros canônicos interligados por uma interface não canônica. (b) A lectina do amendoim mostrando um tetrâmero composto de um dímero canônico, uma interface “back to back” e um tipo não usual de interface dímero-dímero visto apenas neste caso. (c) A lectina de *Griffonia simplicifolia* que representa duas interfaces de dímeros “back to back” e uma interface de dímero não usual. (d) A lectina de *Dolichos biflorus* que é composta por um dímero canônico e duas interfaces dímero-dímero DB58. (e) O tetrâmero da lectina de *Lotus tetragonolobus* (LTA) composto de duas interfaces “back to back” interconectadas por duas interfaces LTA-dímero específicas.



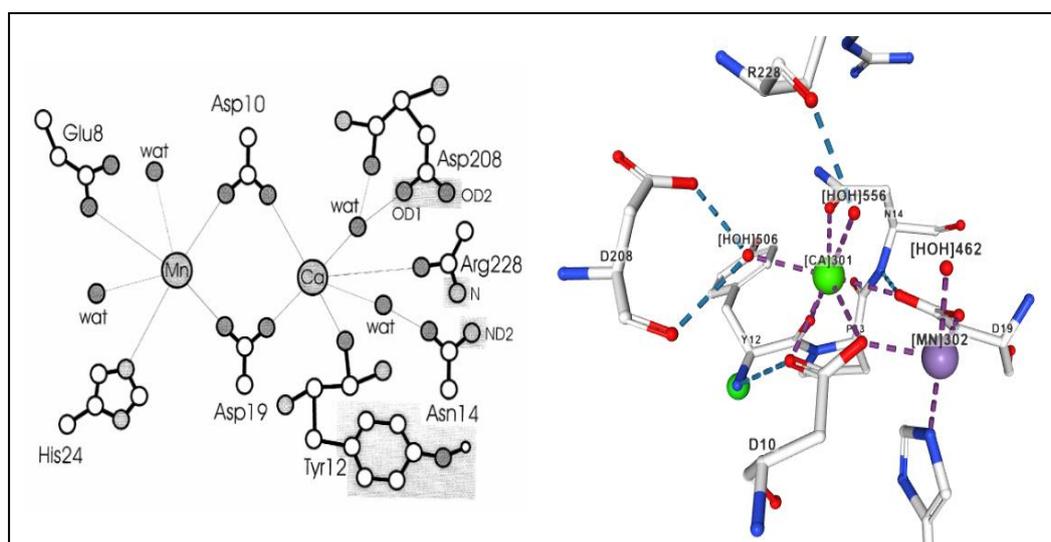
Fonte: MORENO et al., 2008.

Estas lectinas são compostas por 2 ou 4 subunidades, sua massa molecular varia entre 25 a 30 KDa, onde várias dessas moléculas apresentaram carboidratos em sua estrutura, sendo consideradas glicoproteínas, sendo ainda metaloproteínas por apresentarem íons, tais como Ca^{2+} e Mn^{2+} em sua estrutura (SHARON; LIS, 1989; SUREKUMAR; PRYIA, 2012).

As lectinas de leguminosas usam os cátions Ca^{2+} e Mn^{2+} para estabilizar os sítios de ligação e fixar as posições dos aminoácidos que interagem com os açúcares ligantes (Figura 7). A coordenação ao cálcio fixa as cadeias laterais da proteína proporcionando uma ligação

mais eficaz ao açúcar. Os cátions também estabilizam a arquitetura geral do sítio, fixando a posição dos elementos estruturais, ou seja, aqueles que interagem com outros grupos de proteínas que, por sua vez, possuem o contato com o açúcar ligante. Vale ressaltar, o Mn^{2+} não coordena nenhum resíduo que interage diretamente com a proteína, mas ao invés corrige a posição do Ca^{2+} (UETA; DINIZ, 2008).

Figura 7 – Disposição dos íons Ca^{2+} e Mn^{2+} na estrutura das lectinas da família de leguminosas.



Fonte: LORIS et al, 1998 (esquerda); PAIS et al., 2017 (direita).

Estudos demonstram que além de sítios de ligação a carboidratos e sítios de ligação a metais, as lectinas de leguminosas também podem interagir com sítios hidrofóbicos, até mesmo interagindo com outras moléculas. As ligações conservadas entre lectinas de leguminosas são efetuadas através de uma região estrutural hidrofóbica altamente conservada, onde por este motivo desempenham um papel biológico importante (DELATORRE et al., 2007).

Algumas lectinas de leguminosas, como as lectinas extraídas de espécies da subtribo *Diocleinae*, exibem uma oligomerização dependente de pH, onde a proporção entre proteínas no estado dimérico e no estado tetramérico pode ser alterada de acordo com o pH do meio (CALVETE et al., 1999; NAGANO et al., 2008). A alteração desse equilíbrio dímero/tetrâmero dependente de pH pode influenciar diretamente nas atividades biológicas dessas lectinas, pelo fato dessas proteínas serem capazes de se ligar aos receptores glicoconjugados da superfície das membranas com maior afinidade quando na forma tetramérica (DELATORRE et al., 2006).

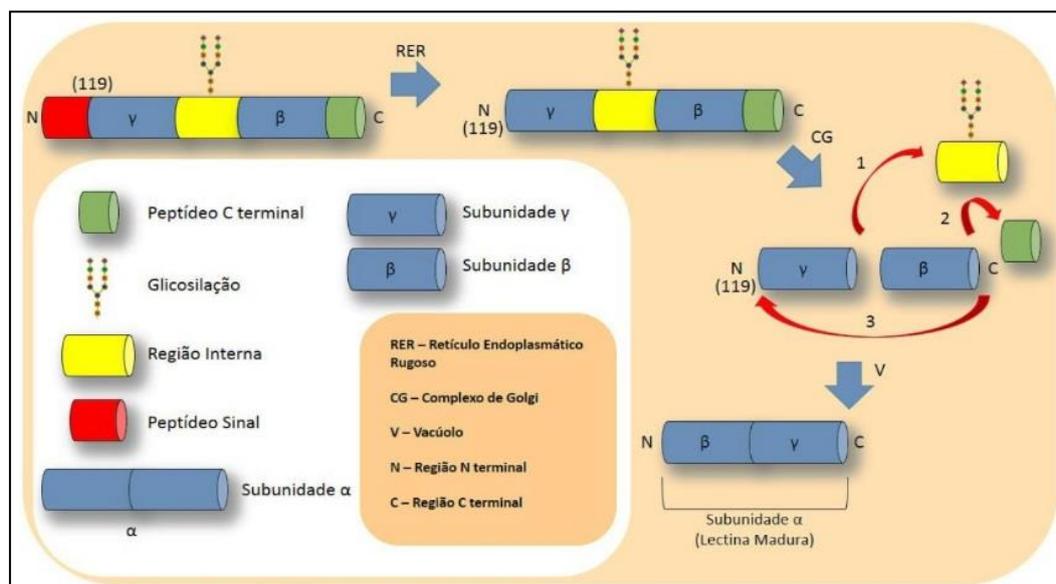
2.2 Genero Canavalia

O gênero *Canavalia* DC. pertence à tribo Diocleae (Benth.) Hutch. possui cerca de 60 espécies e tem distribuição Pantropical. O centro de diversidade do grupo é a região Neotropical, onde estão presentes cerca de 40 espécies. No Brasil ocorrem 17 espécies, sendo os biomas Cerrado e a Mata Atlântica que comportam a maior diversidade do gênero. As espécies do gênero podem ser caracterizadas pelo hábito lianescente, folhas trifolioladas, flores ressupinadas e cálice bilabiado, com o lábio superior bilobado maior que o inferior tridentado. Com ocorrências confirmadas nas regiões Norte, Centro-Oeste, Sudeste e Sul, assim como na região Nordeste nos estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe (QUEIROZ; SNAK, 2015). As espécies do gênero *Canavalia* apresentam destaque em diversas áreas com importantes valores agrônômicos, econômicos, etnobotânicos, medicinais e nutricionais, particularmente as espécies *C. gladiata* (Jacq.) DC (Feijão espada), *C. ensiformis* (L.) DC. (Feijão de porco), *C. maritima* (Sw.) DC (Feijão da praia) e *C. brasiliensis* (SEENA; SRIDHAR, 2006).

As lectinas presentes nas sementes da subtribo Diocleinae são na grande maioria glicose/manose específicas, podendo ser isoladas por cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex® G-50 (PINTO-JUNIOR et al., 2013; BARROSO-NETO et al., 2014; VASCONCELOS et al., 2015; NASCIMENTO et al., 2012; CECCATTO et al. 2002).

Em relação ao processamento sub-celular, as lectinas da subtribo Diocleinae são sintetizadas no retículo endoplasmático como pré-pró-lectinas agindo, primeiramente, como precursores glicosilados inativos. Apresentam um peptídeo sinal, com cerca de 30 resíduos de aminoácidos, perdendo-o no momento em que é transportado para o lúmen do retículo endoplasmático, dando origem a uma pró-lectina. Logo após a perda da sequência sinal, a pró-lectina é endereçada ao complexo de Golgi, onde chega na forma de lectina ativa (proteínas maduras), esse processo envolve um mecanismo pós-traducional altamente complexo. De acordo com alguns autores, a lectina madura e ativa não é glicosilada, pois essa glicosilação inibiria a atividade de ligação a carboidrato da lectina (Figura 8) (SHARON, 2007).

Figura 8 – Representação esquemática da biossíntese, modificações co- e pós-translacional, e topogênese de lectinas de leguminosas.



Fonte: SANTIAGO, 2013.

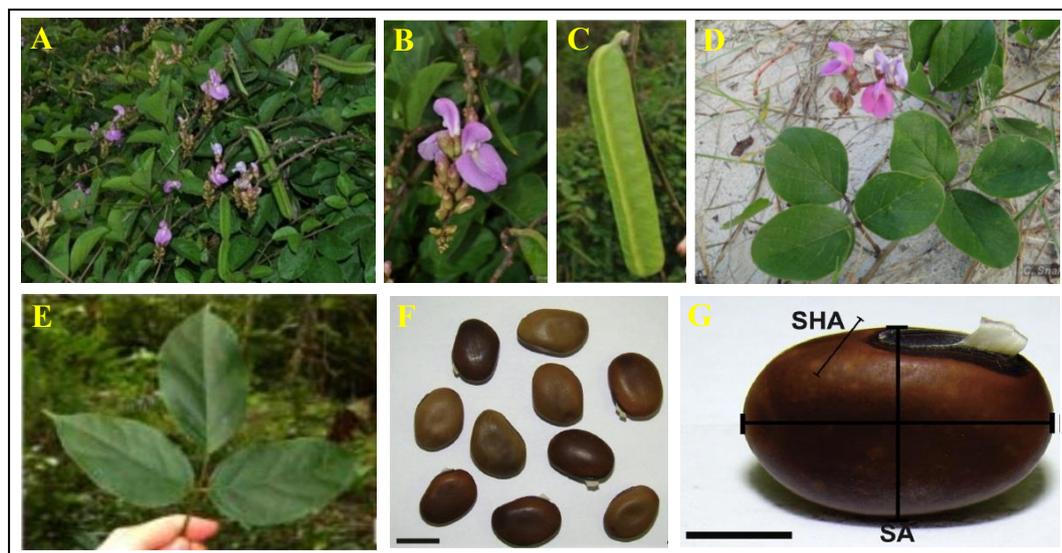
O mecanismo pós-traducional de permuta circular ocorre principalmente na subtribo Diocleinae, que se dá por meio de uma reação de transpeptidação de permuta circular. Logo após a formação da pró-lectina, esta sofre clivagens apresentando três fragmentos de aminoácidos, fragmento α , fragmento β e fragmento γ e por último uma extensão C-terminal de 9 resíduos de aminoácidos, originando as cadeias β e γ , que são unidas novamente, mas de uma maneira inversa da que originalmente se encontravam no precursor, formando a cadeia α madura (CARRINGTON et al., 1985; NAGANO et al., 2008; GRANJEIRO et al., 1997).

2.2.1 *Canavalia brasiliensis* Mart. ex Benth.

Canavalia brasiliensis (Figura 9) conhecida popularmente com feijão bravo do Ceará (Brasil). É uma espécie do tipo trepadeira pertencente à família Leguminosae, cujos indivíduos podem atingir de 0,5 m a 5 m, dependendo do porte (arbustivo ou arbóreo) da espécie suporte. Suas raízes são amarelas, as folhas alternadas trifolioladas, suas flores apresentam coloração roxa e as pétalas bastante perfumadas, sendo reunidas em inflorescências do tipo paniculada terminal, com escapo floral de coloração verde-arroxeadada (GUEDES; QUIRINO; GONÇALVES, 2009). No Brasil, a espécie é encontrada na Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica habitando borda de matas, comumente em beira de estradas. Com inflorescência durante todo o ano e com frutos nos meses de fevereiro a outubro (SNACK; DE QUEIROZ, 2018). A espécie

é popularmente utilizada desde biossensor de uréia (ROVER JÚNIOR, 1995) e controle de saúvas (ISIDRO et al., 2001) até em preparações medicinais (PEREIRA, 2005).

Figura 9 – *Canavalia brasiliensis* Mart. ex Benth.



A- Visão geral da planta, B- Inflorescência, C- Fruto, D- Filotaxia, E- Folha, F e G- Sementes.

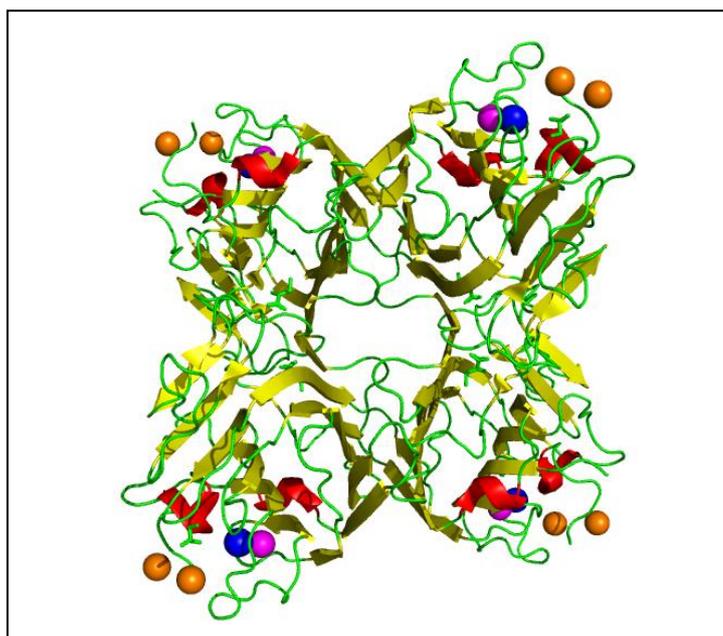
Fonte: SNACK; DE QUEIROZ, 2016 (Imagens A-E); MIQUEL et al., 2015 (Imagens E-F)

A partir das sementes de *C. brasiliensis*, é obtida a lectina Concanavalina Br (ConBr), sendo uma das primeiras lectinas a ser isolada e caracterizada (MOREIRA; CAVADA, 1984) tendo sua estrutura cristalina (Figura 10) obtida por Sanz-Aparicio e colaboradores em 1997. A ConBr é constituída de subunidades idênticas, cada uma com 25 KDa tendo afinidade por D-glicose/D-manose, apresentando em sua estrutura os íons Ca^{+2} e Mn^{+2} . Seu monômero contém 237 resíduos de aminoácidos. A lectina compartilha especificidade primária de reconhecimento a carboidratos com outras lectinas de leguminosas do gênero *Canavalia*, e a sequência de aminoácidos apresenta 99% de homologia com ConA, a lectina de sementes de *Canavalia ensiformis*, somente dois resíduos de aminoácidos são substituídos com relação a ConA e tais resíduos não se localizam próximos ao sítio de ligação a carboidratos (CAVADA et al., 2001; GRANGEIRO et al., 1997). Contudo, diversos estudos demonstram que apesar do alto grau de homologia em suas estruturas primárias a diversidade as lectinas da subtribo Diocleinae apresentam variações em suas atividades biológicas (CAVADA et al., 2001).

Diversas propriedades biológicas e aplicações biotecnológicas da ConBr foram descritas na literatura, tais como: atividade anti-helmíntica (BATISTA et al., 2018), propriedades imunomoduladoras no controle de células infectadas por *Salmonella* (BATISTA

et al., 2017), efeito neuroprotetor contra a neurotoxicidade do glutamato (JACQUES et al., 2013), efeito antidepressivo (RIEGER et al., 2014), efeito antiproliferativos em linhagens de células de leucemia (FAHEINA-MARTINS et al., 2012) e imobilização em superfícies para reconhecimento de D-manose (ABREU et al., 2017).

Figura 10 - Estrutura tridimensional da letina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr).



Os sítios de ligação a metais estão representados como esferas azul (Ca^{+2}), roxo (Mn^{+2}) e laranja (Cl^-) em cada monômero que compõe o tetrâmero

Fonte: PDB (*Protein Data Bank*). Número de acesso 3ju9.

2.3 Papel das lectinas em plantas

A função ou funções biológica das lectinas em plantas é uma questão central que tem sido frequentemente questionada, mas ainda não foi definitivamente respondida (RUDIGER; GABIUS, 2001). As plantas, sendo organismos sésseis, são expostas a uma diversidade de fatores ambientais e para enfrentá-los desenvolveram adaptações evolutivas, como a elaboração de estratégias de defesa e a síntese de compostos bioativos (MAAG et al., 2014). Desta forma, as principais linhas de pesquisas, sob o papel das lectinas em plantas, são divididas em dois grupos: o primeiro, presume que uma lectina interagem com moléculas de organismos exógenos, como animais, fungos ou bactérias. Já a segunda linha presume que uma lectina interage com moléculas da própria planta (RUDIGER; GABIUS, 2001).

As plantas expressam uma variedade de proteínas tóxicas que conferem resistência

contra herbívoros e patógenos. Uma família bem conhecida dessas proteínas inclui as lectinas (DANG; VAN DAMME, 2015). Diversas lectinas de origem vegetais mostram uma especificidade para glicoconjugados pouco abundantes ou ausentes em plantas (por exemplo, galactose e ácido siálico). Além disso, diferentes estruturas de carboidratos presentes em organismos como vírus, microrganismos, fungos, nematoides ou insetos fitófagos mostraram interações com lectinas vegetais (HOPKINS; HARPER, 2001; RIPOLL et al., 2003; WONG et al., 2010). Além disso, muitas vezes as lectinas estão presentes em grandes quantidades em órgãos de armazenamento e em sementes que são particularmente vulneráveis a patógenos ou insetos-praga (PEUMANS; VAN DAMME, 1995).

Diversos estudos já demonstraram que lectinas vegetais apresentam propriedades entomotóxicas (VANDENBORRE; SMAGGHE; VAN DAMME, 2011). Devido à sua abundância, localização subcelular, bem como a sua toxicidade, geralmente é aceito que essas lectinas desempenham um papel como proteínas de armazenamento e também podem funcionar na defesa das plantas sempre que a planta é atacada por um patógeno ou predador (MIGUEL et al., 2015; PEUMANS; VAN DAMME, 1995).

A maioria das lectinas vegetais é sintetizada como precursores inativos que se tornam ativos somente após chegar ao compartimento celular especializada. Por causa dessas observações, foi proposto que as lectinas vegetais desempenham um papel na defesa geral contra uma infinidade de fitopatógenos. Mas também, são usados como proteínas de armazenamento para o crescimento e desenvolvimento da planta (VANDENBORRE; SMAGGHE; VAN DAMME, 2011).

Segundo Rudiger e Gabius (2001) as lectinas podem interagir não apenas com proteínas armazenadoras em sementes, mas também, com enzimas hidrolíticas das quais são ligadas pela lectina de uma maneira dependente de carboidratos, de força iônica ou de pH. A capacidade de ligação dupla de lectinas a proteínas de armazenamento e a membrana dos corpos proteicos, sugere que as lectinas podem formar um adesivo reversível entre a proteína e a membrana, uma ideia que é apoiada pelo tempo de biossíntese da proteína durante a maturação da semente (WENZEL et al., 1993). Contudo, as lectinas podem não apenas ligar enzimas, mas também modificar suas atividades, como foi observado a mais de uma década, no estudo com lectinas de germe de trigo (LORENC-KUBIS et al., 1987) e batata (WIERZBA-ARABSKA; MORAWIECKA, 1987), sendo estas capazes de ativar fosfatases endógenas da planta.

Em estudos para determinar a função pontual destas proteínas no crescimento e desenvolvimento das plantas, Brill, Evans e Hirsch (2001), silenciaram os genes (MsLEC1 e MsLEC2) da lectina de alfafa, e observaram que as plantas apresentaram graves anormalidades

na embriogênese, assim como, o desenvolvimento vegetativo quanto reprodutivo foram perturbados.

Nas linhas de pesquisas baseadas em estudos estruturais das lectinas, como as realizadas por Delatorre e colaboradores (2013), sugerem que a lectina de *C. marítima* controla a disponibilidade da auxina AIA durante os primeiros estágios de desenvolvimentos das plântulas, indicando um possível novo papel fisiológico para estas proteínas. Estes resultados apontam para um envolvimento das lectinas já nos estágios iniciais de desenvolvimento em plantas, porém, ainda existe um desafio para futuras investigações neste campo.

2.4 Interação de lectinas com moléculas hidrofóbicas

Diversos estudos, mostram que as funções biológicas e fisiológicas das lectinas de plantas estão associadas com sua capacidade de interagir com sacarídeos na superfície das células, a principal evidência dessa capacidade de ligação é que na presença de açúcares específicos as suas principais propriedades são completamente abolidas (HIRSCH, 1999; MURDOCK; SHADE, 2002). Contudo, lectinas de leguminosas e de outras famílias de plantas, assim como outros organismos (STOITSOVA et al., 2003), também podem interagir com outras moléculas, como aminoácidos não-proteicos (DELATORRE et al., 2007) e compostos hidrofóbicos (EDELMAN; WANG, 1978; ROBERTS; GOLDSTEIN, 1983; BARBOSA et al., 2001; MURDOCK; SHADE, 2002).

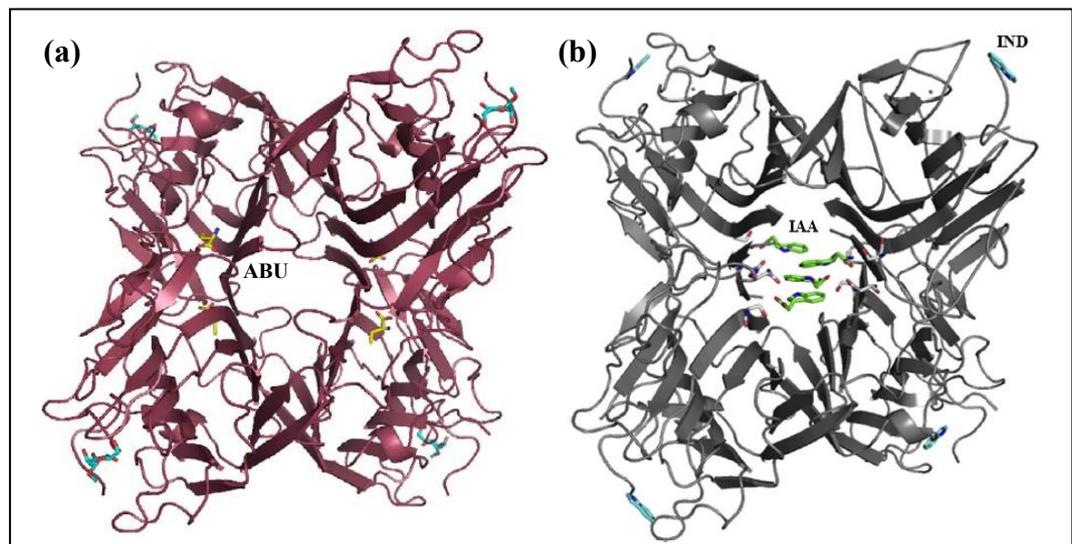
Nos estudos sobre a interação de lectinas de leguminosas com moléculas de caráter hidrofóbico realizados por Hardman e Ainsworth (1973) e Van Der Bosch e McConnell (1975) foram observados que a lectina de *Canavalia ensiformis* (ConA) se liga a várias moléculas hidrofóbicas sem que essas contenham qualquer porção de sacarídeo em suas estruturas.

Estudos realizados por Edelman e Wang (1978), mostraram diversas evidências que a ConA se liga a várias estruturas via interações hidrofóbicas independentes da atividade de ligação ao sacarídeo, normalmente associada a lectina, assim como, afirmam que algumas lectinas de leguminosas possuem um sítio de ligação hidrofóbico com alta afinidade pela adenina e certos hormônios vegetais derivados de adenina.

Além disso, em 2007, Delatorre e colaboradores obtiveram a estrutura da lectina de sementes de *Canavalia gladiata* (CGL) complexada ao ácido α -aminobutírico (ABU) revelando, desta forma, um novo sítio de ligação para aminoácidos não proteicos, localizados na interface de contato dos monômeros de cada dímero canônico de lectinas leguminosas (Figura 11). Sabe-se que os resíduos que compõem essa bolsa hidrofóbica são altamente

conservados em outras lectinas como ConA, como as lectinas de sementes de *Canavalia brasiliensis* (ConBr), sementes de *Canavalia maritima* (ConM) e sementes de *Dioclea grandiflora* (DGL).

Figura 11 – Interação de lectinas de leguminosas com moléculas hidrofóbicas. **(a)** Estrutura da lectina de *Canavalia gladiata* (CGL) complexada com ácido α -aminobutírico (ABU) interagindo no dímero canônico entre os monômeros na cavidade hidrofóbica. ABU é exibido em amarelo e o α -metil-manósido em azul. **(b)** Estrutura da lectina de *Canavalia maritima* (ConM) complexada com ácido indol-3-acético (AIA) interagindo através do empilhamento de interações hidrofóbicas. Grupamento Indol (IND) é representado em azul perto do domínio CRD e AIA em verde no centro do tetrâmero.



Fonte: DELATORRE et al., 2007(a); et al., 2013(b)

Contudo, apesar das lectinas da subtribo Diocleinae apresentarem um alto grau de homologia nas suas estruturas primária e os resíduos de aminoácidos que estão envolvidos no sítio de reconhecimento a carboidratos (Tyr12, Asn14, Leu99, Try100, Asp208 e Arg228), sítio de ligação a metais (Glu8, Asp10, Tyr12, Asn14, Asp19, His24, Val32, Ser34, Asp208 e Arg228) e a cavidade hidrofóbica (Tyr54, Leu81, Leu85, Val89, Val91, Phe111, Ser113, Val179, Ile181, Phe191, Phe212 e Ile214) serem completamente conservados (CAVADA et al., 2001), existem diferenças na interação de moléculas que apresentam as mesmas características, implicando em diferentes intensidades de suas atividades biológicas (CAVADA et al., 2001; BEZERRA et al., 2011).

Em adição, Delatorre e colaboradores (2013) ao obter a estrutura da lectina ConM

complexada à auxina AIA observou que a interação entre esse ligante permitia apenas interconexões entre os dímeros, mas não apresentava uma forte capacidade de estabilizar o dímero canônico, diferentemente da interação entre ABU e CGL que possibilita interações intermonômeros, desta forma, estabilizando o dímero canônico (Figura 11). Assim, contribuindo com estudos anteriores que propuseram a existência de dois sítios hidrofóbicos independentes em lectinas: um sítio de alta afinidade para compostos hidrofóbicos por tetrâmero e um de baixa afinidade por monômero (EDELMAN; WANG, 1978; YANG; GALL; EDELMAN, 1974).

É interessante destacar que boa parte desses estudos indica que a afinidade de lectinas por compostos hidrofóbicos chegar a ser maior que aquela para os próprios carboidratos (LIS; SHARON, 1986), mostrando, assim, que tais sítios podem ter uma importante relevância para as atividades biológicas e fisiológicas desempenhadas por estas proteínas, uma vez que, tais resíduos são extremamente conservados nos diferentes gêneros que compõem a subtribo *Diocleinae*.

2.5 Hormônio vegetal

Nos vegetais superiores, a regulação e a coordenação do metabolismo, o crescimento e a morfogênese dependem de sinais químicos de uma parte da planta para outra. Essa ideia surgiu no século XIX com o botânico alemão Julius von Sachs (TAIZ; ZEIGER, 2013). Sachs propôs que mensageiros químicos são os responsáveis por tais atividades, embora não conhecesse a identidade desses mensageiros químicos na época.

Com o avanço dos estudos relacionados à fisiologia das plantas, atualmente, sabemos que tais mensageiros químicos se tratam dos hormônios vegetais, também conhecidos como fitohormônios, são pequenas moléculas orgânicas naturais que são importantes não apenas para os processos de desenvolvimento das plantas, mas também desempenham um papel integral como moléculas de sinalização na defesa (SHIGENAGA; ARGUESO, 2016). O desenvolvimento vegetal é regulado por seis tipos principais de hormônio: auxinas, citocininas, giberelinas, etileno, ácido abscísico e brassinosteróides.

A lista de agentes sinalizadores e de reguladores do crescimento continua aumentando, surgindo outras classes de moléculas, como a estrigolactona (GOMEZ-ROLDAN et al., 2008), que atuam como moduladores da tradução de sinal, localizados dentro e fora das células (PEER; MURPHY, 2007). Outros estudos, mostram que macromoléculas como peptídeos de sinalização são secretados por plantas e desempenham um papel semelhante ao dos fitohormônios convencionais na sinalização de curta distância, mediando um amplo

espectro de processos de crescimento e desenvolvimento (MARSHALL; COSTA; GUTIERREZ-MARCOS, 2011; MURPHY; SMITH; DE SMET, 2012; MATSUBAYASHI, 2014, GRIENENBERGER; FLETCHER, 2015).

Os hormônios influenciam a divisão celular (número de células), a expansão celular (tamanho da célula) e a estrutura e função celular (diferenciação celular) e têm a capacidade de controlar como uma planta responde ao estresse ambiental (FERGUSON e GRAFTON-CARDWELL, 2014). Contudo, o controle da resposta fisiológica na planta não é decorrente apenas de um hormônio, mas da ação interdependente dos fitohormônios, através de complexas interações antagônicas ou sinérgicas (SHIGENAGA; ARGUESO, 2016).

Em cada célula, a percepção de hormônios estimula redes de sinalização que regulam a expressão gênica e que acabará levando a decisões celulares, por exemplo, uma mudança na dinâmica do crescimento ou a aquisição de uma nova identidade celular. A identificação dos componentes da rede de sinalização hormonal e a compreensão de como a atividade desses componentes é afetada pela percepção hormonal, incluindo possíveis regulações de “*feedback*”, permitiram recentemente a geração de informações essenciais sobre a topologia das redes que controlam a transcrição gênica em resposta aos hormônios (SANTNER; ESTELLE, 2009; SHAN; YAN; XIE, 2012).

Em adição, os níveis dos hormônios vegetais nos tecidos estão diretamente relacionados com sua associação a outras moléculas, como, aminoácidos, açúcares, peptídeos ou até mesmo glicoproteínas (TAIZ; ZEIGER, 2013). Em relação com lectinas vegetais, estudos já demonstraram sua capacidade de interagir com hormônios vegetais da classe das citocininas e auxinas, como foi observado por Meyer e colaboradores (2008) e Małeckki e colaboradores (2012) ao analisar a estrutura da lectina ML-I (*Viscum album*) complexada a zeatina, da mesma forma, Delatorre e colaboradores (2013) obteve a estrutura cristalina da ConM em complexo com o ácido indol-3-acético. Preludiando, um possível novo papel fisiológico para estas proteínas.

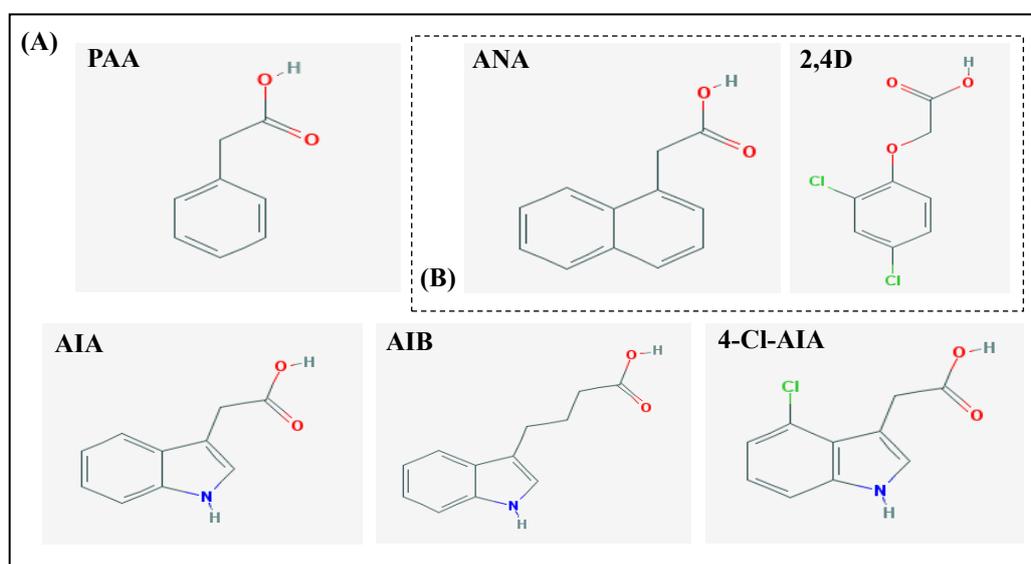
2.5.1 Auxina

A auxina foi o primeiro hormônio de crescimento estudado em plantas e muitos dos trabalhos pioneiros na fisiologia do mecanismo de expansão celular foram realizados em relação à ação desse hormônio (TAIZ; ZEIGER, 2013). Uma vez que, as auxinas são uma classe de hormônios vegetais que influenciam quase todas as fases do ciclo de vida das plantas, desde a germinação até a senescência (WOODWARD; BARTEL, 2005). Além do ácido indol-3-

acético (AIA), que é a mais comum, a ocorrência natural de auxina, apenas três outras auxinas vegetais foram descritas, sendo estas, ácido indol-3-butírico (AIB), ácido 4-cloroindol-3-acético (4-Cl-AIA) e ácido fenilacético (PAA) (Figura 12) (SAUER; ROBERT; KLEINE-VEHN, 2013).

Além das auxinas de ocorrência natural, muitos de seus análogos sintéticos possuem atividade semelhante à auxina (SAUER; ROBERT; KLEINE-VEHN, 2013; SIMON et al., 2013; DO-THANH et al., 2016) e alguns, principalmente ácido 1-naftalenoacético (ANA), ácido 2-metil-4-clorofenoxiacético (MCPA) e ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (Figura 12), encontraram aplicação na agricultura (SONG, 2014; GROSSMANN, 2010). A determinação do transporte de hormônios vegetais e sítios de ligação é essencial para entender os mecanismos por trás da função hormonal (BIELESZOVÁ et al, 2019).

Figura 12 – Estrutura das auxinas. (A) Estruturas de auxinas de ocorrência natural: indol-3-acético (AIA), ácido indol-3-butírico (AIB), ácido 4-cloroindol-3-acético (4-Cl-AIA) e ácido fenilacético (PAA). (B) Estrutura de auxinas sintéticas: ácido 1-naftalenoacético (ANA) e ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D).



Fonte: PubChem Substance and Compound databases, 2018.

Diversos estudos demonstraram que a maioria das auxinas nas plantas são produzidas nos meristemas apicais das brotações, nas folhas jovens e nos botões florais, e é rapidamente distribuída por toda a planta através do floema (TEALE; PAPONOV; PALME, 2006). No entanto, estudos mostraram que existem fontes de auxina localizadas na raiz (LJUNG et al., 2005; STEPANOVA et al., 2008). Adicionalmente em 2018, Brumos e colaboradores

mostraram que fontes locais de auxinas produzidas por raízes são necessárias para a manutenção do nicho de células-tronco da raiz, enquanto a auxina derivada de brotos sozinha não pode manter os meristemas de raiz vivos.

Enquanto o papel fisiológico das auxinas estar bem caracterizado, a biossíntese de AIA em plantas não está completamente elucidada (TSAVKELOVA, et al., 2012). A biossíntese do AIA pode ser dependente ou independente do triptofano (NORMANLY, et al., 2010).

As auxinas livres são a forma mais ativa do AIA, porém, auxinas ligadas, são consideradas moléculas de armazenamento e inativas, sendo as auxinas ésteres glicosil, o estado inativo mais comum (DELATORRE, et al., 2013). Esta é a forma de auxina mais encontradas em sementes e órgãos de armazenamento (MOORE, 1989).

Estudos demonstram que níveis endógenos de AIA livre são baixos em diferentes tecidos e órgãos (GOOD, et al., 1956), podendo ser explicado pela conjugação do AIA com aminoácidos e açúcares (NORMANLY, 2010). Além disso, estudos sugerem a existência de um mecanismo regulador adicional, baseando-se na capacidade das lectinas formar complexos com AIA (EDELMA; WANG, 1978).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar a interação da lectina de sementes de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) com o fitohormônio AIA.

3.2 Objetivos específicos

- Cristalizar a lectina ConBr com o fitohormônio AIA;
- Resolver a estrutura tridimensional do complexo da ConBr e AIA;
- Identificar o sitio e resíduos de aminoácidos relevantes para a interação da ConBr com o AIA;
- Determinar a estabilidade térmica e estrutural da ConBr com as auxinas AIA, AIB e 2,4D;

4 MATERIAS E METODOS

4.1 Purificação das lectinas

4.1.1 Extração proteica

A lectina ConBr foi obtida a partir das sementes de *Canavalia brasiliensis*, e purificadas seguindo protocolos previamente estabelecidos por Ceccatto et al. (2002).

As sementes foram coletadas maduras, lavadas e secas em estufa por 24h a 37 °C. Em seguida, os tegumentos das sementes foram removidos, expondo-se o endosperma, o qual foi triturado em um moedor de café e peneirado, obtendo-se uma farinha fina, apropriada para o processo de extração proteica. As proteínas solúveis foram extraídas pelo contato com a solução NaCl 0,15 M, na proporção (1:10, $m_{\text{farinha}}/V_{\text{NaCl}}$), sob agitação por 3 horas à temperatura ambiente. O material, em seguida, foi centrifugado a 16.000 xg durante 30 min a 4 °C. O sobrenadante foi denominado extrato total, sendo filtrado em papel de filtro e em seguida submetido à purificação em coluna cromatográfica por afinidade.

4.1.2 Cromatografia de afinidade em gel de Sephadex G-100

A lectina ConBr foi purificada através de uma única etapa de cromatografia de afinidade, como adaptado por Ceccatto et al. (2002). O extrato total, obtido da extração total de proteínas, foi aplicado em uma coluna de Sephadex G-100 (a coluna é constituída de cadeias poliméricas de dextrana por meio de ligações covalentes cruzadas), previamente equilibrada com a solução NaCl 0,15 M, o extrato permaneceu em contato com a matriz *overnight*. Após o período de contato, a coluna foi lavada com a mesma solução de equilíbrio para remover o material que não interagiu com a coluna, denominado P₁. Em seguida, o material retido, denominado P₂, foi eluído com a solução glicina 0,1 M pH 2,6. A cromatografia foi realizada a um fluxo de aproximadamente 1 mL/min e foram coletados frações de aproximadamente 5,0 mL e monitorados na absorvância no comprimento de onda de 280 nm. O P₂, que corresponde teoricamente a lectina purificada, foi dialisado exaustivamente contra água deionizada, liofilizado e armazenado.

A concentração de proteínas totais solúveis no extrato e nas frações foi verificada pelo método descrito por Bradford (1976). A massa molecular aparente da lectina ConBr durante as etapas de purificação foi acompanhada através de eletroforese em gel de

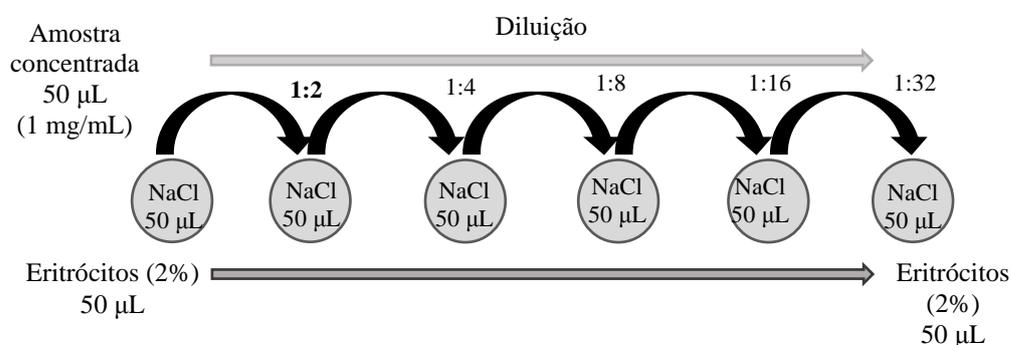
poliacrilamida, baseada na técnica desenvolvida por Laemmli (1970).

4.2 Detecção da atividade hemaglutinante

Os ensaios para a detecção de atividade hemaglutinante das amostras foram realizados através de diluições seriadas em microplaca de 96 poços do tipo fundo “V”, a partir de uma adaptação ao método descrito por Moreira e Perrone (1977).

As amostras contendo a lectina ConBr foram diluídas, em triplicata, em solução NaCl 0,15 M, de forma seriada nos poços, seguindo a proporção de 1:2, 1:4, 1:8 e assim por diante. Após a diluição seriada, foi adicionado 50 µL da suspensão de eritrócitos de coelho 2% (v/v) (Figura 13). Para o controle negativo os volumes de NaCl 0,15 M e solução de hemácias 2% (v/v) foram iguais. Após 30 min de incubação a 37 °C e repouso por mais 30 min a temperatura ambiente. A presença ou não de hemaglutinação foi observada macroscopicamente a olho nu.

Figura 13 – Esquema ilustrativo para a determinação da atividade hemaglutinante para a lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr).



Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

Os títulos de hemaglutinação foram expressos em unidade de hemaglutinação (UH.mL^{-1}) que corresponde ao inverso da maior diluição da amostra que apresente nítida aglutinação.

Após a obtenção do título de hemaglutinação e da concentração de proteínas solúveis, a atividade específica das amostras foi calculada, com o objetivo de determinar a melhor concentração da proteína que será utilizada para realizar a co-inoculação com a auxina.

4.3 Cristalografia de Raios X

4.3.1 *Cristalização da ConBr*

A lectina de sementes de *C. brasiliensis* foi cristalizada complexada com o ligante ácido indol-3-acético, utilizado o método da difusão de vapor em gota suspensa. As melhores condições de cristalização foram testadas utilizando o método da matriz esparsa (JANCARIK; KIM, 1991), a partir da metodologia estabelecida por Bezerra e colaboradores (2011).

A ConBr, previamente purificada e liofilizada, foi suspensa em água Milli-Q na concentração de 12,5 mg/mL. A suspensão da proteína foi então centrifugada à 9000 xg por 10 min a 4 °C e o sobrenadante foi utilizado para os passos futuros. Para experimentos com o ligante, a proteína em solução foi encubada com ácido indol-3-acético na concentração final de 6,7 mM por uma hora antes dos experimentos de cristalização. As gotas de cristalização contendo 1 µL de solução de proteína, 1 µL de solução de cristalização e 1 µL do ligante, foram montadas em lamínulas de 22x22 mm (KASVI®) previamente siliconizadas. As lamínulas foram devidamente vedadas ao reservatório com graxa de silicone e as placas foram mantidas em repouso a temperatura de 18 °C (291K).

Após a obtenção dos primeiros cristais, ainda com tamanhos insatisfatórios, foi feita a otimização das condições iniciais de cristalização, variando a concentração de precipitante e o pH da solução, repetindo o método da difusão de vapor. Essa otimização visou melhorar a condição de formação dos cristais, produzindo assim, cristais com características necessárias para que ele possa ser difratado quando submetido à difração de Raios X.

4.3.2 *Coleta de dados de difração de Raios X*

As placas de cristalização foram acondicionadas em caixas de isopor para serem transportadas ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (Campinas-SP, Brasil), que possui a estação experimental W01B-MX2 dedicada à cristalografia de proteínas. Esta estação opera na faixa dos Raios X a diversos comprimentos de ondas (Tabela 2).

Tabela 2 – Dados da Estação Experimental W01B-MX2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (Campinas, São Paulo, Brasil).

Características	Especificações
Uso científico	Análise de estruturas tridimensionais de macromoléculas
Faixa de operação (Å)	0,82 – 2,48
Fonte	Wiggler multipolar de 2T
Elementos ópticos	Espelho colimador vertical, monocromador de cristal duplo de Si(111) e espelho focalizador toroidal
Resolução em energia	(E/dE) = 4500
Detector	MarMosaic 225 (CCD com área de 225 x 225 mm ²)

Fonte: <http://biosync.sdsc.edu/index.jsp>.

Os dados de difração de Raios X foram coletados a temperatura de 100K. para evitar formação de gelo os cristais foram mergulhados em uma solução crioprotetora composta de solução de cristalização adicionada de 25% de glicerol. O cristal laçado com o *loop* foi alinhado em relação ao feixe de Raios X utilizando-se o goniômetro do difratômetro e então submetido à coleta de dados. Uma primeira imagem foi coletada com a placa de imagem posicionada a 150 mm do cristal e com tempo de exposição de 0,5 segundos. Logo após, foi feita a análise inicial da imagem de difração e decisões quanto à resolução, tempo de exposição, ângulo de oscilação e grupo espacial foram tomadas e averiguadas em novas imagens. Ao término desta etapa a estratégia de coleta foi completada e um conjunto completo de dados foi obtido a partir do uso de uma placa de imagem PILATUS 2M para cada complexo cristalizado. A integralização do conjunto completo de imagens de difração de Raios X foi feita usando o programa XDS (KABSCH, 2010). A qualidade dos dados escalonados foi aferida usando o programa Scala (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994) e XSCALE (KABSCH, 2010), montando-se um arquivo de intensidades com as observações únicas, em seguida, foram verificadas as extinções sistemáticas e o grupo espacial foi elucidado.

4.3.3 Substituição molecular, refinamento e análise da estrutura da proteína

O método da substituição molecular foi utilizado para solucionar o problema da fase e propiciar a obtenção da densidade eletrônica com o posicionamento correto do modelo utilizado. Os modelos foram escolhidos a partir dos alinhamentos da sequência da proteína com bancos de dados (NCBI). As estruturas iniciais das proteínas foram resolvidas por substituição

molecular usando os programas MolRep (VARGIN; TEPLYAKOV, 1997) do pacote de programas CCP4. Nesta etapa, foram definidas as funções rotação e translação que caracterizam o melhor modelo gerado através de um controle estatístico das soluções através do coeficiente de correlação e do *Rfactor*. A melhor solução para cada modelo foi selecionada com base na magnitude dos valores do coeficiente de correlação e do *Rfactor*. O refinamento das estruturas foi feito usando o programa Phenix (ADAMS et al., 2010).

O modelo tridimensional gerado a partir da substituição molecular foi analisado e realizou-se um refinamento posicional por restrições, além disso, um mapa de densidade eletrônica a dois sigma foi gerado e visualizado no programa COOT (EMSLEY; COWTAN, 2004), com o objetivo de fazer verificações das cadeias laterais dos aminoácidos e se observar a presença ou não de densidade eletrônica para o ligante (AIA). A qualidade estereoquímica do modelo final foi feita através do programa MolProbit. As coordenadas das estruturas finais serão depositadas no banco de dados de proteínas (PDB).

4.4 Thermofluor

O ensaio Thermofluor é um ensaio rápido baseado em temperatura para avaliar a estabilidade das proteínas. Pode ser usado como alternativa ao CD (dicroísmo circular) para determinar a temperatura de *melting* (T_m). O início do experimento foi dividido em duas etapas. A primeira etapa consistiu em realizar testes para estabelecer a melhor proporção proteína/ligante (Tabela 3) para encontrar o melhor sinal do fluoróforo. A segunda etapa consistiu em realizar “*screens*” de condições otimizadas de tampão, pH e força iônica das soluções (Tabela 4), para obter uma maior homogeneidade conformacional da amostra com a proteína, desta forma, alcançando um incremento significativo na T_m .

Tabela 3 – Proporção da quantidade de proteína em relação a quantidade do fluoróforo SYBRO *Orange* para o ensaio de Thermofluor.

Condição (μL)		Proporção (v:v)
ConBr (2 mg/mL)	SYBRO Orange (10x)	
1	4	1:4
2,5	2,5	1:1
4	1	4:1

Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

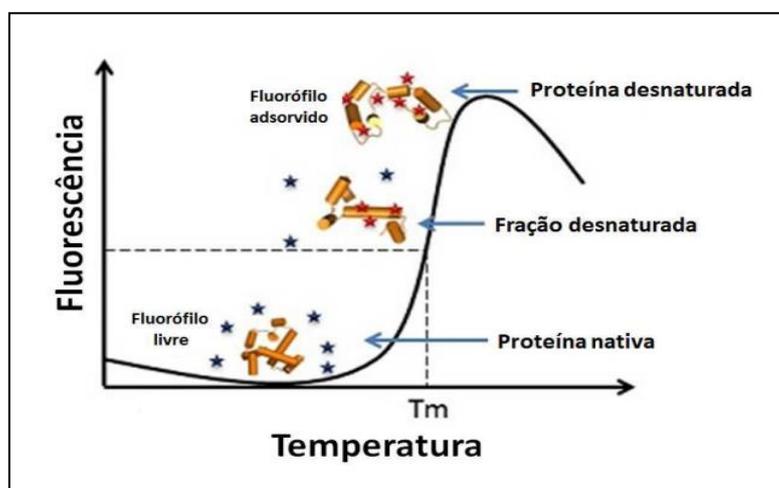
Tabela 4 – Determinação preliminar das condições ótimas para o ensaio thermofluor. Lista de tampões, pH e aditivos utilizados no *screens*.

Tampão (100 mM)	pH	Aditivos	Concentração final (mM)
Fosfato de potássio	7,0	NaCl	500
Acetato de amônio	7,3	KCl	500
Fosfato de sódio	7,5		100
TRIS	7,5	(NH ₄) ₂ SO ₄	100
Imidazol	8,0		20%
TRIS	8,0	Glicerol	10%

Fonte: REINHARD et al., 2013. Adaptado.

Seguindo a metodologia de Reinhard e colaboradores (2013), o ensaio foi realizado no equipamento de PCR em tempo real (Termociclador Eppendoff®) equipado com um sistema de detecção de PCR em tempo real de cor única e placas para PCR de 96 poços de parede fina (Applied Biosystems®). Utilizou-se a sonda fluorescente SYPRO® Orange (Molecular probes®) da qual irá interagir com as regiões hidrofóbicas da proteína que serão expostas com o aumento gradual da temperatura (Figura 14). Para tanto, a solução estoque de SYPRO® Orange (5000x) foi previamente diluída na proporção de 1:100 em água Milli-Q obtendo-se uma solução 10x concentrada. A lectina ConBr, previamente purificada e liofilizada, foi suspensa em água Milli-Q na concentração de 2 mg/mL (80 µM). As duas soluções foram utilizadas nos ensaios subseqüentes.

Figura 14 – Gráfico ilustrativo do ensaio de fluorimetria (thermofluor). Curva de desnaturação de proteínas na presença da sonda fluorescente com o aumento gradual da temperatura.



Fonte: ERICSSON et al., 2006.

Para a determinação da temperatura de *melting*, foi adicionado na placa PCR de 96 poços 2,5 µL de solução de lectina e 2,5 µL da solução de SYPRO® Orange (10x), em seguida foi adicionado 20 µL de cada solução descrita no Tabela 1, sendo o volume total de reação 25 µL para cada poço. Em seguida, as placas foram seladas com Fita de Vedação de Qualidade Óptica (Eppendoff®) e centrifugadas a 4000 xg por 2 min a 4 °C. As placas foram aquecidas de 20 a 90 °C em incrementos de 1°C no termociclador com taxa de varredura de 1 °C/min⁻¹. A tampa do termociclador foi aquecida a 100 °C para evitar efeitos de condensação durante o experimento. Para os ensaios de interação com o ligante foi utilizado 20 µL do tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,0 e o AIA, assim como, as auxinas ácido indol-3-butírico (AIB) e o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) nas concentrações 4000 µM a 10 µM.

As mudanças de fluorescência nos poços da placa foram monitoradas simultaneamente usando os comprimentos de onda 470 e 570 nm que corresponde, respectivamente, ao comprimento de excitação e emissão do SYPRO® Orange. Para análise de dados da mudança térmica e determinação da temperatura de *melting* (T_m), foi adotado o modelo de regressão não linear usando uma curva sigmoideal através da equação de Boltzmann (Equação 1) para ajustar os dados de fluorescência. A variação da temperatura de *melting* (ΔT_m) foi calculado utilizando a equação 2.

$$F(T) = F_n \left(\frac{F_u - F_n}{1 + e^{\left(\frac{T_m - T}{\alpha}\right)}} \right) \quad (1)$$

Onde, $F(T)$ é a intensidade de fluorescência na temperatura T , F_u e F_n são intensidades de fluorescência pré-transicional (nativa) e pós-transicional (*unfolder* ou desdobrada), respectivamente, e α é um fator de inclinação.

$$\Delta T_m = T_{m_2} - T_{m_1} \quad (2)$$

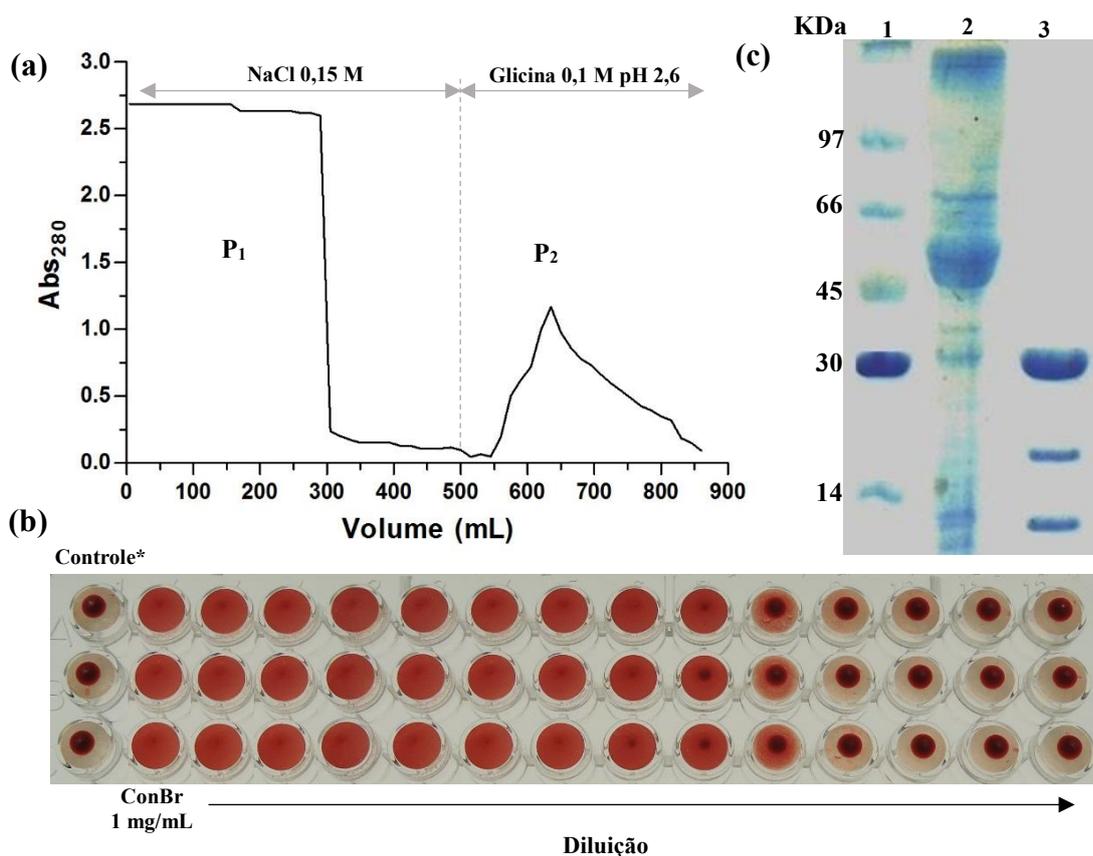
Onde, ΔT_m é a variação da temperatura de *melting*, T_{m_1} e T_{m_2} são as temperaturas de *melting* sem e com o ligante, respectivamente.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Extração e purificação da ConBr

ConBr foi isolada empregando-se cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-100. A lectina foi retida na matriz de Sephadex e eluída após a aplicação de 0,1 M glicina pH 2,6, essas frações foram denominadas de P₂ (Figura 15a) no processo cromatográfico e apresentou atividade específica de 1024 UH/mgP no ensaio hemaglutinante contra eritrócitos de coelho (Figura 15b). O perfil eletroforético da ConBr mostrou que a proteína foi obtida de forma pura e livre de contaminantes (Figura 15c). Observou-se um perfil eletroforético composto por três bandas proteicas de massa molecular aparente de 30 KDa (cadeia α), 14 KDa (cadeia β) e 12 KDa (cadeia γ), esse perfil eletroforético é característico das lectinas da família das leguminosas, resultado de clivagens da proteína durante o processamento pós-traducional, item 2.2 (VAN DAMME et al., 1998b).

Figura 15 – Purificação da ConBr. **(a)** Cromatografia de afinidade Sephadex G-100. Os valores obtidos em leitura de absorvância em comprimento de onda de 280 nm das frações de 0 a 500 mL correspondem ao pico não retido (P1) e os valores entre 550 e 875 mL correspondem ao pico retido (P2). **(b)** Atividade hemaglutinante do pico retido (P2) na purificação da ConBr. **(c)** Frações proteicas dos estágios de purificação analisadas em SDS-PAGE 12,5 % na presença de 2-mercaptoetanol. Linha 1: Padrão de massa molecular: Fosforilase b (97 KDa); Albumina (66 KDa); Ovoalbumina (45 KDa); Anidrase carbónica (30 KDa); α -lactoalbumina (14 KDa)
Linha 2: Extrato total. Linha 3: ConBr
Continuação ...



*Controle corresponde ao ensaio sem ConBr.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

Cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-50, assim como G-100, são bastante utilizadas para isolar lectinas da subtribo Diocleinae, como por exemplo, as lectinas de *Canavalia villosa*, *C. maritima*, *C. brasiliensis*, *C. oxyphylla*, *C. grandiflora* (MOREIRA, 2017; FARIAS, 2013; BARBOSA, 2013; SANTIAGO et al., 2014; CECCATO et al., 2002) entre outras. Na maioria das purificações dessas lectinas um único passo cromatográfico em coluna de Sephadex é efetivo para o processo. Desta forma, ConBr foi purificada em coluna Sephadex e subsequente utilizada nos estudos cristalográficos.

5.2 Estudos cristalográficos

5.2.1 Cristalização e difração de Raios X

A lectina de *C. brasiliensis* foi submetida ao ensaio de cristalização a partir da condição preliminar determinada por Bezerra e colaboradores (2011), essa condição foi composta por 200 mM de cloreto de sódio, 100 mM de HEPES pH 8,5 e 1,8 M de sulfato de

amônio. A gota suspensa foi composta de 1 uL da solução de cristalização acrescentando-se 1 uL de ácido indole-3-acético 6,7 mM e 1 uL da solução de proteína 12,5 mg/mL. Obtendo-se um cristal (Figura 16) com dimensões adequadas para a difração em Raios X.

Figura 16 – Fotografia do cristal da lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr). Cristal da ConBr utilizado para difração de Raios X obtido na condição de cristalização 1,8 M de sulfato de amônio, 0,2 M de NaCl, 0,1 M de HEPES pH 8,5, solução de proteína 12,5 mg/mL e solução de ácido indole-3-acético 6,7 mM.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

A estrutura cristalográfica da ConBr complexada com o AIA, foi resolvida com uma resolução de 2,2 Å, onde o cristal, pertencente ao grupo espacial ortorrômbico $I222$, apresentou uma célula unitária com os seguintes parâmetros (Å): $a = 67,81$, $b = 72,43$, $c = 99,27$. A unidade assimétrica apresentou apenas uma molécula com 237 resíduos de aminoácidos, indicando a presença de um monômero, com um coeficiente de Matthews (MATTHEWS, 1968) igual a 2,39 Å³ Da⁻¹, com presença de 48,56% de solvente. Os dados escalonados encontram-se descritos na tabela 5. A qualidade estereoquímica da estrutura foi comprovada a partir do gráfico de Ramachandran, gerado pelo programa Molprobity (CHEN et al., 2010), que analisa as torções dos ângulos Φ e Ψ . O gráfico do monômero da ConBr complexado ao AIA mostrou que nenhum resíduo estava em regiões não permitidas e 3,4% dos resíduos presentes estavam em regiões adicionalmente permitidas (Figura 17).

Tabela 5 – Estatísticas da coleta de dados de difração de Raios X da lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) em complexo a auxina ácido indole-3-acético (AIA).

Coleta de dados	
Fonte	LNLS - MX2
Comprimento de onda (Å)	1,458
Resolução (Å)	49,50 – 2,2 (2,27 – 2,2)
Grupo especial	<i>I</i> 222
Célula unitária (Å)	a = 67,81, b = 72,43 c = 99,27
Moléculas / unidade assimétrica	1
Reflexões únicas	12526 (890)
Completeza (%)	98,3 (82,8)
R _{meas} ^b	0,048 (0,240)
R _{pim} ^c	0,019 (0,111)
R _{merge}	0,044 (0,212)
CC(1/2)	1,0 (0,995)
Multiplicidade	11,9 (8,4)
I/1/4(I)	31,1 (7,1)
B _{Wilson} (Å ²)	37,75
Software para integração	XDS
Software para escalonamento	Scala
Refinamento de dados	
R _{cryst} ^d / R _{free} ^e	0,191/ 0,236
Nº de reflexões para R _{free} (%)	5
R.m.s.d. ligações (Å)	0,005
R.m.s.d. ângulos (°)	1,283
Software para refinamento	PHENIX
Método de refinamento	ML/TLS
Gráfico de Ramachandran	
Resíduos em regiões mais favoráveis (%)	96,6
Resíduos em regiões adici. permitidas (%)	3,4
Resíduos em regiões não permitidas (%)	0

Legenda:

^a Valores em parêntesis são relativos a camada de maior resolução.

$$b \quad R_{meas} = \frac{\sum_h \sqrt{\frac{n_h}{n_h - 1}} \sum_i^{n_h} |I_h - I_{h,i}|}{\sum_h \sum_i^{n_h} I_{h,i}} \quad \text{with } \hat{I}_h = \frac{1}{n_h} \sum_i^{n_h} I_{h,i}$$

$$c \quad R_{pim} = \sum_{hkl} \sqrt{\frac{1}{N-1}} \sum_i |I_i(hkl) - \overline{I(hkl)}| / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)$$

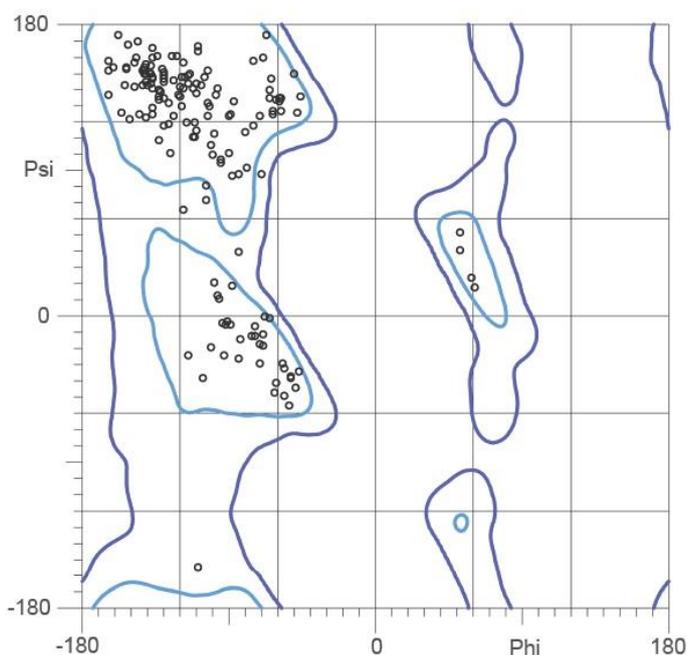
Onde $I(hkl)$ é a intensidade de múltiplas $I_i(hkl)$ observações de reflexões simetricamente relacionadas, N é redundância, n_h é a multiplicidade, \hat{I}_h é intensidade média e $I_{h,i}$ é intensidade observada.

$$d \quad R_{cryst} = \Sigma |F_o - F_c| / \Sigma F_o$$

^e R_{free} é a validação cruzada de R_{factor} computado por um conjunto de reflexões (5 %) omitidas do processo de refinamento.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

Figura 17 – Gráfico de Ramachandran das coordenadas da lectina de *Canavalia brasiliensis* complexada ao ácido indole-3-acético.



Os aminoácidos estão representados em pontos. As regiões mais favoráveis estão limitadas com linhas azul claro, as regiões adicionais mais permissivas estão limitadas com linha azul escuro e as regiões não permissivas estão fora dessas regiões.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

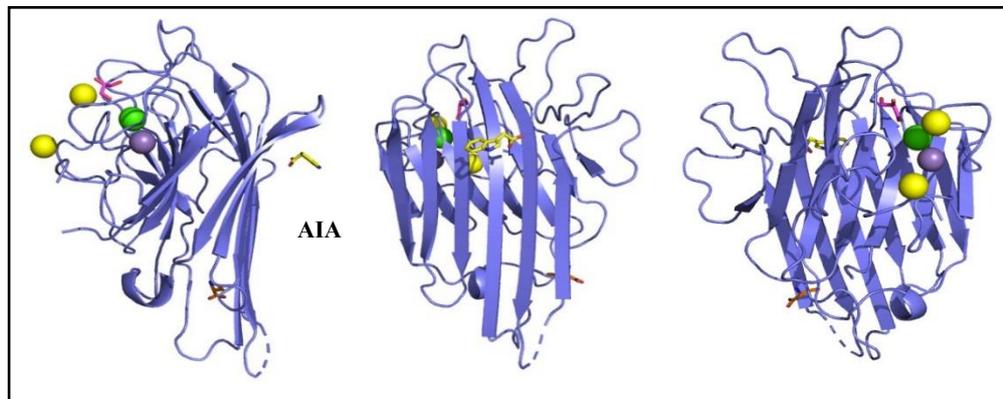
5.2.2 Estrutura geral do complexo de ConBr e AIA

A estrutura geral do monômero da lectina de *Canavalia brasiliensis* complexada com o AIA apresenta 237 resíduos de aminoácidos, 52 moléculas de água, um íon cálcio, um íon manganês, dois íons cloros, uma molécula de glicerol no sítio de reconhecimento a carboidrato e uma molécula de ácido α -aminobutírico (ABU). A presença da densidade eletrônica para a molécula de ABU no mapa fo-fc próximo aos resíduos Leu115, Leu126 e Val179, encontrado neste presente trabalho, é decorrente de uma co-purificação da ConBr com o ABU. O ABU é um aminoácido não proteico, envolvido em processos de defesa em plantas, segundo Delatorre e colaboradores (2007) essa molécula é comumente co-purificada com as lectinas da subtribo *Diocleinae* como foi descrita na estrutura de *Canavalia gladiata*. Vale ressaltar, que esses resíduos de aminoácidos que interagem com o ABU compõem um sítio hidrofóbico e são conservados em lectinas de leguminosas.

Dos 237 resíduos de aminoácidos presentes na estrutura primária de ConBr, todos foram identificados no mapa de densidade eletrônica, exceto pelos aminoácidos do *loop* 117-122 ($^{116}\text{SNTNA}^{126}$) que se apresentaram instáveis, produzindo densidades eletrônicas fracas, como reportado por Bezerra e colaboradores (2011). O *loop* 117-122 corresponde a uma região de alta flexibilidade da ConBr, bem como das lectinas da subtribo *Diocleinae*, decorrente do mecanismo pós-traducional de permuta circular (detalhes no item 2.2). Esse processo consiste na quebra proteolítica da cadeia polipeptídica da pro-lectina (lectina imatura) para haja um rearranjo das cadeias β e γ da lectina na forma madura, exatamente o local da religação das cadeias polipeptídicas β e γ corresponde à região do *loop* 117-122, desta forma, produzindo baixas densidades eletrônicas na região durante a difração do cristal.

O monômero de ConBr (Figura 18) apresenta uma conformação estrutural típica de lectinas de leguminosas, β -sanduíche, onde a orientação antiparalela das folhas β , e a mudança entre uma face e outra, forma uma estrutura rígida forte, semelhante a um sanduíche (CHANDRA et al., 2001). Observa-se também, um íon cálcio e um íon manganês próximos ao sítio de interação a carboidratos. O monômero é composto por 12 folhas β e 1 pequena hélice α , sendo interligadas por *loops*.

Figura 18 – Estrutura geral no monômero da lectina de *Canavalia brasiliensis* em complexo com o ácido indole-3-acético.

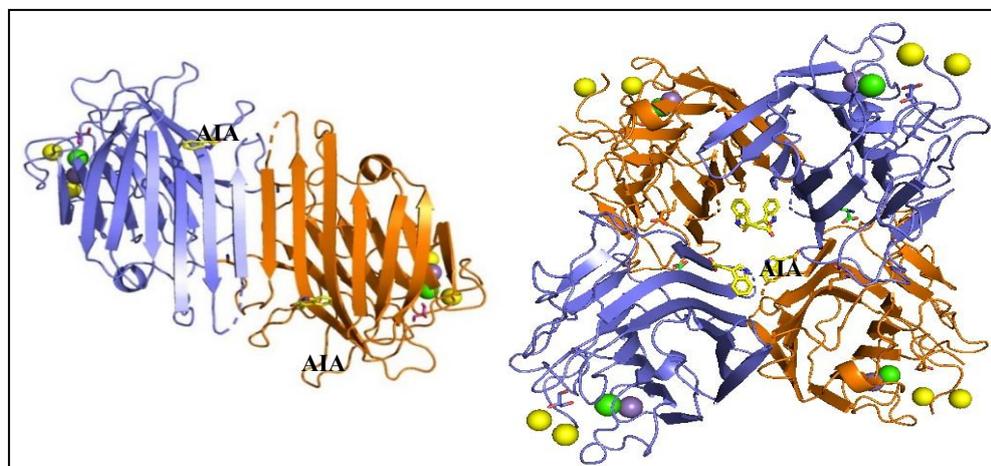


Os íons Ca^{+2} , Mn^{+2} e Cl^- estão representados, respectivamente, por esferas nas cores verde, roxo e amarelo. A molécula do ligante ácido indole-3-acético está representada em amarelo e a molécula do α -aminobutírico (ABU) em roxo.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

Como reportado pelo trabalho de Delatorre (2013), os primeiros a caracterizarem a estrutura tridimensional de uma lectina do gênero *Canavalia* complexada com um hormônio vegetal. ConBr apresenta grande homologia em seu arranjo quaternário dentre as outras lectinas do gênero *Canavalia*. O arranjo biológico da estrutura tridimensional tetramérica de ConBr apresentou-se formada por dímeros canônicos (Figura 19). É possível observar a molécula de AIA no centro do tetrâmero na interface dimérica, bem como, os metais Ca^{+2} e Mn^{+2} situados no sítio de ligação a metais.

Figura 19 – Visão geral da estrutura dimérica e tetramérica da lectina de *Canavalia brasiliensis* em complexo ácido indole-3-acético.



Os íons Ca^{+2} , Mn^{+2} e Cl^- estão representados, respectivamente, por esferas nas cores verde, roxo e amarelo. A molécula do ligante ácido indole-3-acético está representada em amarelo.

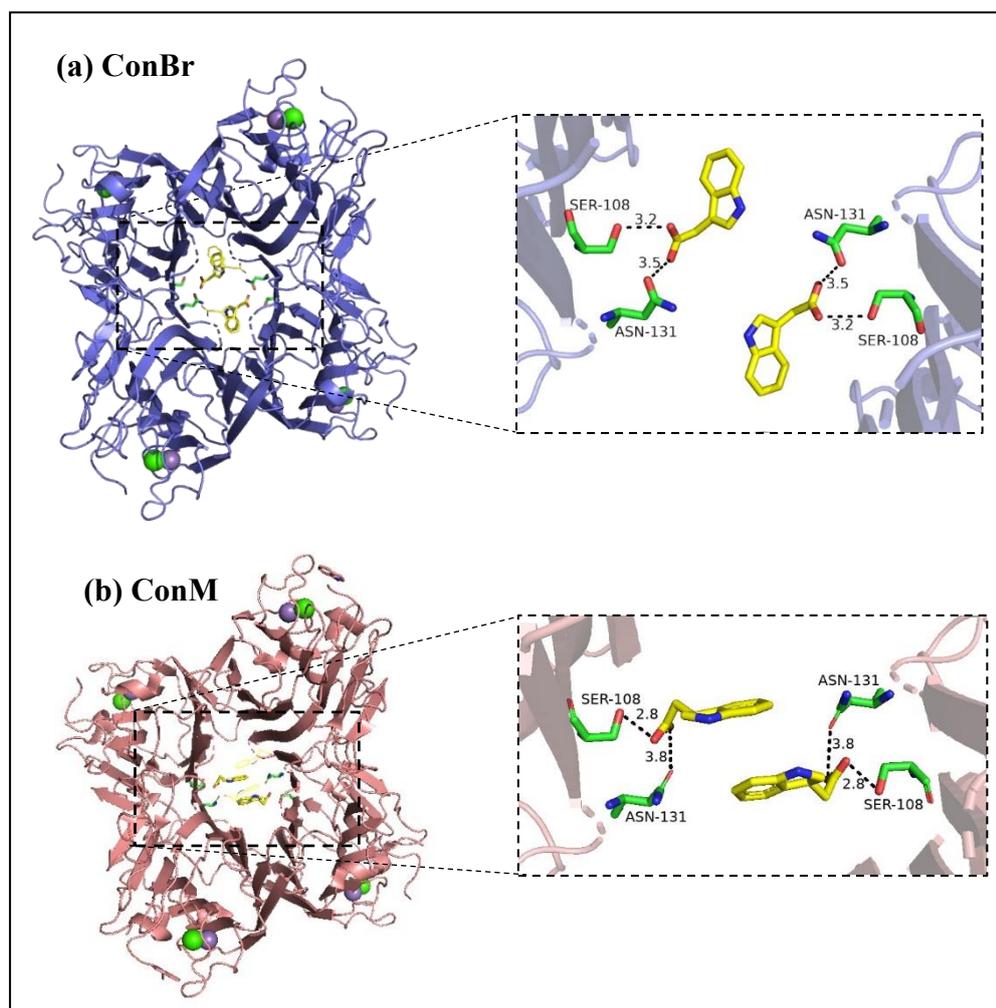
Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

5.2.3 Sítio de ligação ao AIA

Um mapa de diferença Fo-Fc característico para o AIA foi observado próximo aos resíduos Ser108 e Asn131, cujas coordenadas assemelham-se com as descritas por Delatorre e colaboradores em 2013 na lectina de *Canavalia maritima*. Após seu posicionamento, adição das moléculas de água, ciclos de refinamento e criação de um modelo tetramérico baseado em cálculos de simetria através do programa PyMol (DELANO, 2004). Foi verificado que o AIA se encontra na cavidade central polar da estrutura do tetrâmero e não no local de alta afinidade hidrofóbica descrito para as lectinas da família das leguminosas (EDELMAN; WANG, 1978; YANG; GALL; EDELMAN, 1974). Delatorre e colaboradores (2013) sugerem que a carga negativa do AIA impede sua ligação estereoquímica a esse sítio hidrofóbico de alta afinidade. É importante ressaltar que baseado em sua localização, a estabilização do AIA também pode ocorrer através de sua interação com outros resíduos que fazem parte do *loop* 117-122, o qual não pôde ser modelado no presente trabalho, apresentaram-se instáveis, produzindo densidades eletrônicas fracas, como reportado pelos trabalhos anteriores (BEZERRA et al., 2011).

O posicionamento das moléculas do AIA encontradas no tetrâmero da ConBr difere daquele encontrado na estrutura da ConM (Figura 20). Apesar da interação com os mesmos resíduos de aminoácidos, nota-se que as distâncias entre esses resíduos e a molécula de AIA são distintas. Na lectina de *C. brasiliensis* a estabilização do grupamento indol da molécula do AIA ocorre pelos resíduos de Thr49 e Thr196 do monômeros, ambos com comprimento de 4,0 Å, contribuindo para a aproximação da carboxila do AIA ao resíduo Asn131, ao comparar com a lectina de *C. marítima*, essa estabilização do indol ocorre por outro grupo indol da molécula de AIA do monômero do dímero oposto.

Figura 20 – Modelo tetrâmico da lectina de *Canavalia brasiliensis* (a) e *Canavalia maritima* (b) complexadas ao ácido indole-3-acético (AIA).



*As moléculas do ácido indole-3-acético dos monômeros B e D não estão sendo mostradas na ilustração.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

A molécula do AIA interage com a proteína através de ligações de hidrogênios pelos resíduos Ser108 e Asn131 (Tabela 6). O oxigênio OG da Ser108 formou uma ligação de hidrogênio com o átomo de oxigênio O3 do AIA de 3,2 Å. O oxigênio da hidroxila OD1 do Asn131 formou duas ligações de hidrogênio uma com o oxigênio O3 do AIA e uma adicional com a molécula de água número 6 com comprimentos de 3,5 e 3,2 Å, respectivamente. Como já foi mencionado, a molécula do AIA de um monômero não é coordenada por outras moléculas de AIA dos outros monômeros do tetrâmico, além disso, o anel benzênico do indol está posicionado próximo aos resíduos de Thr49 e Thr196, indicando hipoteticamente a existência de uma movimentação do indol próximo a esses resíduos (Figura 21).

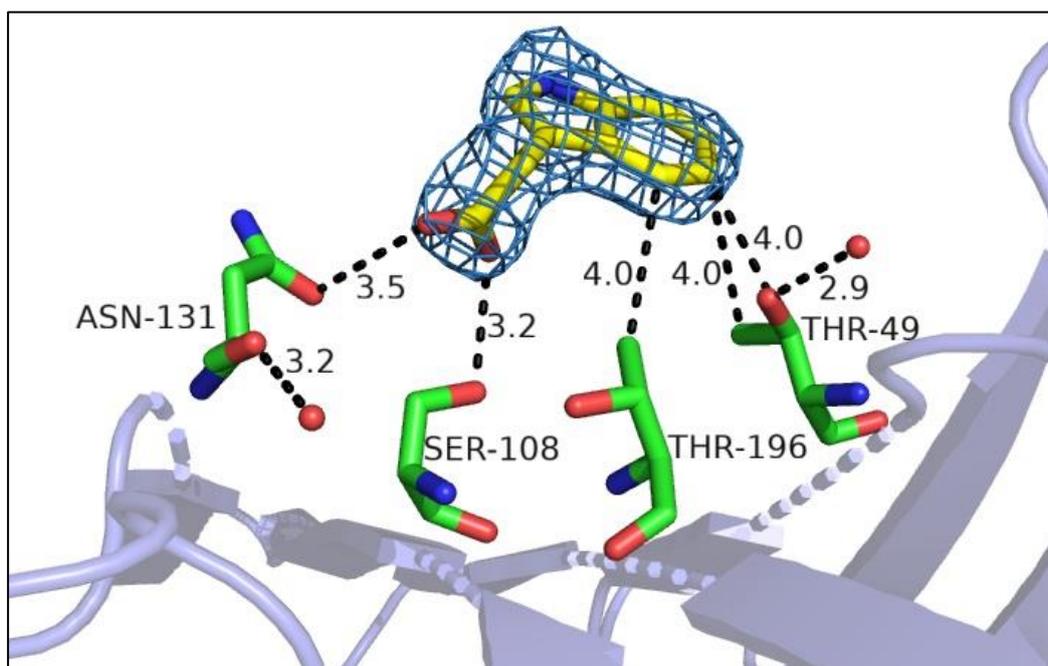
Tabela 6 – Distâncias em angstroms (Å) relativas entre os átomos que coordenam a molécula do ácido indole-3-acético em seu sítio de ligação na lectina de *Canavalia brasiliensis*.

AIA	Ser108		Asn131	Thr49			Thr196
	OG	CB	OD1	OG1	CB	CG2	CG2
O2			3,5*				
O3	3,2*						
C2							4,2
C3				3,2	4,0	4,0	
C18		4,2					4,2
HOH6			3,2*				
HOH9				2,9*			

*Ligação de hidrogênio; Legenda: O = oxigênio; OD = oxigênio delta; OG = oxigênio gama; N = nitrogênio; C = carbono; CB = carbono beta; HOH = molécula de água.

Fonte: Elaborada pelo autor, 2019.

Figura 21 – Sítio de ligação do ácido indole-3-acético (AIA). Monômero da lectina de *Canavalia brasiliensis* interagindo com a molécula de AIA.



Densidade eletrônica $2F_o - F_1$ a 1 sigma, resíduos de aminoácidos em verde, a molécula de AIA em amarelo e as moléculas de água representadas com esferas vermelhas. Comprimento das ligações em angstrom (Å).

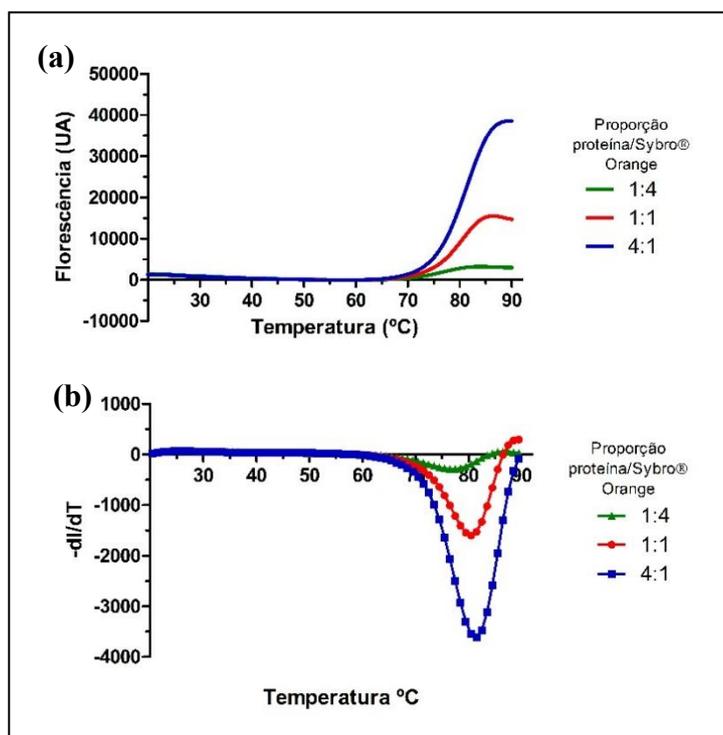
Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

5.3 Ensaio Thermofluor

5.3.1 Determinação da proporção SYBRO® Orange e ConBr

O ensaio preliminar para determinar a quantidade de corante e proteína foi realizado utilizando três proporções (v/v) do SYBRO® Orange (10X) e da ConBr (2 mg/mL) para escolher a curva de desnaturação térmica que apresentava o melhor sinal de detecção. O desdobraimento da proteína foi monitorado seguindo o aumento da fluorescência, devido à maior ligação com o fluoróforo ao estado desnaturado da proteína. As diferentes curvas de desnaturação da ConBr foram analisadas (Figura 22a) e foi calculada a primeira derivada (Figura 22b) para determinar a temperatura de *melting* da proteína em cada ensaio, desta forma, auxiliando na determinação da melhor curva.

Figura 22 – Determinação do parâmetro de concentração da lectina de *Canavalia brasiliensis* com o corante SYBRO® Orange para o ensaio de thermofluor, análise da fluorescência (a) e da derivada negativa (b).



Concentração: SYBRO® Orange (10X) e da ConBr (2 mg/mL). A proporção foi dada em microlitros (μL).

Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

As curvas que apresentaram o melhor sinal continham a relação 1:1 e 4:1 (v/v) que

corresponde, respectivamente, a concentração de 40 μM (1 mg/mL) e 64 μM (1,6 mg/mL) da proteína em relação a metade da concentração do corante (10X). Sabe-se o SYPRO® Orange possui baixo rendimento quântico em solução aquosa, mas é altamente fluorescente em ambientes não polares com baixas constantes dielétricas, como sítios hidrofóbicos nas proteínas (ERICSSON et al., 2006). Desta forma, a medida que a proteína começa a se desdobrar, com o aumento da temperatura, o corante se liga às partes hidrofóbicas expostas da proteína, resultando em um aumento significativo na emissão de fluorescência. A intensidade da fluorescência atinge um máximo e depois começa a diminuir, devido à precipitação do complexo da sonda fluorescente e da proteína desnaturada. Contudo, para os ensaios subsequentes foi utilizado a proporção 1:1, que apresentou um bom sinal em relação a baixa concentração de proteína em solução.

5.3.2 Determinação do tampão e aditivos para o ensaio do thermofluor

A formulação ideal, composta do tampão e aditivos, é aquela em que se observa apenas uma transição (estado dobrado-desdobrado) com um aumento de T_m em relação ao tampão inicial de purificação. Este aumento significa que a proteína é mais estável e, portanto, é necessária mais energia (calor) para desdobrá-la (SANTOS et al., 2012).

A determinação das condições otimizadas de tampão e aditivos, consistiu num conjunto fatorial de 8 tampões e 4 aditivos (em duas concentrações) diferentes (Tabela 4), totalizando 64 condições. Os valores de T_m encontrados em cada condição foram comparados com os valores de T_m para o experimento controle (H_2O), e a mudança na temperatura de desdobramento, ΔT_m , foi calculada. A tabela 7 apresenta os dados de ΔT_m encontrados para cada uma das condições.

Mudanças relativamente grandes no ΔT_m foram observadas ao variar os tampões (Tabela 7), onde 14 condições foram mais favoráveis para a estabilização da ConBr, principalmente aqueles que continham o glicerol, o que é esperado devido a facilidade da qual a molécula de glicerol forma ligações de hidrogênio e estabiliza a estrutura da proteína (LIU et al., 2009; CHEN BHANDARI; ZHOU, 2019). Um ΔT_m positivo pode ser relacionado a um aumento na ordem estrutural e uma flexibilidade conformacional reduzida, enquanto uma diminuição na estabilidade, ΔT_m negativo, indica que a condição induz alterações estruturais na proteína em direção a uma conformação mais desordenada ou sinal de dobramento incorreto.

Tabela 7 – Temperatura de *melting* (T_m) da lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) em diferentes soluções tampões, a partir do ensaio thermofluor.

Tampão	T_m (°C)	Desvio	ΔT_m
H ₂ O	77,61	0,57	0,00
Glicerol 20%	91,72	0,40	14,11
Glicerol 10%	82,48	0,15	4,86
TRIS 100 mM pH 7,5 Glicerol 20%	81,49	1,42	3,88
TRIS 100 mM pH 7,5	80,92	0,80	3,30
TRIS 100 mM pH 7,0	80,90	0,47	3,29
Acetato de Amônio 100 mM pH 7,3	79,41	1,75	1,80
Acetato de Amônio 100 mM pH 7,3 + Glicerol 20%	79,19	0,51	1,58
TRIS 100 mM pH 7,0 Glicerol 20%	79,15	1,05	1,54
TRIS 100 mM pH 8,0 Glicerol 20%	79,07	1,94	1,46
TRIS 100 mM pH 7,0 Glicerol 10%	78,80	0,62	1,19
TRIS 100 mM pH 7,5 Glicerol 10%	78,47	0,90	0,86
TRIS 100 mM pH 7,0 + KCl 500 mM	78,15	0,21	0,54
Acetato de Amônio 100 mM pH 7,3 + Glicerol 10%	78,13	0,93	0,52
TRIS 100 mM pH 8,0 Glicerol 10%	77,62	0,83	0,01
TRIS 100 mM pH 7,0 + KCl 100 mM	76,79	0,29	-0,83
Imidazol 100 mM pH 8,0 Glicerol 20%	76,59	0,40	-1,02
TRIS 100 mM pH 7,0 + NaCl 500 mM	76,11	1,24	-1,50
Acetato de Amônio 100 mM pH 7,3 + KCl 100 mM	75,61	1,90	-2,00
TRIS 100 mM pH 7,0 + NaCl 100 mM	75,50	2,62	-2,11
TRIS 100 mM pH 7,5 + NaCl 100 mM	75,37	2,34	-2,25
TRIS 100 mM pH 7,5 + KCl 500 mM	74,98	0,76	-2,63
TRIS 100 mM pH 8,0	74,98	0,45	-2,64
Acetato de Amônio 100 mM pH 7,3 + KCl 500 mM	74,97	0,66	-2,65
KCl 100 mM	74,25	0,28	-3,36
NaCl 100 mM	74,14	0,12	-3,48
Imidazol 100 mM pH 8,0 Glicerol 10%	74,11	0,22	-3,51
TRIS 100 mM pH 7,5 + KCl 100 mM	74,05	1,20	-3,56
TRIS 100 mM pH 7 (NH ₄) ₂ SO ₄ 100mM	74,05	0,33	-3,56
KCl 500 mM	73,93	0,76	-3,68
TRIS 100 mM pH 7,5 + NaCl 500 mM	73,78	0,16	-3,83
Acetato de Amônio 100 mM pH 7,3 (NH ₄) ₂ SO ₄ 100mM	73,19	0,46	-4,43
Acetato de Amônio 100 mM pH 7,3 + NaCl 500 mM	72,89	1,29	-4,72
NaCl 500 mM	72,55	0,24	-5,06
TRIS pH 7,5 + (NH ₄) ₂ SO ₄ 100mM	72,07	1,03	-5,54
Imidazol 100 mM pH 8,0	71,64	0,42	-5,97
Imidazol 100 mM pH 8,0 + NaCl 100 mM	71,00	1,98	-6,61
(NH ₄) ₂ SO ₄ 100 mM	70,82	0,67	-6,80
Fosfato de Potássio 100 mM pH 7 + NaCl 100 mM	69,92	0,83	-7,70
TRIS 100 mM pH 8,0 + KCl 100 mM	69,90	1,79	-7,72
TRIS 100 mM pH 8,0 + NaCl 500 mM	69,52	3,01	-8,09

Continua

Temperatura de *melting* (T_m) da lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) em diferentes soluções tampões, a partir do ensaio thermofluor.

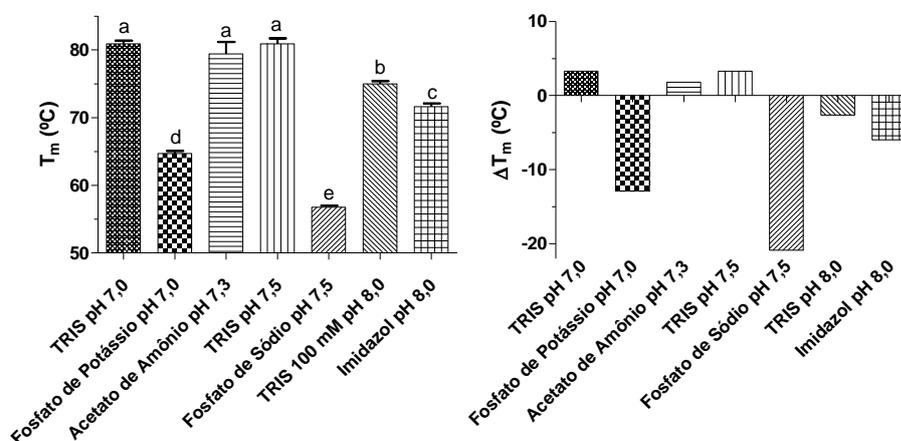
Conclusão

Tampão	T_m (°C)	Desvio	ΔT_m
TRIS 100 mM pH 8,0 + KCl 500 mM	69,18	1,25	-8,43
Fosfato de Potássio 100 mM pH 7 + Glicerol 20%	68,76	0,93	-8,85
TRIS 100 mM pH 8 + (NH ₄) ₂ SO ₄ 100mM	68,68	0,32	-8,93
Fosfato de Potássio 100 mM pH 7 + NaCl 500 mM	67,90	1,93	-9,71
Acetato de Amônio 100 mM pH 7,3 + NaCl 100 mM	67,82	2,14	-9,80
Fosfato de Potássio 100 mM pH 7 + KCl 500 mM	67,25	0,52	-10,37
Fosfato de Potássio 100 mM pH 7 + Glicerol 10%	66,36	0,58	-11,25
Fosfato de Potássio 100 mM pH 7 +(NH ₄) ₂ SO ₄ 100 mM	64,92	0,55	-12,69
Fosfato de Potássio 100 mM pH 7	64,71	0,40	-12,91
TRIS 100 mM pH 8,0 + NaCl 100 mM	64,42	1,53	-13,19
Fosfato de Potássio 100 mM pH 7 + KCl 100 mM	63,41	0,06	-14,21
Imidazol 100 mM pH 8,0 + KCl 100 mM	62,96	2,16	-14,65
Fosfato de Sódio 100 mM pH 7,5 + KCl 500 mM	61,52	1,38	-16,10
Fosfato de Sódio 100 mM pH 7,5 + NaCl 500 mM	61,46	1,35	-16,16
Imidazol pH 8,0 + (NH ₄) ₂ SO ₄ 100 mM	61,21	1,39	-16,40
Fosfato de Sódio 100 mM pH 7,5 + (NH ₄) ₂ SO ₄ 100	60,99	1,44	-16,62
Fosfato de Sódio 100 mM pH 7,5 + Glicerol 20%	60,63	1,22	-16,98
Imidazol 100 mM pH 8,0 + KCl 500 mM	60,48	0,78	-17,14
Imidazol 100 mM pH 8,0 + NaCl 500 mM	60,47	0,06	-17,14
Fosfato de Sódio 100 mM pH 7,5 + NaCl 100 mM	60,08	3,39	-17,53
Fosfato de Sódio 100 mM pH 7,5 + Glicerol 10%	59,56	0,87	-18,06
Fosfato de Sódio 100 mM pH 7,5 + KCl 100 mM	58,99	1,34	-18,62
Fosfato de Sódio 100 mM pH 7,5	56,75	0,27	-20,86

Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

Os tampões TRIS 100 mM pH 7,5, TRIS 100 mM pH 7,0 e Acetato de Amônio 100 mM pH 7,3 foram os tampões mais estabilizadores sem o glicerol, enquanto o tampão Fosfato de Sódio 100 mM pH 7,5 desestabilizou significativamente a ConBr (Figura 23). Sugerindo que o efeito desestabilizador do tampão fosfato de sódio está relacionado com propriedades intrínseca do tampão e não relacionadas com o pH.

Figura 23 – Temperatura de *melting* (T_m) da lectina de *Canavalia brasiliensis* em diferentes tampões.



As letras em minúsculo representam os resultados do teste Tukey ($p < 0,05$). As médias com as mesmas letras dentro de cada parâmetro avaliado não diferem entre si.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

Segundo Santos e colaboradores (2012), o desdobramento das proteínas é um processo cooperativo, o desdobramento de uma pequena região da proteína deve induzir o desdobramento imediato do núcleo da proteína remanescente. Assim, um tampão ótimo de estabilização das proteínas deve apresentar uma transição de desnaturação térmica brusca e rápida entre os estados dobrado e desdobrado, detectado através de altos declives de transição, em paralelo com uma maior T_m .

Espera-se que o efeito molecular de uma solução tampão em uma proteína específica seja o controle do pH de grupos de titulação nos resíduos de aminoácidos, afetando estruturas locais e potencialmente alguns efeitos iônicos globais na proteína. No entanto, interações específicas entre tampões e proteínas não são incomuns. Mais de 250 estruturas depositadas no Banco de Dados de Proteína (PDB) contêm os tampões MES, HEPES ou TRIS (NEWMAN, 2004) ordenando suas estruturas.

Para os ensaios de estabilidade térmica da ConBr na presença de auxinas foi selecionado o tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,5, tendo em vista avaliar o comportamento da auxina em uma condição onde a lectina não esteja totalmente estável possibilitando a visualização de possíveis variações da sua termoestabilidade.

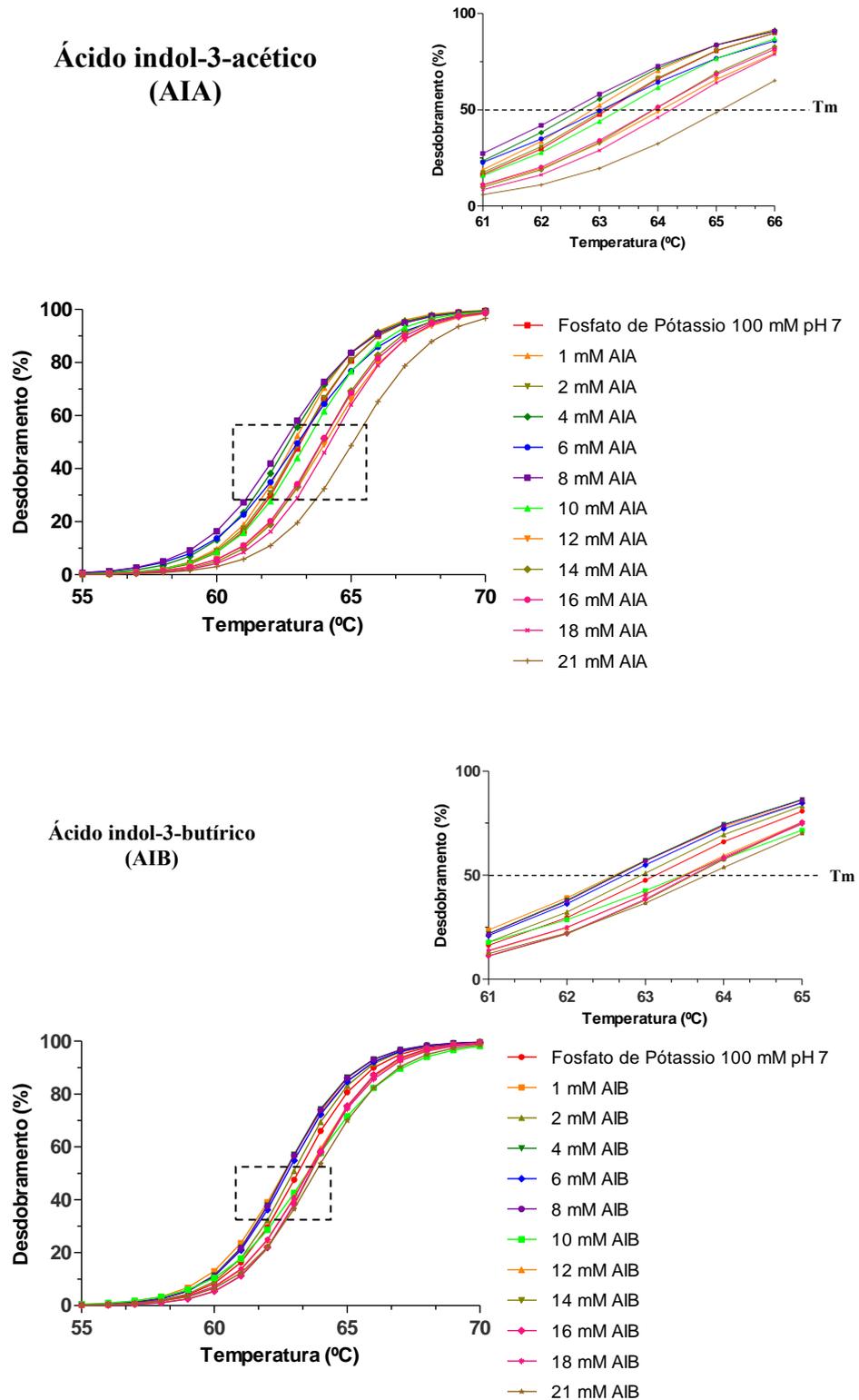
5.3.3 Influência de auxinas na estabilidade térmica da ConBr

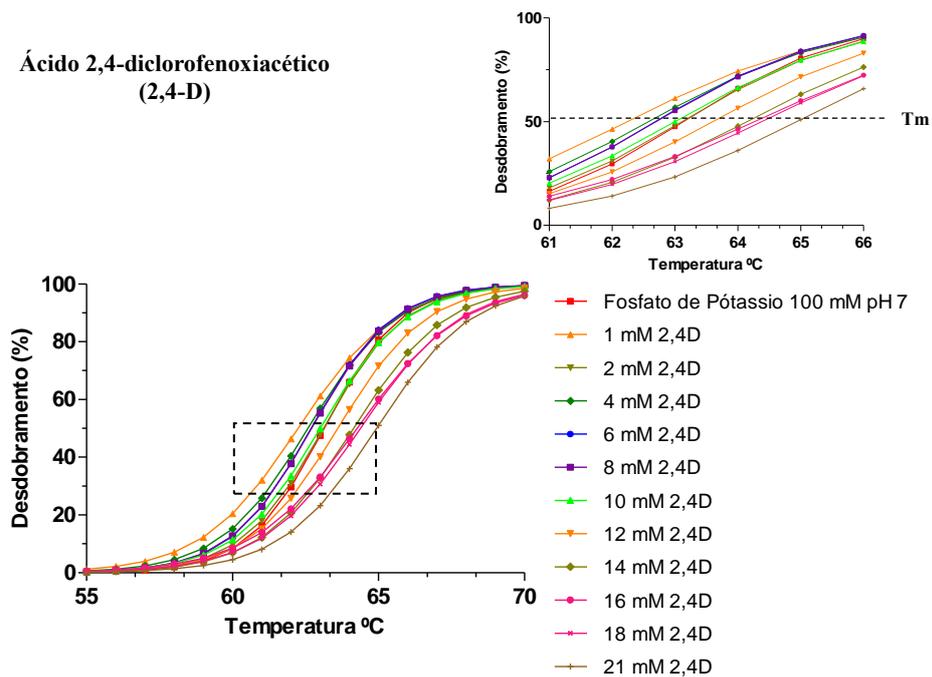
A associação de ligantes com proteínas envolve tipicamente alterações nas interações inter- e intramoleculares, além da dinâmica dos componentes do sistema, que incluem a proteína, o ligando, ou qualquer componente adicional que possam estar presentes na reação (SALEMME; SPURLINO; BONE, 1997). O equilíbrio dessa interação geralmente aumenta a estabilidade térmica da proteína em uma quantidade proporcional à concentração e afinidade do ligante (WEBER; SALEMME, 2003).

A interação da ConBr com as auxinas AIA, AIB e 2,4D foi avaliada através do ensaio do thermofluor. O monitoramento da fluorescência do SYBRO® Orange foi realizado com o aumento gradual da temperatura. Os dados de fluorescência foram normalizados, determinando-se as temperaturas de *melting* da ConBr para as diferentes concentrações das auxinas. As curvas de desnaturação térmica da proteína são mostradas na Figura 24.

O ensaio de thermofluor mostra que a ConBr é uma proteína resistente ao aquecimento, começando a mudar o seu perfil de desdobramento entre 60 a 70 °C, e em torno de 70 a 80 °C já possui sua estrutura completamente desdobrada pelo aquecimento. A termoestabilidade que a ConBr exhibe é uma característica comum das lectinas de leguminosas (SRINIVAS et al., 2011). Vale ressaltar que a termoestabilidade da ConBr é melhorada em diferentes condições já descritas no item 4.3.2.

Figura 24 – Dados normalizados das curvas de desnaturação térmica da lectina de *Canavalia brasiliensis* na presença de auxinas: (a) ácido indole-3-acético (AIA), (b) ácido indol-3-butírico (AIB) e (c) ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D).

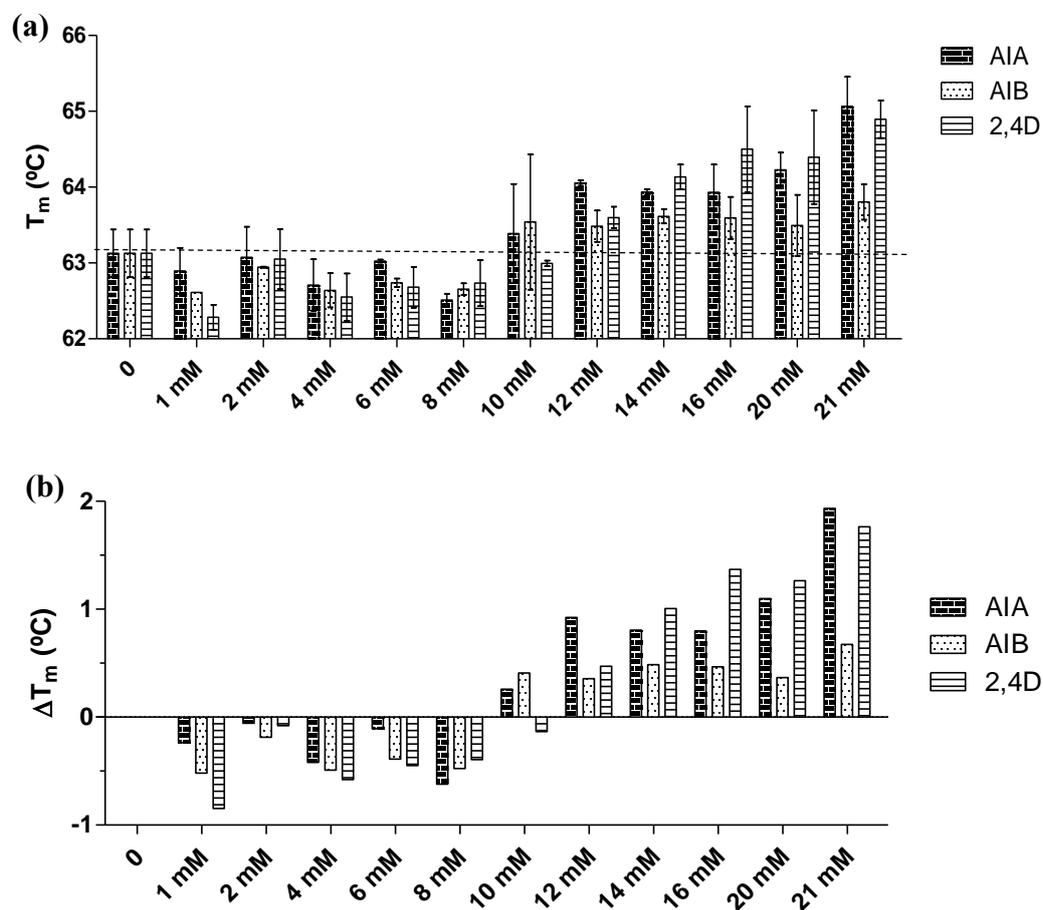




Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

Os resultados mostraram que altas concentrações das auxinas (10 a 21 mM) elevou a temperatura de *melting* da ConBr entre 0,3 a 2 °C (Figura 25), mostrando a necessidade de concentrações elevadas do ligante para que haja o incremento na estabilidade estrutural da proteína, indicando uma natureza transitória dessa interação. O AIA não interage na região hidrofóbica de alta afinidade da lectina, como foi observado na análise estrutural feita neste trabalho, bem como é reportado por outros autores (DELATORRE, 2013), isso explica a necessidade de altas concentrações da auxina para deslocar o equilíbrio em direção a interação das moléculas no sitio de interação da ConBr. Contudo, neste trabalho não foi possível calcular a constante de dissociação (K_d) da ConBr com os fitohormônios AIA, AIB e 2,4D, devido à baixa solubilidade dessas moléculas em concentrações mais elevadas.

Figura 25 – (a) Temperatura de *melting* (T_m) e (b) Variação da temperatura de *melting* (ΔT_m) da lectina de *Canavalia brasiliensis* na presença de ácido indole-3-acético (AIA), ácido indol-3-butírico (AIB) e ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D).

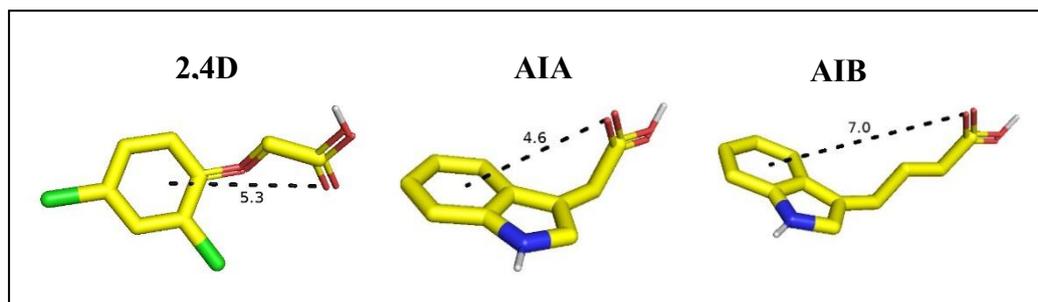


Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

Não existe na literatura, a estrutura cristalográfica de lectinas vegetais com as auxinas AIB e 2,4D, bem como, não se compreende profundamente o local de interação dessas auxinas na estrutura da proteína. Contudo, ao comparar a estabilidade térmica da ConBr em contato com as auxinas AIB, 2,4D e AIA, nota-se que é semelhante, provavelmente devido à similaridade estrutural das auxinas, mesmo na auxina de ocorrência não natural como o 2,4D. Embora, as auxinas sejam um grupo quimicamente diverso, uma característica comum de todas as auxinas ativas é a distância molecular de cerca de 5 Å entre a carga positiva fracionária no anel aromático e um grupo carboxila carregado negativamente (TAIZ, 2013). O AIB foi a auxina que menos contribuiu para a estabilidade térmica da ConBr com menos de 1 °C em relação ao AIA e 2,4D, e nota-se que o AIB é a auxina que apresenta a maior distância molecular entre as

cargas (Figura 26), sugerindo que a distância entre o anel aromático e a carboxila da auxina pode estar relacionado com o grau de estabilização conformacional da ConBr.

Figura 26 – Distância molecular em angstroms (Å) do anel aromático em relação a um grupo carboxila das auxinas ácido indole-3-acético (AIA), ácido indol-3-butírico (AIB) e ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D).



Legenda: Átomos de carbono em amarelo, oxigênio em vermelho, nitrogênio em azul, cloro em verde e hidrogênio polar em cinza.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

Entretanto, observou-se que baixas concentrações (1 a 8 mM) das auxinas diminuiu em menos de 1 °C a temperatura de *melting* da ConBr. Sugerindo que baixas concentrações de auxinas deslocam o equilíbrio da interação para o estado desdobrado da proteína, isso explicaria a diminuição da temperatura de *melting* da ConBr. Segundo Cimmerman e colaboradores (2008) se o ligante se liga ao estado desdobrado mais fortemente do que ao estado nativo, então a proteína é desestabilizada pelo ligante. Por outro lado, se o ligante se liga à forma nativa mais fortemente do que ao estado desdobrado, então a proteína é estabilizada pelo ligante.

6 CONCLUSÃO

O sitio de interação da ConBr com o AIA é conservado ao comparar com a lectina de *Canavalia marítima*, mas o posicionamento dos grupos indóis das moléculas do AIA na estrutura da ConBr impossibilita o empilhamento de interações hidrofóbicas entre os anéis da auxina. Além disso, existem evidências que as auxinas AIA, AIB e 2,4D apresentem diferentes afinidades com a ConBr, por mais que essas afinidades não possam ser medidas, essas evidências mostram que essas auxinas apresentam uma afinidade baixa.

REFERÊNCIAS

- ABREU et al. SAM of Gliotoxin on Gold: A Natural Product Platform for Sugar Recognition based on the Immobilization of *Canavalia brasiliensis* lectin (ConBr). **Electrochimica Acta**, [s.l.]: v. 241, (1), pp. 116-123, 2017.
- ADAMS, P. D. et al. Phenix: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. **Acta Crystallographica**. [s.l.]: Section D. 66, pp. 213–21, 2010.
- ARAÚJO, L. C. C. et al. Evaluation of cytotoxic and anti-inflammatory activities of extracts and lectins from *Moringa oleifera* seeds. **PLoS One**. [s.l.]: v. 8, e81973, 2013.
- BANERJEE, R. et al. Conformation, protein-carbohydrate interactions and a novel subunit association in the refined structure of peanut lectin-lactose complex. **J Mol Biol**. [s.l.]: 259, pp. 281-296, 1996.
- BARBOSA, P. P. S. **Purificação, caracterização e atividade biológica de lectinas do extrato de sementes de *Canavalia brasiliensis* (feijão-bravo-do-Ceará)**. 2013. 74 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Paraíba, pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, João Pessoa, 2013.
- BARBOSA, T. et al. *In vivo* lymphocyte activation and apoptosis by lectins of the *Diocleinae* subtribe. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. [s.l.]: n. 96, pp. 673-678, 2001.
- BARROSO-NETO, I. L. et al. Vasorelaxant activity of *Canavalia grandiflora* seeds lectins: A structural analysis. **Arch. Biochem. Biophys**. [s.l.]: V. 443, pp. 31-39, 2014.
- BATISTA et al. Plant lectins ConBr and CFL modulate expression toll-like receptors, pro-inflammatory cytokines and reduce the bacterial burden in macrophages infected with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Phytomedicine**. [s.l.]: v. 25, 15, pp. 52-60, 2017.
- BATISTA et al. Structural analysis and anthelmintic activity of *Canavalia brasiliensis* lectin reveal molecular correlation between the carbohydrate recognition domain and glycans of *Haemonchus contortus*. **Molecular and Biochemical Parasitology**. [s.l.]: v. 225, pp. 67-72, 2018.
- BAWA, R.; AUDETTE, G. F; RUBINSTEIN, I. Reverse lectin targeting. **Handbook of Clinical Nanomedicine: Nanoparticles, Imaging, Therapy, and Clinical Applications**, Taylor and Francis Group. [s.l.]: pp. 1548-1561, 2016.
- BEZERRA, E. H. S. et al. Structural analysis of ConBr reveals molecular correlation between the carbohydrate recognition domain and endothelial NO synthase activation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. [s.l.]: V. 408, n. 4, pp. 566-570, 2011.
- BFG [Brazil Flora Group]. Growing knowledge: an overview of Seed Plant knowledge in Brazil. **Rodriguésia**. [s.l.]: 66: 1085–1113, 2015.
- BIELESZOVÁ, K. et al. New fluorescently labeled auxins exhibit promising anti-auxin activity. **New Biotechnology**. [s.l.]: Volume 48, pp. 44-52, 2019.

BIELIK, A. M.; ZAIA, J. Historical overview of glycoanalysis. **Meth. Mol. Biol.** [s.l.]: 600, pp. 9-30, 2010.

BOBBILI, K. B. et al. *Coccinia indica* agglutinin, a 17 KDa PP2 like phloem lectin: Affinity purification, primary structure and formation of self-assembled filaments. **Macromolecules.** [s.l.]: Volume 108, pp. 1227-1236, 2018.

BRADFORD M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.** [s.l.]: v. 72, pp. 248-54, 1976.

BRILL, L. M.; EVANS, C. J.; HIRSCH, A. M. Expression of MsLEC1- and MsLEC2-antisense genes in alfalfa plant lines causes severe embryogenic, developmental and reproductive abnormalities. **The Plant Journal.** [s.l.]: 25 (4), pp. 453-461, 2001.

BRINDA, K.V.; SUROLIA, A.; VISHVESHWARA, S. Insights into the quaternary association of proteins through structure graphs: a case study of lectins. **Biochem J.** [s.l.]: 391, pp. 1-15, 2005.

CALVETE, J. J. et al. Molecular characterization and crystallization of Diocleinae lectins. **Biochimica et Biophysica Acta.** [s.l.]: v. 1430, pp. 367-375, 1999.

CARRINGTON, D. M. et al. Polypeptide ligatoin occurs during post-translational modification of concanavalin A. **Nature.** [s.l.]: V. 313, pp. 64-67, 1985.

CAVADA, B.S. et al. *Canavalia bonariensis* lectin: Molecular bases of glycoconjugates interaction and antiglioma potential. **International Journal of Biological Macromolecules.** [s.l.]: V. 106, pp. 369-378, 2018.

CAVADA, B.S. et al. Revisiting proteus: do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins. **Curr. Protein. Pept. Sci.** [s.l.]: 2, pp. 123-135, 2001.

CECCATTO, V. M. et al. Purification and Partial Characterization of a Lectin from *Canavalia grandiflora* Benth. **Seeds. Protein Pept. Lett.** [s.l.]: v. 9, pp. 67-73, 2002.

CHANDRA, N. R. et al. Structural similarity and functional diversity in proteins containing the legume lectin fold. **Protein Eng.** [s.l.]: v. 14, pp. 857-866, 2001.

CHEN, V. B. et al. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. **Acta Crystallographica D.** [s.l.]: v. 66, pp. 12-21, 2010.

CHEN, X.; BHANDARI, B.; ZHOU, P. Insight into the effect of glycerol on stability of globular proteins in high protein model system. **Food Chemistry.** [s.l.]: V. 278, pp. 780 -785, 2019.

CIMPERMAN, P. et al. A quantitative model of thermal stabilization and destabilization of proteins by ligands. **Biophys J.** [s.l.]: v. 95(7), pp. 3222 - 3231, 2008.

COELHO, L. C. B. B. et al. Lectins, interconnecting proteins with biotechnological/pharmacological and therapeutic applications. **Evid. Based Complement. Alternative Media**. [s.l.]: pp. 1-22, 2017.

COLLABORATIVE COMPUTACIONAL PROJECT, NUMBER 4. The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography. **Acta Crystallographyca**. [s.l.]: Section D, 50: pp. 760-763, 1994.

COSTA, R. M.P.B. et al. A new mistletoe *Phthirusa pyrifolia* leaf lectin with antimicrobial properties. **Process Biochemistry**. [s.l.]: Volume 45. Edição 4, pp. 526-533, 2010.

DAM, T. K.; BREWER, C. F. Thermodynamic studies of lectin-carbohydrate interactions by isothermal titration calorimetry. **Chem. Rev.** [s.l.]: 102, pp. 387-429. 2002.

DANG, L., VAN DAMME, E. J. M. Toxic proteins in plants. **Phytochemistry**. [s.l.]: v. 117, pp. 51-64, 2015.

DEL CARMEN FERNÁNDEZ-ALONSO, M. et al. Protein-carbohydrate interactions studied by NMR: from molecular recognition to drug design. **Curr. Protein Pept. Sci.** [s.l.]: 13, pp. 816-830, 2012.

DELANO, W. L. The PyMOL Molecular Graphics System. **DeLano Scientific**, San Carlos, CA, USA, 2002.

DELATORRE, P. et al. Crystal structure of a lectin from *Canavalia maritima* (ConM) in complex with trehalose and maltose reveals relevant mutation in ConA-like lectins. *Journal of Structural Biology*. [s.l.]: V. 154, Issue 3, pp. 280-286, 2006.

DELATORRE, P. et al. Interactions between indole-3-acetic acid (IAA) with a lectin from *Canavalia maritima* seeds reveal a new function for lectins in plant physiology. **Biochimie**. [s.l.]: 95 pp. 1697-1703, 2013.

DELATORRE, P. et al. Structure of a lectin from *Canavalia gladiata* seeds: New structural insights for old molecules. **BMC Structural Biology**. [s.l.]: 7:52, 2007.

DIAS, R. O. et al. Insights into animal and plant lectins with antimicrobial activities. **Molecules**. [s.l.]: V. 20, n.1, pp. 519-541, 2015.

DO-THANH, C. L. et al. Design, synthesis, and evaluation of novel auxin mimic herbicides. **J Agric Food Chem**. [s.l.]: 64, pp. 3533-3537, 2016.

DUVERGER, E. et al. Carbohydrate-lectin interactions assessed by surface plasmon resonance. **Biochimie**. [s.l.]: 85, pp. 167-179, 2003.

EDELMAN, G. M.; WANG, J. L. Binding and functional properties of Concanavalin A and its derivatives: interactions with indole acetic acid and other hydrophobic ligands, **J. Biol. Chem.** [s.l.]: v. 253, pp. 3016-3022, 1978.

EMSLEY, P.; COWTAN, K. Coot: model-building tools for molecular graphics, **Acta Crystallogr. D: Biol. Crystallogr.** [s.l.]: V. 60, pp. 2126-2132, 2004.

ERICSSON et al. Thermofluor-based high-throughput stability optimization of proteins for structural studies. **Analytical Biochemistry**. [s.l.]: 2006.

FAHEINA-MARTINS et al. Antiproliferative effects of lectins from *Canavalia ensiformis* and *Canavalia brasiliensis* in human leukemia cell lines. **Toxicology in Vitro**. [s.l.]: v. 26, Ed. 7, pp. 1161-1169, 2012.

FARIAS, Daniel Lima de. **Isolamento, purificação e atividades biológicas de uma nova lectina de sementes de feijão da praia (*Canavalia maritima*)**. 2013. 78 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Programa de pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, João Pessoa, 2013.

FERGUSON, L., GRAFTON-CARDWELL, E. E. **Citrus Production Manual**. UCANR Publications. [s.l.]: v. 3539., 2014.

GABOR, F. et al. The lectin–cell interaction and its implications to intestinal lectin-mediated drug delivery. **Adv. Drug Deliv. Rev.** [s.l.]: 56, pp. 459-480, 2004.

GHAZARIAN, H.; IDONI, B.; OPPENHEIMER, S.B. A glycobiology review: carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. **Acta Histochem.** [s.l.]: 113, pp. 236–247, 2011.

GOMEZ-ROLDAN, V. et al. Strigolactone inhibition of shoot branching. **Nature**. 11. [s.l.]: 455 (7210), pp. 189-94, 2008.

GONDIM, A. C. S. **Atividade antitumoral e antiviral de lectinas de Leguminosas (Tribo Phaseoleae Subtribo Diocleneae): ConBr, ConM DLasil e DSclerL**. 2014. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

GOOD, N. E.; ANDREAE, W. A.; VAN YSSELSTEIN; M.H.H. Studies on 3-indole acetic acid metabolism. II. Some products of the metabolism of exogenous indole acetic acid in plant tissues, **Plant Physiol**. v. 31, pp. 231-235, 1956.

GRANGEIRO, T.B. et al. Molecular cloning and characterization of ConBr, the lectin of *Canavalia brasiliensis* seeds. **Eur. J. Biochem**, v. 248, pp. 451-460, 1997.

GRIENENBERG, R. E.; FLETCHER, J.C. Polypeptide signaling molecules in plant development. **Curr. Opin. Plant Biol.** [s.l.]: 23, pp. 8-14, 2015.

GROSSMANN, K. Auxin herbicides: current status of mechanism and mode of action. **Pest Management Science**. [s.l.]: v. 66, pp. 113-120, 2010.

GUEDES, R. S.; QUIRINO, Z. G. M.; GONÇALVES, E. P. Fenologia reprodutiva e biologia da polinização de *Canavalia brasiliensis* Mart. ex Benth (Fabaceae). **Biotemas**. [s.l.]: 22 (1), pp. 27-37, 2009.

HARDMAN, K. D.; AINSWORTH, C. F. Binding of Nonpolar Molecules by Crystalline Concanavalin A. **Biochemistry**. [s.l.]: v. 12, n. 22, pp. 4442- 4448, 1973.

- HASHIM, O. H.; JAYAPALAN, J. J.; LEE, C. -S. Lectins: an effective tool for screening of potential cancer biomarkers. **Peer J**. [s.l.]: 5, pp. 1-30, 2017.
- HIRSCH, A. M. Role of lectins (and rhizobial exopolysaccharides) in legume nodulation, **Curr. Opin. Plant Biol.** [s.l.]: v.2, p.320-326, 1999.
- HOPKINS, T.L.; HARPER, M.S. Lepidopteran peritrophic membranes and the effect of dietary germ agglutinin on their formation and structure. **Arch. Insect Biochem. Physiol.** [s.l.]: 47, pp. 100–109, 2001.
- IMBERTY, A. et al. An unusual carbohydrate binding site revealed by the structures of two *Maackia amurensis* lectins complexed with sialic acid-containing oligosaccharides. **J Biol Chem.** [s.l.]: v. 275, pp. 17541 – 17548, 2000.
- ISIDRO, R. et al. Ação de lectina de sementes de *Canavalia brasiliensis* Mart. sobre o comportamento da saúva do Nordeste. (**Atta opaciceps Borgmeier**). **Revista de la Facultad de Agronomia.** [s.l.]: 27, pp. 77-86, 2001.
- JACQUES et al. Lectin from *Canavalia brasiliensis* (ConBr) protects hippocampal slices against glutamate neurotoxicity in a manner dependent of PI3K/Akt pathway. **Neurochemistry International.** [s.l.]: V. 62, Ed. 6, pp. 836-842, 2013.
- JANCARIK, J.; KIM, S. H. Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. **J. Appl. Crystallogr.** [s.l.]: v. 24, p. 409–411, 1991.
- JOHN, F. C.; KHATIJA, T.; P.RAO, C. Chemico-Biological Aspects of Plant Lectins with a Preference to Legume Lectins. **Studies in Natural Products Chemistry.** [s.l.]: Volume 40, pp. 359-381, 2013.
- KABSCH, W. XDS. **Acta Crystallographica.** [s.l.]: Section D. 66, pp. 125–32, 2010.
- KAUR, M. et al. A tuber lectin from *Arisaema helleborifolium* Schott with anti-insect activity against melon fruit fly, *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) and anti-cancer effect on human cancer cell lines. **Arch. Biochem. Biophys.** [s.l.]: pp.445-156. 2006.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** **227**(5259). [s.l.]: pp. 680-685, 1970.
- LAGARDA-DIAZ, I.; GUZMAN-PARTIDA, A. M.; VAZQUEZ-MORENO, L. Legume lectins: Proteins with diverse applications. **International Journal of Molecular Sciences.** [s.l.]: Volume 18, ed. 6, 12, 2017.
- LANNOO, N.; VAN DAMME, E.J.M. Lectin domains at the frontiers of plant defense. **Front. Plant Sci.** [s.l.]: 5, pp. 397, 2014.
- LESLIE, A.G.W. Joint CCP4 + ESF-EAMCB Newsletter on **Protein Crystallography.** [s.l.]: 26, 1992.
- LI, Y. R. et al. A novel lectin with potent antitumor, mitogenic and HIV-1 reverse transcriptase

inhibitory activities from the edible mushroom *Pleurotus citrinopileatu*, **BBA-Gen Subjects**. [s.l.]: 1780, pp. 51-57, 2008.

LIANG, P.H.; WANG, S.K.; WONG, C.H. Quantitative analysis of carbohydrate-protein interactions using glycan microarrays: determination of surface and solution dissociation constants. **J. Am. Chem. Soc.** [s.l.]: 129, pp. 11177–11184, 2007.

LIS, H.; SHARON, N. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. **Chem. Rev.** [s.l.]: 98, pp. 637–674. 1998.

LIU, X. M. et al. Effects of polyols on the stability of whey proteins in intermediate-moisture food model systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. [s.l.]: 57, pp. 2339-2345, 2009.

LORENC-KUBIS, I. et al. Effects of lectins on enzymatic properties of plant acid phosphatases and ribonucleases. **Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry**. [s.l.]: Vol. 1, pp. 168, 1981.

LORIS, R. Principles of structures of animal and plant lectins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjectis**. [s.l.]: V. 1572, pp. 198-208, 2002.

LPWG [Legume Phylogeny Working Group]. Legume phylogeny and classification in the 21st century: Progress, prospects and lessons for other species-rich clades. **Taxon**. [s.l.]: 62 217–248, 2013.

MAAG, D. et al. Defensive weapons and defense signals in plants: Some metabolites serve both roles. **Bio Essays**. [s.l.]: 37, pp. 167–174, 2014.

MAŁECKI, P. H. et al. Binding of the plant hormone kinetin in the active site of Mistletoe Lectin I from *Viscum album*. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**. [s.l.]: V. 1824, n. 2, pp. 334-338, 2012.

MARSHALL, E.; COSTA, L.M.; GUTIERREZ-MARCOS, J. Cysteine-rich peptides (CRPs) mediate diverse aspects of cell-cell communication in plant reproduction and development. **J. Exp. Bot.** [s.l.]: 62, pp. 1677-1686, 2011.

MASUZAKI, H.; HOSONO, M.; NITTA, K. Purification of Two Novel Sugar Acid-binding Lectins from *Haplomitrium Mnioides* (bryophyte, Plantae) and their Preliminary Characterization. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. [s.l.]: 181 (1), pp. 65-82, 2017.

MATSUBAYASHI, Y. Posttranslationally modified small-peptide signals in plants. **Annu. Rev. Plant Biol.** [s.l.]: 65, pp. 385-413, 2014.

MATTHEWS, B. W. Solvent content of protein crystals. **J. Mol. Biol.** [s.l.]: v. 33, pp. 491-497, 1968.

MEYER, A. et al. Structure of mistletoe lectin I from *Viscum album* in complex with the phytohormone zeatin. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**. [s.l.]: V. 1784, n. 11, pp. 1590-1595, 2008.

MIGUEL, E. C. et al. Seed structure in *Canavalia brasiliensis* Mart. ex Benth. (Leguminosae) and subcellular localization of ConBr lectin: Implications for ConBr biological functions. **Flora**. [s.l.]: 215, pp. 46–53, 2015.

MITCHELL, S. W. Researches upon the venom of the rattlesnake. **Smithson Contrib Knowl**. XII. [s.l.]: pp. 89-90, 1860.

MOORE, T. C. **Biochemistry and Physiology of Plant Hormones**. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp. 330, 1989.

MOREIRA, Cleane Gomes. **Purificação, caracterização físico-química, estrutural e biológica de uma lectina de sementes de *Canavalia villosa* BENTH**. 2017. 84 f. Tese (doutorado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, Fortaleza, 2017.

MOREIRA, R. A.; CAVADA, B. S. Lectin from *Canavalia brasiliensis* (Mart.). Isolation, characterisation and behaviour during germination. **Biol. Plant**. [s.l.]: V. 26, pp. 113-120, 1984.

MOREIRA, R. A.; PERRONE, J. C. Purification and partial characterization of lectin from *Phaseolus vulgaris*. **Plant physiol**. [s.l.]: 59, pp. 783 -787, 1977.

MORENO, F. B. M. B. et al. Identification of a new quaternary association for legume lectins. **Journal of Structural Biology**. [s.l.]: Volume 161, Issue 2, pp.133-143, 2008.

MORENO, F. B. M. B. et al. New crystal forms of Diocleinae lectins in the presence of different dimannosides. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications**. [s.l.]: 62(11), pp. 1100-1103, 2006.

MURDOCK, L. L.; SHADE, R. E. Lectins and protease inhibitors as plant defenses against insects, **J. Agric. Food Chem**. [s.l.]: n. 50, pp. 6605-6611, 2002.

MURPHY, E.; SMITH, S.; DE SMET, I. Small signaling peptides in *Arabidopsis* development: how cells communicate over a short distance. **Plant Cell**. [s.l.]: 24, pp. 3198-3217, 2012.

NAGANO, C. S. et al. Insights in to the structural basis of the pH-dependent dimer-tetramer Equilibrium through crystallographic analysis of recombinant Diocleinae lectins. **Biochem. J**. [s.l.]: v. 409, pp. 417-428, 2008.

NAKAMURA, S. et al. Molecular cloning and expression. Of the manose/glucose specific lectin from *Castanea crenata* cotyledons. **J Biochem**. [s.l.]: 131 (2), pp. 241-246, 2002.

NASCIMENTO, A. S. et al. Purification and partial characterization of a novel lectin from *Dioclea lasiocarpa* Mart. Seeds with vasodilator effects. **J. Mol. Recognit**. [s.l.]: v. 25, pp. 657-664, 2012.

NEWMAN, J. Novel buffer systems for macromolecular crystallization. **Acta Crystallogr. D**. [s.l.]: v. 60, pp. 610-612, 2004.

NORMANLY, J. Approaching cellular and molecular resolution of auxin biosynthesis and metabolism. **Cold Spring Harbor Perspect. Biol.** [s.l.]: v. 2, 2010.

PAIS, Q. et al. Standardized technique for high-pressure cooling of protein crystals. **Acta Crystallogr D Struct Biol.** [s.l.]: 73, pp. 997-1006, 2017.

PEER, W. A.; MURPHY, A. S. Flavonoids and auxin transport: modulators or regulators?. **Trends in Plant Science.** [s.l.]: Volume 12, pp. 556-563, 2007.

PEREIRA, S. F. **Caracterização dos efeitos biológicos das lectinas de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) e de *Canavalia ensiformes* (ConA) em preparações do sistema nervoso central e em células tumorais.** 2005. 97 f. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil, pp 112, 2005.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology.** [s.l.]: 109, pp. 347-352, 1995.

PIHÍKOVÁ, D.; KASÁK, P.; TKAC, J. Glycoprofiling of cancer biomarkers: label-free electrochemical lectin-based biosensors. **Open Chem.** [s.l.]: 13, pp. 636-655, 2015.

PINTO-JUNIOR, V. R. et al. Purification, Partial Characterization and Immobilization of a Mannose-Specific Lectin from Seeds of *Dioclea lasiophylla* Mart. **Molecules.** [s.l.]: v. 18, pp. 10857-10869, 2013.

Plant Cell. [s.l.]: 17, pp. 1090-1104, 2005.

QUEIROZ, L. P.; SNAK, C. *Canavalia* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em:
<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB82745>>. Acesso em: 13 ago. 2015.

REINHARD, L. et al. Optimization of protein buffer cocktails using Thermofluor. **Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.** [s.l.]: 1 69(Pt 2), pp. 209–214, 2013.

RIEGER et al. Antidepressant-like effect of *Canavalia brasiliensis* (ConBr) lectin in mice: Evidence for the involvement of the glutamatergic system. **Pharmacology Biochemistry and Behavior.** [s.l.]: v. 122, pp. 53-60, 2014.

RIPOLL, C. et al. Evaluation of the ability of lectin from snowdrop (*Galanthus nivalis*) to protect plants against root-knot nematodes. **Plant Sci.** [s.l.]: 164, pp. 517–523, 2003.

ROBERTS, D. D.; GOLDSTEIN, I. J. Binding of hydrophobic ligands to plant lectins: titration with arylamine naphthalene sulphonates, **Arch. Biochem. Biophys.** [s.l.]: v. 224, p.479-484, 1983.

ROVER JÚNIOR, L. **Construção e avaliação de biossensor potenciométrico para determinação de uréia, com eletrodo íon seletivo a amônio, usando *Canavalia brasiliensis* como fonte enzimática.** 1995 95 f. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, pp. 109, 1995.

RUDIGER, H. Structure and function of plant lectin. **In book: Glycosciences: Status and**

Perspectives. [s.l.]: pp.415 - 438, 2008.

RUDIGER, H.; GABIUS, H.J. Plant lectins: Occurrence, biochemistry, functions and applications. **Glycoconjugate Journal.** [s.l.]: 18, pp. 589–613, 2001.

SALEMME, F. R.; SPURLINO, J.; BONE, R. Serendipity meets precision: the integration of structure-based drug design and combinatorial chemistry for efficient drug discovery. **Structure.** [s.l.]: v. 5, pp. 319-324, 1997.

SANTIAGO, M. Q. et al. Purification, characterization and partial sequence of a pro-inflammatory lectin from seeds of *Canavalia oxyphylla* Standl. & L. O. Williams. **J. Mol Recognit.** [s.l.]: V. 27(3), pp. 117-123, 2014.

SANTIAGO, M. Q. **Purificação, caracterização e atividade biológica de uma lectina extraída de sementes de *Canavalia oxyphylla* Standl. & L.O. Williams.** 2013. Monografia (Bacharelado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Ceará, 2013.

SANTI-GADELHA, T. et al. Purification and biological effects of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) seed lectin. **Biochemical and Biophysical research Communications.** [s.l.]: 350, pp. 1050-1055, 2006.

SANTNER, A.; ESTELLE, M. Recent advances and emerging trends in plant hormone signalling. **Nature.** [s.l.]: 459:1071–1078, 2009.

SANTOS S. P. et al. Thermofluor-based optimization strategy for the stabilization and crystallization of *Campylobacter jejuni* desulforubrythrin. **Protein Expression and Purification.** [s.l.]: v. 81, pp. 193-200, 2012.

SANTOS, A. F. S. et al. Lectins: function, structure, biological properties and potential applications. **Curr. Top. Pept. Protein Res.** [s.l.]: 15, pp. 41-62, 2014.

SANZ-APARICIO et al., The crystal structure of *Canavalia brasiliensis* lectin suggests a correlation between its quaternary conformation and its distinct biological properties from Concanavalina A. **FEBS Lett.** [s.l.]: V. 1, pp. 114-118. 1997.

SAUER, M.; ROBERT, S.; KLEINE-VEHN, J. Auxin: simply complicated. **Journal of Experimental Botany.** [s.l.]: pp. 64, 2565–2577, 2013.

SCHRIRE, B. D.; LAVIN, M.; LEWIS, G. P. Global distribution patterns of the Leguminosae: Insights from recent phylogenies. In: I. Friis & H. Balslev (eds), Plant diversity and complexity patterns: local, regional and global dimensions. **Biologiske Skrifter.** [s.l.]: v. 55, pp. 375–42, 2005.

SHAN, X.; YAN, J.; XIE, D. Comparison of phytohormone signaling mechanisms. **Current Opinion in Plant Biology.** [s.l.]: 15:84–91, 2012.

SHARON, N. Lectins: Carbohydrate-specific Reagents and Biological Recognition molecules **Biol. Chem.** [s.l.]: v. 282, pp. 2753-2764, 2007

SHARON, N. Lectins: past, present and future. **Biochemical Society Transactions.** [s.l.]: v.

36, n. 6, pp. 1457, 2008.

SHARON, N.; LIS, H. Lectins: Chapman and Hall, (Livro). [s.l.]: pp. 127, ISBN 0-412-27380-2, 1989.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**. [s.l.]: (14), pp. 53R-62R, 2004.

SHIGENAGA, A. M.; ARGUESO, C. T. No hormone to rule them all: Interactions of plant hormones during the responses of plants to pathogens. **Seminars in Cell & Developmental Biology**. [s.l.]: Volume 56, pp. 174-189, 2016.

SILVA, L. C. N. et al. Immunomodulatory effects of pCramoll and rCramoll on peritoneal exudate cells (PECs) infected and non-infected with *Staphylococcus aureus*, **Int. J. Biol. Macromol.** [s.l.]: 72, pp. 848-854, 2015.

SIMON, S. et al. Defining the selectivity of processes along the auxin response chain: a study using auxin analogues. **New Phytol.** [s.l.]: 200, pp. 1034-104, 2013.

SINHA, S. et al. Subunit assembly of plant lectins. **Curr Opin Struct Biol.** [s.l.]: 17(5), pp. 498-505. 2007.

SITOHY, M.; DOHEIM, M.; BADR, H. Isolation and characterization of a lectin with antifungal activity from Egyptian *Pisum sativum* seed. **Food Chem.** [s.l.]: 104, pp. 971-979, 2007.

SNAK, C.; DE QUEIROZ, L. P. Flora of Bahia: Leguminosae – Canavalia (Papilionoideae: Diocleae). **SITIENIBUS série Ciências Biológicas**. [s.l.]: v. 16, 2016.

SONG, Y. Insight into the mode of action of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) as an herbicide. **J Integr Plant Biol.** [s.l.]: v. 56(2), pp. 106-113, 2014.

SRINIVAS, V. R. et al. Legume lectin Family, the ‘natural mutants of the quaternary state’, provide insights into the relationship between protein stability and oligomerization. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**. [s.l.]: v. 1527, pp. 102 – 111, 2011.

STEPANOVA, A. N. et al. TAA1-Mediated Auxin Biosynthesis Is Essential for Hormone Crosstalk and Plant Development. **Cell**. [s.l.]: Volume 133, pp. 177-191, 2008.

STOITSOVA, S. R et al. Binding of hydrophobic ligands by *Pseudomonas aeruginosa* PA-I lectin. **Biochimica et Biophysica Acta**. [s.l.]: v. 1619(2), pp. 213-219, 2003.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. [s.l.]: 5. ed., Artmed, 2013.

TAKAHASHI, K. G.; KURODA, T.; MUROGA, K. Purification and antibacterial characterization of a novel isoform of the Manila clam lectin (MCL-4) from the plasma of the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. **Comp. Biochem. Phys.** [s.l.]: B, pp.50-145, 2008.

TEALE, W. D.; PAPONOV, I. A.; PALME, K. Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. **Nat Rev Mol Cell Biol.** [s.l.]: 7(11), pp. 847-59,

2006.

TSAVKELOVA, E. et al. Identification and functional characterization of indole-3-acetamide-mediated IAA biosynthesis in plant-associated *Fusarium* species. **Fungal Genetics and Biology**. [s.l.]: v. 49, pp. 48–57, 2012.

UETA R. R.; DINIZ F. B. Adsorption of concanavalin A and lentil lectin on platinum electrodes followed by electrochemical impedance spectroscopy: effect of protein state. **Colloids Surf B Biointerfaces**. [s.l.]: 15, 61(2), pp. 244-9. 2008.

VAN DAMME, E. J. M. et al. Handbook of plant lectins: properties and biomedical applications. **John Wiley & Sons**, New York, 1998a.

VAN DAMME, E. J. M. et al. Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **Crit. Rev. Plant Sci**. [s.l.]: 17, pp. 575–692, 1998b.

VAN DAMME, E. J. M. History of plant lectin research. In: **Hirabayashi, J. (Ed.), Lectins: methods and protocols**. [s.l.]: Springer, pp. 3–13, 2014.

VAN DAMME, E. J. M.; LANNOO, N.; PEUMANS, W. J. Plant lectins. **Adv. Bot. Res**. [s.l.]: 48, pp. 107–209, 2008.

VAN DER BOSCH, J.; MCCONNELL, H. M. **Proc. N&Z. Acad. Sci. U. S. A.** 72, pp. 4409-4413, 1975.

VANDENBORRE, G.; SMAGGHE, G.; VAN DAMME; E. J. M. Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects. **Phytochemistry**. [s.l.]: 72, pp. 1538–1550, 2011.

VARGIN, A.; TEPLYAKOV, A. Molrep: an automated program for molecular replacement. **J. Appl. Crystallogr**. [s.l.]: 30, pp. 1022-1025, 1997.

VASCONCELOS, M. A. et al. Purification and primary structure of a novel mannose-specific lectin from *Centrolobium microchaete* Mart. seeds. **Int. J. Biol. Macromol**. [s.l.]: V. 81, pp. 600-607, 2015.

WANG, H. et al. A new lectin with highly potent antihepatoma and antisarcoma activities from the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*. **Biochem. Biophysics Res. Commun**. [s.l.]: v. 275, pp. 810-816, 2000.

WATKINS, W. M.; MORGAN, W. T. J. Neutralization of the anti-H agglutinin in cel by simple sugars. **Nature**. [s.l.]: 169: 825-826, 1952.

WEBER, P. C.; SALEMME, F. R. Applications of calorimetric methods to drug discovery and the study of protein interactions. **Current Opinion in Structural Biology**. [s.l.]: v. 13, pp. 115-121, 2003.

WENZEL, M. et al. Time course of lectin and storage protein biosynthesis in developing pea (*Pisum sativum*) seeds. **Biol Chem Hoppe-Seyler**. [s.l.]: 374, pp. 887–94, 1993.

WIERZBA-ARABSKA, E.; MORAWIECKA, B. Purification and properties of lectin from potato tubers and leaves; interaction with acid phosphatase from potato tubers. **Acta Biochim Polon.** [*s.l.*]: 34, 407–20, 1987.

WONG, J. H. et al. Proteins with antifungal properties and other medicinal applications from plants and mushrooms. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** [*s.l.*]: 87, pp. 1221–1235, 2010.

WOODWARD, A. W.; BARTEL, B. The Arabidopsis peroxisomal targeting signal type 2 receptor PEX7 is necessary for peroxisome function and dependent on PEX5. **Molecular Biology of the Cell.** [*s.l.*]: 16, pp. 573–583, 2005.

YANG, D. C. H.; GALL, W. E.; EDELMAN, G. M. Rotational correlation time of Concanavalin A after interaction with a fluorescent probe. **J. Biol. Chem.** [*s.l.*]: 249 pp. 7018-7023, 1974.