

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

DANIELE MARIA ALVES TEIXEIRA

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO
DE UM PAR LECTINA – RECEPTOR ENDÓGENO
DE SEMENTE DE *Mucuna sloanei* (Fawcett & Rendle)**

**FORTALEZA
2005**



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

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO
DE UM PAR LECTINA – RECEPTOR ENDÓGENO
DE SEMENTE DE *Mucuna sloanei* (Fawcett & Rendle)**

Daniele Maria Alves Teixeira

FORTALEZA

2005

DANIELE MARIA ALVES TEIXEIRA

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO
DE UM PAR LECTINA – RECEPTOR ENDÓGENO
DE SEMENTE DE *Mucuna sloanei* (Fawcett & Rendle)**

**FORTALEZA
Março - 2005**

DANIELE MARIA ALVES TEIXEIRA

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO
DE UM PAR LECTINA – RECEPTOR ENDÓGENO
DE SEMENTE DE *Mucuna sloanei* (Fawcett & Rendle)

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Renato de Azevedo Moreira

Co-orientador: Profa. Dr. Fany Reicher

FORTALEZA

Março - 2005

T265i Teixeira, Daniele Maria Alves

Isolamento e caracterização de um par lectina – receptor endógeno de semente de *Mucuna sloanei* (Fawcett & Rendle) / Daniele Maria Alves Teixeira.-.Fortaleza: 2005.

115f.:il.

Orientador: Prof. Dr. Renato de Azevedo Moreira

Tese (Doutorado) em Bioquímica – Universidade Federal do Ceará. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.

1. Lectinas 2. Soloanina 3. Xiloglucana. 4. Interação. 5. *Mucuna*. 6 polissacarídeo de parede celular I. Título

C.D.D. 574.192

C.D.U. 577.1

Esta tese foi apresentada como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências, outorgado pela Universidade Federal do Ceará e encontra-se a disposição dos interessados na Biblioteca Central da referida Universidade.

A transcrição de qualquer trecho desta tese é permitida, desde que seja feita de acordo com as normas da ética científica.

Daniele Maria Alves Teixeira

TESE APROVADA EM: 17/03/2005

Prof. Dr. Renato de Azevedo Moreira
Orientador da Tese
Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Fany Reicher
Co-Orientadora da Tese
Depto. de Bioquímica
Biologia Molecular
Universidade Federal do Paraná

Profa. Dra. Leila Maria Beltraminini
Instituto de Física de São Carlos
Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Maria Izabel Gallão
Departamento de Biologia
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Joaquim Enéas Filho
Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Ceará

*Aos meus pais Damião e Maria Luíza,
Por todo apoio e dedicação...*

AGRADECIMENTOS

Sempre que passamos por um momento de transição é bom pararmos um pouco para pensar... Será que estamos indo no caminho certo? E neste momento muitas coisas passam pela nossa cabeça e nos deparamos com a seguinte pergunta: O que seria de nós sem aqueles os qual nos relacionamos no nosso dia a dia? Aquelas pessoas que mesmo sem saber contribuem para deixar o nosso dia um pouco menos estressante do que a nossa correria diária... Neste momento gostaria de agradecer a estas pessoas que contribuíram para que a minha existência fosse digna de convivência durante os quatro anos que passei para realizar este trabalho. São estas pessoas que de uma maneira ou de outra encontram a sua mão acolhedora em um parágrafo (quem sabe até meio que perdido) no meio de todas estas informações que estão por vir...

Primeiramente agradeço a Deus por ter me concedido à graça de viver como uma de suas filhas sem ele nada disso teria começado.

Agradeço aos meus pais, Damião e Maria Luíza por terem me incentivado, apoiado e confiado nas minhas decisões; aos meus irmãos Delândio, Dárlio, Dárcio e Dirla por estarem sempre ao meu lado, lutando e aprendendo a viver.

Obrigada às minhas tias Lucy e Salete que me adotaram como filha (pedindo permissão às suas próprias filhas) durante o período deste curso que fiquei afastada dos meus pais. E à minha querida amiga D. Maria que me acolheu como sua filha adotiva durante o ano que passei em Curitiba.

Um muito obrigada a todos os meus amigos que conquistei durante estes anos tanto no Laboratório de Lectinas e Glicoconjugado I e II como no Laboratório de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná. Aos amigos que pude contribuir um pouquinho com a sua formação como colaboradores deste trabalho: Alexandra, Kelton, Morgana, Ociléia, Renata Alves que juntos aprendemos um pouco mais de bioquímica. Aos colegas de laboratório Ana Angélica, Álvaro, Cláudia, Clébia, Fabia, Lia, Marcus Vinícius, Mônica, Renata Rosinha, Rogildo, Sônia, Wagner, Ana Paula, Andréia e Renato foram muitos que me ajudaram e com certeza aprendi com cada um deles como é bom viver.

Um eterno obrigado também aos meus professores e queria representar todos os que participaram na minha formação durante estes anos pelos professores que orientaram este trabalho, Renato de Azevedo Moreira e Fany Reicher, duas pessoas determinadas que conseguem diante da agonia devolver a paz e diante da indiferença induzir o conflito do por que.

Gostaria de agradecer também as professor Leila Maria Beltramini por ter me acolhido no seu laboratório em uma semana corrida que resultou em um trabalho interessante.

Aos professores que tiveram a paciência e dedicação na correção deste trabalho Fany Reicher, Leila Maria Beltramini, Maria Izabel Gallão, Joaquim Enéas Filho suas observações só engrandeceram o trabalho final.

Um obrigada muito especial ao meu namorado Edilson com quem compartilhei todas as alegrias e tristezas este último ano e que me proporcionou muitos momentos bons e que com certeza continuará me acompanhando em muitos momentos de felicidades.

A todos os professores, funcionários e estudantes do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, que sempre estão do nosso lado e às vezes esquecemos de cumprimentar.

A TODOS SOU ETERNAMENTE GRATA

Este trabalho foi realizado graças as seguintes instituições:

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior (CAPES), através de convênio firmados com o Curso de Pós Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará. À Bolsa concedida e ao Programa PROCAD.

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará em cujo laboratório parte deste trabalho foi executado.

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná em cujo laboratório foi realizada todas a parte de estrutura do polissacarídeo.

Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo onde foram realizados os experimentos de Dicroísmo Circular e Fluorescência.

Fundação Cearense de Apoio a Pesquisa (FUNCAP), pelos convênios e auxílios concedidos junto ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, (CNPq), pelos convênios, com o curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

...Charles Singer, o historiador da ciência, observou que “a complexidade dos seres vivos assim revelada era filosoficamente tão perturbadora quanto a majestade paganizada do mundo astronômico, que Galileu desvelara na geração anterior, embora demorasse muito mais para que suas implicações mergulhassem na mente do homem.” Em outras palavras, às vezes as novas caixas exigem que revisemos todas as nossas teorias. Nesses casos, pode surgir uma grande má vontade.

Michael Behe, A caixa preta de Darwin.

RESUMO

Um par específico lectina-xiloglucana foi caracterizado em cotilédones de semente de *Mucuna sloanei*. A xiloglucana foi isolada por extração aquosa seguida por precipitação etanólica apresentou uma razão molar Glc:Xyl:Gal de 1,8:1,7:1,0, $[\alpha]_D^{25}$ de +60, massa molar (M_w) de $1,6 \cdot 10^6$ g mol⁻¹ raio de giro de 99,9 nm e dn/dc de 1,4. A composição e análise de metilação e espectroscopia de ressonância magnética nuclear, mostrou que este polissacarídeo possui uma cadeia principal de unidades de glucopiranosil β -1 \rightarrow 4 ligada substituída em O-6 na cadeia lateral por unidades de α -xilopiranosose ou 2-O- β -galactoxilopiranosil- α -xilopiranosose, típica de xiloglucanas de reserva encontradas em outras fontes vegetais. Estes resultados foram observados também por análise dos oligossacarídeos da xiloglucana por HPAEC-PAD e eletronspray onde encontramos uma relação de 8,98% de oligossacarídeos XXXG, 1,92% de XLXG, 27,96% de XXLG e 61,14% de XLLG. A lectina (sloanina), isolada da semente da mesma espécie por cromatografia de afinidade em galactomanana reticulada de *Adenanthera pavonina*, apresentou duas bandas protéicas, em eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE, equivalentes a 36 e 34 kDa e, por filtração em gel a proteína apresentou um único pico com massa equivalente a 63,6 kDa. A seqüência N-terminal mostrou uma alta homologia à lectinas de leguminosas com 69% de identidade para a cadia A da aglutinina de soja. O espectro de dicroísmo circular da sloanina revelou predominantemente uma estrutura secundária do tipo β -folha. A Sloanina apresentou 5,5% de carboidratos e mostrou atividade hemaglutinante contra eritrócitos de coelho e humanos tratado enzimaticamente, esta atividade foi inibida por carboidratos contendo unidades de D-galactose. A afinidade entre sloanina e xiloglucanas de reserva da parede celular foi demonstrada tanto por cromatografia de afinidade como por espectroscopia de fluorescência. Assim, pudemos, pela primeira vez, mostrar a existência no mesmo órgão vegetal, de uma lectina e um ligante específico, em concentrações condizentes. Este fato conduz à sugestão de que este ligante específico pode constituir o receptor endógeno da lectina. Mais ainda, podemos sugerir que o par lectina – receptor endógeno deve desempenhar um papel relevante na fisiologia da semente, possivelmente agir, por um lado no controle da exudação da lectina da semente e por outro na modulação da degradação da parede celular durante a germinação da semente.

ABSTRACT

A specific lectin-xyloglucan pair was characterized in *Mucuna sloanei* seed cotyledons. The xyloglucan was isolated from the seeds by water extraction, followed by ethanol precipitation (yield 22% of dry seed). The isolated polysaccharide showed Glc:Xyl:Gal in molar ratio of 1.8:1.7:1.0 and $[\alpha]_D^{25} + 60$, molar mass (M_w) of $1.6 \cdot 10^6$ g mol⁻¹, radius gyration from 99.9 nm and dn/dc of 1.4. Composition and linkage analysis, supported by methylation and NMR spectroscopic measurements, showed that the polysaccharide has a main chain of β -1.4-linked glucopyranosyl residues substituted at O-6 by α -xylopyranosyl, 2-O- β -galactopyranosyl- α -xylopyranosyl side chains, typical of those storage xyloglucans from other plant sources. These results were observed too by the analyses of xyloglucan oligosaccharides by HPAEC-PAD and electrospray (8,98% of XXXG, 1,92% of XLXG, 27,96% of XXLG and 61,14% of XLLG.). The lectin (sloanin), isolated from the same seed by affinity chromatography on cross-linked *Adenantha pavonina* galactomannan, showed two protein bands in SDS-PAGE (36 and 34 kDa) and one peak on gel filtration (63.6 kDa). The N-terminal sequence showed homology to leguminous lectins with 69% to lectin precursor of soybean. CD spectra revealed that sloanin contains predominantly β -sheet structures. Sloanin presents 5.5% of carbohydrate and showed hemagglutinating activity against rabbit and enzyme treated human erythrocytes, inhibited only by D-galactose containing sugars. The affinity between sloanin and the storage cell wall galactoxyloglucan was demonstrated by affinity chromatography and fluorescence spectroscopy. This work was demonstrated, by the first time, that a lectin and a specific ligand were found in the same plant organ (seed cotyledon). Although our experiments were performed *in vitro*, we can extrapolate them to *in vivo* situation. These results may, thus, suggest that the lectin and the galactoxyloglucan, found in *M. sloanei* seed cotyledon, can interact *in vivo*. Since the legume lectins actively exudate from the germinating seeds, crossing the cell wall barrier, such interactions could be an internal control of both cell wall degradation and/or lectin exudation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Visão da parede celular primária.....	2
Figura 2-	Representação esquemática da parede celular primária.....	4
Figura 3-	Microfibrilas de celulose.....	5
Figura 4-	Modelo tridimensional da parede celular tipo I e II.....	7
Figura 5-	Modelo estrutural esquemático simplificado de parede tipo I.....	8
Figura 6-	Modelo estrutural esquemático simplificado de parede tipo II.....	8
Figura 7-	Parede celular secundária.....	9
Figura 8-	Estrutura química parcial de uma xiloglucana de reserva	13
Figura 9-	Estrutura química parcial de uma xiloglucana de parede primária.....	14
Figura 10-	Visão microscópica do corte transversal de <i>Hymenaea courbaril</i>	18
Figura 11-	Modelo proposto para a degradação de xiloglucana de reserva.....	18
Figura 12-	Representação esquemática da degradação de xiloglucana em sementes.....	19
Figura 13-	Estruturas simplificadas e nomenclatura para alguns oligossacarídeos relacionados às xiloglucanas.....	21
Figura 14-	Representação esquemática dos tipos de lectinas vegetais.....	25
Figura 15-	Extração seqüencial dos polissacarídeos de sementes de <i>Mucuna sloanei</i>	41
Figura 16-	Reticulação do polissacarídeos pela epiclorigidrina.....	48
Figura 17-	Vagens e sementes verdes e quiescentes de <i>Mucuna sloanei</i>	56
Figura 18-	Vagens e sementes quiescentes de <i>Mucuna sloanei</i>	57
Figura 19-	Semente inteira, triturada e farinha de sementes de <i>Mucuna sloanei</i>	57
Figura 20-	Espectro de UV-Visível das frações PFH ₂ O e PH ₂ O.....	59
Figura 21-	Perfil de eluição das cromatografias por exclusão estérica (HPSEC) ...	60-63
Figura 22-	Distribuição da variação da massa molar. da fração PH ₂ O.....	65
Figura 23-	Distribuição cumulativa da massa molar da fração PH ₂ O.....	65
Figura 24-	Gráfico do raio de giro versus a massa molar da fração PH ₂ O.....	65
Figura 25-	Espectro de GC-MS do derivado 2,3,4-Me ₃ -Xyl.....	67
Figura 26-	Espectro de GC-MS do derivado 2,3,4,6-Me ₄ -Gal.....	67
Figura 27-	Espectro de GC-MS do derivado 3,4-Me ₂ -Xyl.....	68
Figura 28-	Espectro de GC-MS do derivado 2,3,6-Me ₃ -Glc.....	68
Figura 29-	Espectro de GC-MS do derivado 2,3-Me ₂ -Glc.....	69
Figura 30-	Espectro de Infravermelho (FT-IR) da fração PH ₂ O de <i>Mucuna sloanei</i> após metilação.....	70
Figura 31-	Espectro de Infravermelho (FT-IR) da fração PH ₂ O de <i>Mucuna sloanei</i> após metilação.....	70
Figura 32-	Espectro de H ¹ da xiloglucana (PH ₂ O).....	71
Figura 33-	Expansão do espectro de H ¹ da xiloglucana (PH ₂ O).....	71
Figura 34-	Espectro de C ¹³ da xiloglucana (PH ₂ O).....	72
Figura 35-	Espectro de DEPT da xiloglucana (PH ₂ O).....	73
Figura 36-	Espectro de HMQC da xiloglucana (PH ₂ O).....	74
Figura 37-	Análise de HPAEC-PAD dos de xiloglucana de <i>Mucuna sloanei</i>	75
Figura 38-	Espectro de massa de MALDI-TOF-MS oligossacarídeos de xiloglucana de <i>Mucuna sloanei</i>	76
Figura 39-	Espectro de Infravermelho da fração PH ₂ O de <i>Mucuna sloanei</i> em antes e após a reticulação.....	77
Figura 40-	Purificação da lectina de <i>Mucuna sloanei</i> por cromatografia de afinidade em galactomanana reticulada de <i>Adenanthera</i>	79

	<i>pavonina</i>	
Figura 41	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de 2-mercaptoetanol da lectina de sementes de <i>M. sloanei</i>	80
Figura 42	Cromatografia da solanina em coluna Superdex 75-HR.....	81
Figura 43	Eletroforese bidimensional da lectina de <i>Mucuna sloanei</i>	82
Figura 44	Espectro de absorção molecular no UV-VIS da lectina de <i>M. sloanei</i> ...	83
Figura 45	Espectro de dicroísmo circular de sloanina.....	85
Figura 46	Interação de sloanina, por cromatografia de afinidade com xiloglucana reticulada de <i>Mucuna sloanei</i>	88
Figura 47	Espectro de fluorescência de lectina de semente de <i>Mucuna sloanei</i> (a diferentes concentrações) na ausência e presença de galactoxiloglucana de semente de <i>M. sloanei</i>	89
Figura 48	Diferença relativa de fluorescência de lectina de semente de <i>Mucuna sloanei</i> a diferentes concentrações	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Algumas características do polissacarídeo de reserva da parede celular e sua ocorrência.....	11
Tabela 2-	Composição das diversas frações polissacarídicas.....	58
Tabela 3-	Análise de metilação da fração PH ₂ O.....	
Tabela 4-	Comparação de frequências de FT-IR de polissacarídeos de <i>Pisum sativum</i> e <i>Mucuna sloanei</i>	70
Tabela 5-	Deslocamentos químicos de ¹³ C e alguns de ¹ H-NMR da xiloglucana de semente de <i>Mucuna sloanei</i>	73
Tabela 6:	Proporção de oligossacarídeos derivados da digestão completa em xiloglucanas de diferentes espécies.....	75
Tabela 7-	Atividade hemaglutinante da lectina de semente de <i>Mucuna sloanei</i>	86
Tabela 8-	Especificidade de ligação a carboidrato de sloanina.....	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ara	Arabinose
BSA	Albumina sérica bovina
CD	Dicroísmo circular
CDCl ₃	Tetracloroeto de carbono deuterado
DEPT	Distortionless Nuclei Enhancement by Polarization Transfer
dn/dc	Taxa de variação do índice de refração com a concentração
GLC-MS	Cromatografia líquida-gasosa acoplada à espectrometria de massa
Gal	Galactose
GDP-man	Guanosina difosfato manose
Glc	Glucose
HEMOCE	Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará
HGA	homogalacturonanas
HMQC	Heteronuclear Multiple-Quantum Correlation spectroscopy
HPAEC-PAD	High performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection
HPLC	High performance liquid chromatography
HPSEC	cromatografia de exclusão estérica de alta pressão
MALLS	detector de espalhamento de luz em multiângulos
Man	Manose
Mn	Massa molecular numérica média
Mw	Massa molecular ponderal média
R _g	raio de giro
RG-I	ramnogalacturonana do tipo I
RG-II	ramnogalacturonana do tipo II
Rha	Ramnose
RIPs	Proteínas Inativadoras de Ribossomos
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de ¹³ C
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear ¹ H
TCA	Ácido tricloroacético
TFA	Ácido trifluoroacético
TMS	Tetrametilsilano
UDP-ara	Uridina difosfato arabinose
UDP-gal	Uridina difosfato galactose
UDP-glc	Uridina difosfato glucose
UDP-xyl	Uridina difosfato xilose
VIS	Viscosidade
XET	xiloglucana endotransglicosilase
XLLG	Nonassacarídeo formado por quatro glucoses, três xiloses e duas galactoses
XLXG	Octassacarídeo formado por quatro glucoses, três xiloses e uma galactose
XXLG	Octassacarídeo formado por quatro glucoses, três xiloses e uma galactose
XXXG	Hepatassacarídeo formado por quatro glucoses e três xiloses

Xyl Xilose

SIGLAS DAS FRACÇÕES POLISSACARIDICAS

PH ₂ O ₂₆	Fração polissacarídica resultante da primeira extração com água
P2H ₂ O ₂₆	Fração polissacarídica resultante da segunda extração com água
P3H ₂ O ₂₆	Fração polissacarídica resultante da terceira extração com água
P4H ₂ O ₂₆	Fração polissacarídica resultante da quarta extração com água
PFH ₂ O	Fração polissacarídica resultante da extração com água precedida de inativação enzimática com fervura da semente
PH ₂ O	Fração polissacarídica resultante da extração com água antecipada de inativação enzimática com metanol água sob refluxo
poli k1	Fração polissacarídica resultante da extração com hidróxido de potássio 1 Molar
poli k4	Fração polissacarídica resultante da extração com hidróxido de potássio 4 Molar
poli r1	Fração polissacarídica resultante da primeira extração com água a 50° C
poli r2	Fração polissacarídica resultante da segunda extração com água a 50° C
poli r3	Fração polissacarídica resultante extração com água a 70° C
PRPC	polissacarídeos de reserva de parede celular
PTCA	Fração polissacarídica resultante da extração com água antecipada de inativação enzimática com ácido tricloro acético

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	xiv
LISTA DE TABELAS.....	xvi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	Xvii
1.0 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Parede celular uma visão geral.....	1
1.1.1 <u>Parede celular primária.....</u>	2
1.1.1.1 <i>Parede celular primária tipo I.....</i>	6
1.1.1.2 <i>Parede celular primária tipo II.....</i>	6
1.1.2 <u>Parede celular secundária.....</u>	9
1.1.3 <u>Polissacarídeos de reserva de parede celular</u>	10
1.1.3.1 <i>Xiloglucana.....</i>	12
1.1.3.1.1 <i>Biossíntese de xiloglucana.....</i>	15
1.1.3.1.2 <i>Degradação de xiloglucana.....</i>	16
1.2 Lectinas.....	22
1.3 Interação polissacarídeo lectina	28
1.4 <i>Mucuna sloanei</i>.....	30
2.0 HIPÓTESE DE TRABALHO.....	32
3.0 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL.....	34
4.0 MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4.1 <u>Material</u>.....	37
4.1.1 <u>Substâncias químicas e reagentes.....</u>	37
4.1.2 <u>Hemácias.....</u>	37
4.1.3 <u>Sementes.....</u>	37
4.2 <u>Métodos</u>.....	38
4.2.1 <u>Análise centesimal da semente de <i>Mucuna sloanei</i>.....</u>	38
4.2.1.1 <i>Determinação de umidade.....</i>	38
4.2.1.2 <i>Determinação de cinzas</i>	38
4.2.1.3 <i>Determinação de proteína total.....</i>	38
4.2.1.4 <i>Determinação de lipídios.....</i>	38
4.2.2 <u>Isolamento e análise dos polissacarídeos de semente de <i>Mucuna sloanei</i>.....</u>	39
4.2.2.1 <i>Tratamento da semente com água quente.....</i>	39
	xix

4.2.2.2 Tratamento com MeOH:H ₂ O e extração com TCA.....	39
4.2.2.3 Tratamento com MeOH:H ₂ O e extração com água.....	39
4.2.2.4 Extração sequencial dos polissacarídeos de sementes de <i>Mucuna sloanei</i>	40
4.2.2.5 Teor de carboidrato.....	42
4.2.2.6 Determinação de proteína.....	42
4.2.2.7 Espectroscopia de absorção no UV-VIS.....	42
4.2.2.8 Hidrólise ácida total.....	42
4.2.2.9 Cromatografia em papel.....	43
4.2.2.10 Redução e acetilação.....	43
4.2.2.11 Cromatografia líquido-gasosa.....	44
4.2.2.12 Análise de HPSEC-MALLS.....	44
4.2.2.13 Determinação de ácido urônico.....	45
4.2.2.14 Rotação óptica.....	45
4.2.2.15 Metilação.....	45
4.2.2.16 Cromatografia líquida-gasosa acoplada a espectrometria de massa	46
4.2.2.17 Absorção no infra vermelho.....	46
4.2.2.18 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear	46
4.2.2.19 Estudo dos oligossacarídeos.....	47
4.2.2.19.1 Hidrólise enzimática.....	47
4.2.2.19.2 Análise dos oligossacarídeos por HPAEC-PAD.....	47
4.2.2.19.3 Caracterização dos oligossacarídeos por eletrospray.....	47
4.2.2.20 Reticulação com epicloridrina.....	48
4.2.3 <u>Isolamento e Caracterização da Lectina de semente de <i>Mucuna Sloanei</i></u>	48
4.2.3.1 Cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex 75.....	49
4.2.3.2 Eletroforese em gel de poli(acrilamida).....	49
4.2.3.3 Eletroforese bidimensional.....	50
4.2.3.4 Determinação de carboidrato na fração lectínica.....	50
4.2.3.5 Espectroscopia de UV-VIS.....	51
4.2.3.6 Dicroísmo circular e cálculo das frações da estrutura secundária.....	51
4.2.3.7 Análise da seqüência amino-terminal.....	51

4.2.3.8 <u>Atividade Biológica da lectina de <i>Mucuna sloanei</i></u>	52
4.2.3.8.1 <u>Ensaio de atividade hemaglutinante</u>	52
4.2.3.8.2 <u>Inibição da atividade hemaglutinante</u>	52
4.2.3.8.3 <u>Ensaio de atividade tóxica em cavidade peritoneal</u>	53
4.2.3.8.4 <u>Interação da lectina e polissacarídeo in vitro</u>	53
4.2.3.8.4.1 <u>Cromatografia de afinidade</u>	54
4.2.3.8.4.2 <u>Preparação da matriz de afinidade Sepharose CL- 4B acoplada com sloanina</u>	54
4.2.3.8.4.2 <u>Espectroscopia de fluorescência</u>	54
5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1 <u>Características gerais da semente de <i>Mucuna sloanei</i> e análise elementar</u>	56
5.2 <u>Isolamento e análise dos polissacarídeos de semente de <i>Mucuna sloanei</i></u>	58
5.2.1 <u>Extração e composição</u>	58
5.2.2 <u>Análise de HPSEC-MALLS</u>	60
5.2.3 <u>Análise de Metilação</u>	66
5.2.4 <u>Análises de infravermelho</u>	69
5.2.5 <u>Espectroscopia de ressonância magnética nuclear</u>	71
5.2.6 <u>Análise HPAEC-PAD e elétron spray</u>	74
5.2.7 <u>Reticulação com epícloridrina</u>	76
5.3 <u>Isolamento e Caracterização da lectina de semente de <i>Mucuna sloanei</i></u>	78
5.3.1 <u>Estimação da massa molecular de sloanina</u>	81
5.3.2 <u>Eletroforese bidimensional</u>	82
5.3.3 <u>Conteúdo de carboidrato na lectina</u>	83
5.3.4 <u>Espectroscopia UV-VIS</u>	83
5.3.5 <u>Absorvitividade molar</u>	84
5.3.6 <u>Sequência N-terminal</u>	84
5.3.7 <u>Espectros de CD e estimativa da estrutura secundária por dicroísmo circular</u>	84
5.3.8 <u>Atividade biológica da lectina de semente <i>Mucuna sloanei</i></u>	85
5.3.8.1 <u>Atividade hemaglutinante</u>	85
5.3.8.2 <u>Propriedades de ligação a açúcar</u>	86
5.3.8.3 <u>Atividade tóxica</u>	87
5.3.8.4 <u>Interação da lectina com o polissacarídeo de semente <i>M. Sloanei</i></u>	87
5.3.8.4.1 <u>Cromatografia de afinidade</u>	88

5.3.8.4.2 <i>Espectroscopia de fluorescência</i>	89
6.0 CONCLUSÕES	92
7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94

INTRODUÇÃO

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 Parede celular: uma visão geral

Nos organismos multicelulares, as células são embebidas em uma complexa matriz extracelular que influencia a forma e o desenvolvimento da célula. Células animais possuem esta matriz extracelular na sua superfície, mas as células vegetais possuem uma parede polissacarídica que a envolve completamente. Várias diferenças entre animais e vegetais com respeito à nutrição, crescimento, reprodução, e mecanismos de defesa, podem ser traçadas a partir do estudo da parede celular vegetal sendo, portanto a parede celular uma distinção fundamental entre estes dois tipos de organismos (CARPITA & GILBEAUT, 1993; PERRIN, 1999).

A estrutura complexa dos polissacarídeos da parede celular combina força com plasticidade que é requerida para expansão e crescimento do vegetal. Para isto, esta parede deve possuir sinalizadores que controlem os aspectos mecânicos de desenvolvimento do vegetal, como síntese da própria parede e expansão entre células adjacentes e conseqüentemente o desenvolvimento do organismo como um todo. Essa parede também tem a função de proteger a planta contra o ataque de predadores (CAMPBELL & BRAAM, 1999; PILLING & HOFTE, 2003).

A regulação endógena da expansão das células vegetais parece ser determinada por mecanismos específicos da parede celular. Esse processo é resultado da interação entre pressão de turgor interna e resistência mecânica da parede (SHPIGEL *et al*, 1998). O crescimento das células vegetais envolve muitos eventos enzimáticos, incluindo a quebra de fragmentos e possivelmente a clivagem enzimática de pontes de hidrogênio entre os polímeros da parede celular, resultando no afrouxamento da mesma. Em oposição a esse afrouxamento, ocorre a reconexão dos fragmentos cortados e a síntese e inserção de novos polímeros na parede celular, fortalecendo a matriz (PROSEUS *et al*, 1999).

A maioria do carbono fixado fotossinteticamente é incorporada como polímero da parede celular sendo, portanto a fonte mais abundante de biomassa e energia renovável da terra. O material da parede celular é de grande importância prática para a nutrição humana e animal bem como principal fonte de fibra natural para tecidos e papel (REITER, 2002).

INTRODUÇÃO

A parede celular é expandida para permitir o turgor dirigido pela expansão celular (COSGROVE, 2000). Um dos mistérios do crescimento celular vegetal que pesquisadores têm estudado por décadas é como essas glucanas entrelaçados afrouxam-se sem comprometer a resistência da parede vegetal (PEÑA, 2004).

Duas camadas de parede celulares podem ser descritas: a parede celular primária e a parede celular secundária.

1.1.1 Parede celular primária

A parede celular primária (Figura 1) é formada durante o crescimento celular e precisa ser estável mecanicamente e suficientemente extensível para permitir a expansão celular. A parede celular primária é composta de aproximadamente 90% de polissacarídeos (que podem ser amplamente classificados como celulose, hemiceluloses (polissacarídeos de ligação com a celulose) e pectinas) e 10% de proteínas.

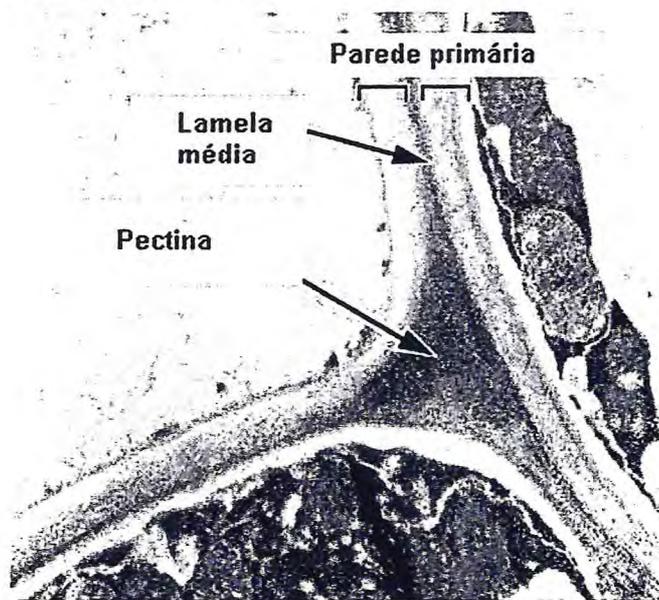


Figura 1 – Micrografia eletrônica de parede celular primária. Observa-se a lamela média e as junções das células que às vezes são preenchidos por polissacarídeos ricos em pectinas. Fonte: Buchanan, 2000.

As hemiceluloses (xiloglucanas, arabinoxilanas ou mananas) e pectinas são componentes da parede celular que muitas vezes são referidas como polissacarídeos de matriz. Nas figuras 2A e 2B estão representados um modelo de parede celular onde a parede é vista em corte transversal.

INTRODUÇÃO

As microfibrilas de celulose são envolvidas por hemicelulose e a rede se interliga através de polímeros de hemicelulose. Em C está representada a parede de reserva em que o polímero acumulado é derivado das pectinas (arabinogalactanas em sementes de lupino e de café). Nesse caso, é possível que ainda existam algumas microfibrilas e hemiceluloses embebidas em grande quantidade de polissacarídeos pécticos. Em D estão representadas as paredes cujo polímero de reserva é a galactomanana ou a xiloglucana. Estas representações assumem que as “amplificações” de hemiceluloses ou pectinas ainda possuem algumas microfibrilas juntamente com pequenas quantidades de outros polissacarídeos típicos da parede celular. Isto se baseia em análises químicas dos polissacarídeos extraídos e também em algumas observações citoquímicas ao microscópio óptico e ao microscópio eletrônico utilizando complexos enzima-ouro coloidal como sondas. Este modelo foi baseado no desenho apresentado por Cosgrove (2000). O domínio protéico, que normalmente representa menos que 10% da parede celular foi omitido.

As hemiceluloses são sintetizadas dentro das cisternas de Golgi, enquanto a celulose é gerada na membrana plasmática na forma de microfibrilas. Celulose, um polímero de unidades de glucose ligados β -1 \rightarrow 4, constitui cerca de 20 a 30% da parede celular primária. Os outros polissacarídeos da parede celular são moléculas complexas (McNEIL *et al*, 1984). As microfibrilas são arranjos paracristalinos de dezenas de cadeias de glucanas ligadas β -(1 \rightarrow 4) que são fortemente ligadas por numerosas pontes de hidrogênio. As microfibrilas podem enrolar-se ao acaso ao redor de uma célula meristemática esférica ou ao redor de uma célula em expansão. Todavia, em células de alongação Figura 3 (A), as microfibrilas dão voltas na parede celular em arranjos levemente helicoidais quase transversais ao longo do eixo celular e pode parecer uma membrana plasmática Figura 3 (B). Uma microfibrila simples Figura 3 (C) é representada seccionada em Figura 3 (D). Uma cadeia glucana no centro da microfibrila tem um espaçamento preciso. O arranjo estrutural dos átomos no centro da microfibrila tem sido determinado por difração de raios-X.

INTRODUÇÃO

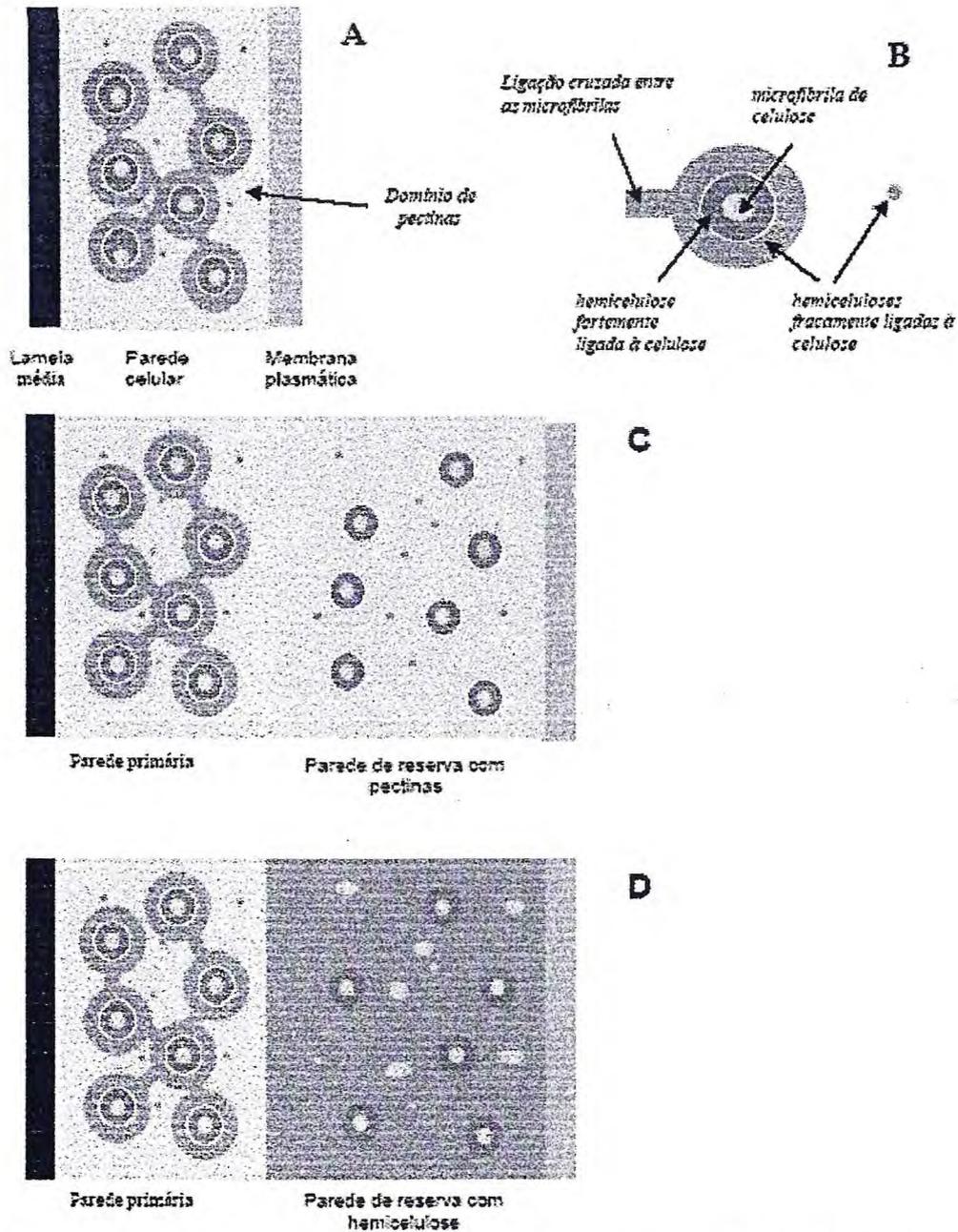


Figura 2 - Representação esquemática da parede celular primária (A) e (B) em corte transversal - O domínio celulose-hemicelulose está embebido em um domínio péctico. (C) está representada a parede de reserva em que o polímero acumulado é derivado das pectinas. (D) estão representadas as paredes cujo polímero de reserva é a galactomanana ou a xiloglucana. Fonte: Buckeridge, 2000b.

INTRODUÇÃO

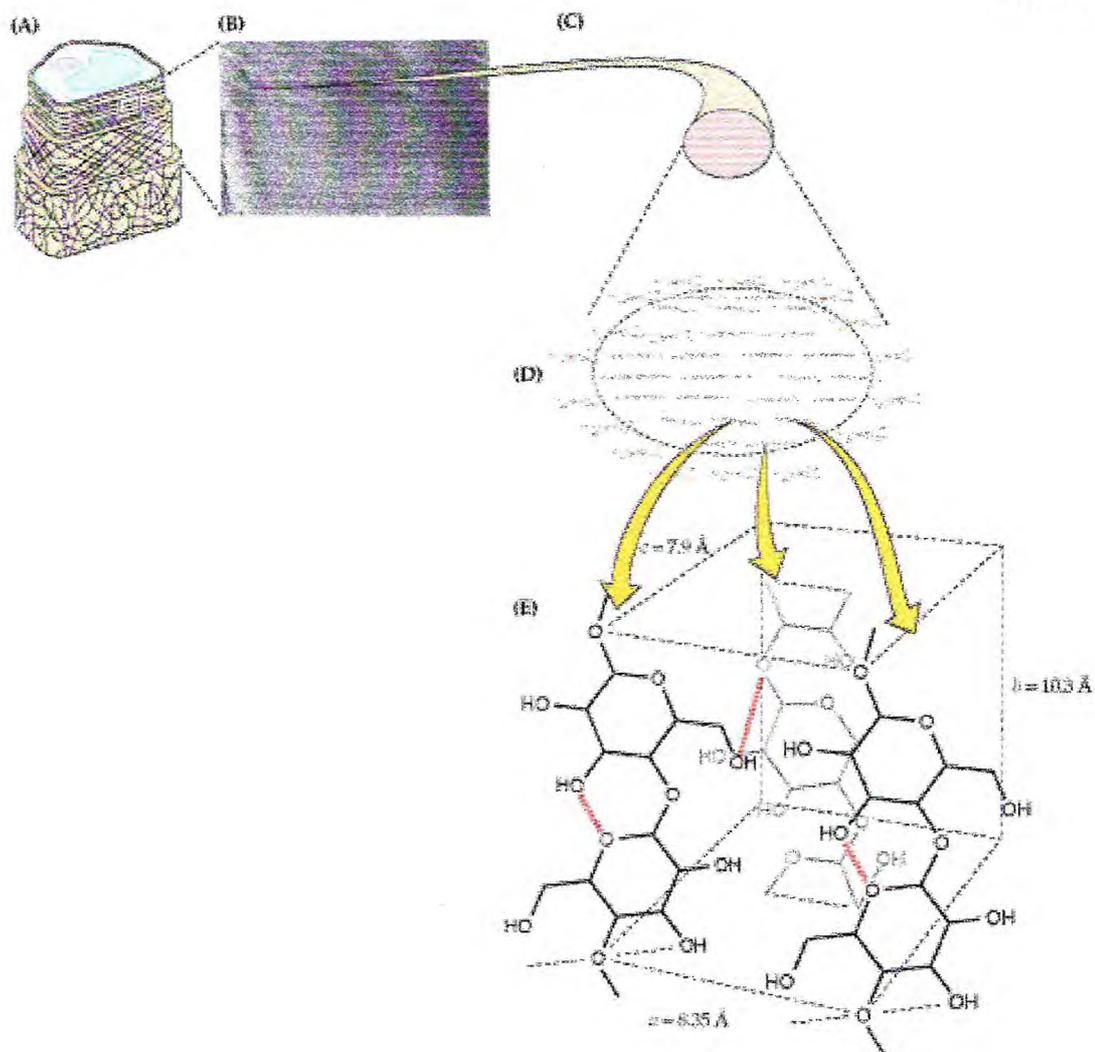


Figura 3 – Microfibrilas de celulose. (A) Em células de alongação, (B) arranjos ao longo do eixo celular, (C) uma microfibrila simples, (D) detalhe da microfibrila, (E) representação química. Fonte: BUCHANAN, 2000.

Dois tipos distintos de parede celular primária são classificados de acordo com a estrutura química de seus componentes Carpita e Gibeaut, (1993): parede celular do tipo I e parede celular do tipo II.

INTRODUÇÃO

1.1.1.1 *Parede celular primária do tipo I*

As paredes do tipo I (figuras 4A e 5), encontradas em dicotiledôneas e monocotiledôneas não comelinóides, são constituídas, fundamentalmente, por uma rede de microfibrilas de celulose de 5 a 15 nm de largura e espaçadas de 20 a 40 nm, enoveladas em forma de bobina. As fibras de celulose são envolvidas e interconectadas pelas cadeias de xiloglucanas (FRY *et al*, 2003). Outros polissacarídeos hemicelulósicos também podem ser encontrados, como gluco e galactoglucomananas, galactomananas, (1→3)β-D-glucanas e glucuronoarabinoxilanas, porém em menores quantidades. Toda a rede de polissacarídeos estaria embebida em uma matriz péctica, formada principalmente por homogalacturonanas (HGA) e ramnogalacturonanas do tipo I (RG-I) e ramnogalacturonanas do tipo II (RG-II). Neste aspecto, o modelo apresenta três diferentes domínios de interação na parede: o primeiro domínio, formado pela rede celulo-xiloglucana, que estaria embebida em uma matriz de polissacarídeos pécticos, configurando o segundo domínio. O terceiro domínio consiste de proteínas estruturais. Polímeros neutros como arabinose e galactose estão usualmente ligados como ramificações, as unidades ramosil de RG-I nos polissacarídeos pécticos. Algumas destas cadeias laterais são posteriormente reticuladas por ligações ésteres a outros componentes pécticos ou a polímeros não-pécticos através de unidades feruloil e cumaroil. Na rede péctica, íons de cálcio servem como reticulantes entre os grupos de ácido carboxílico desesterificado particularmente nos domínios HGA e RG-I, enquanto pontes de éter borato reticulam os domínios de RG-II (WILLATS *et al*, 2001; YOKOYAMA & NISHITANI, 2004).

1.1.1.2 *Parede celular primária do tipo II*

As paredes do tipo II (figura 4B e 6) são encontradas apenas em monocotiledôneas comelinóides, que incluem cereais tais como arroz (*Oryza sativa*), aveia e cevada. As glucanas que predominam e envolvem as microfibrilas de celulose são cadeias de glucuronoarabinoxilanas, da mesma forma como ocorre com as xiloglucanas, nas paredes do tipo I. As pectinas também se encontram presentes, formadas pelas cadeias de ácido poligalacturônico e ramnogalacturonanana do tipo I (RG-I), contendo cadeias laterais de arabinanas, galactanas ou arabinogalactanas. Uma proteína, rica em treonina, também está presente na matriz.

INTRODUÇÃO

(NISHITANI & NEVINS, 1991; CARPITA & GIBEAUT, 1993; ISHII, 1997; LAM *et al*, 1994; YOKOYAMA & NISHITANI, 2004).

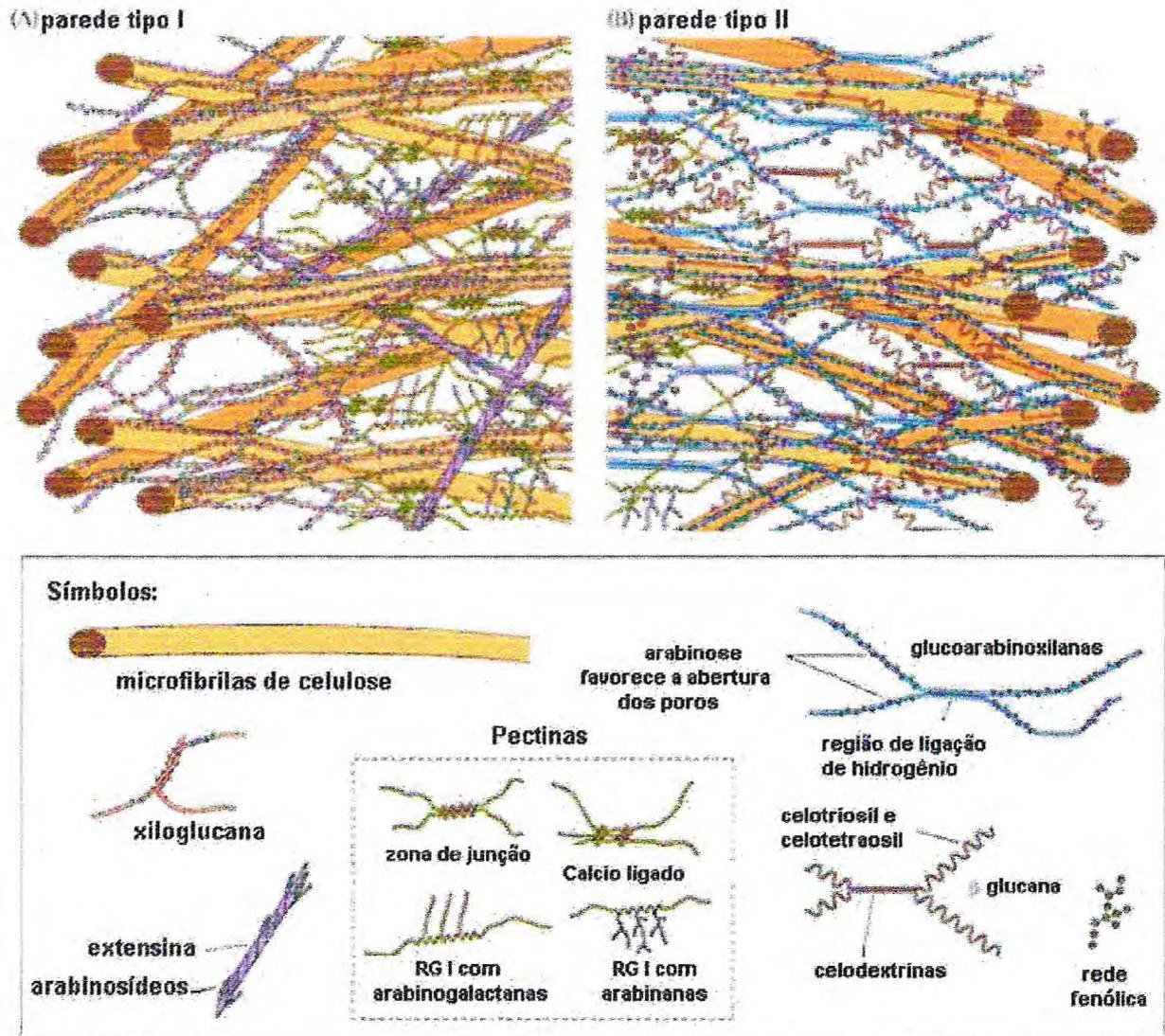


Figura 4 - (A) Modelo tridimensional da parede celular do tipo I mostrando a interação molecular entre: xiloglucanas, pectinas e proteínas da parede. (B) Modelo tridimensional da parede celular do tipo II, mostrando a interação molecular entre celulose, glucuronarabinoxilanas, pectinas e substâncias aromáticas. Fonte: BUCHANAN, 2000.

INTRODUÇÃO

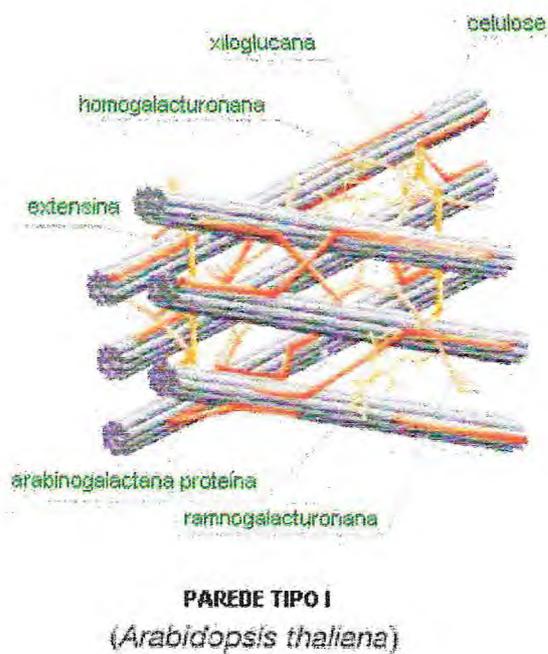


Figura 5 - Modelo estrutural esquemático simplificado de parede celular do tipo I baseado no modelo de Carpita e McCann (2000). Fonte: YOKOYAMA, 2004

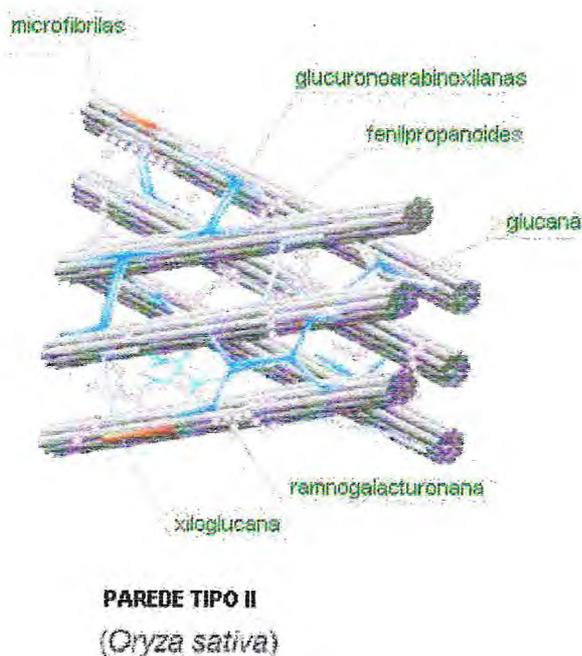


Figura 6 - Modelo estrutural esquemático simplificado de parede celular do tipo II baseado no modelo de Carpita e McCann (2000). Fonte: YOKOYAMA, 2004.

INTRODUÇÃO

1.1.2 Parede celular secundária

A parede celular secundária (Figura 7) é depositada após ter cessado o crescimento celular e confere estabilidade mecânica sobre tipos celulares especializados tais como os elementos dos vasos do xilema e as células do esclerênquima.

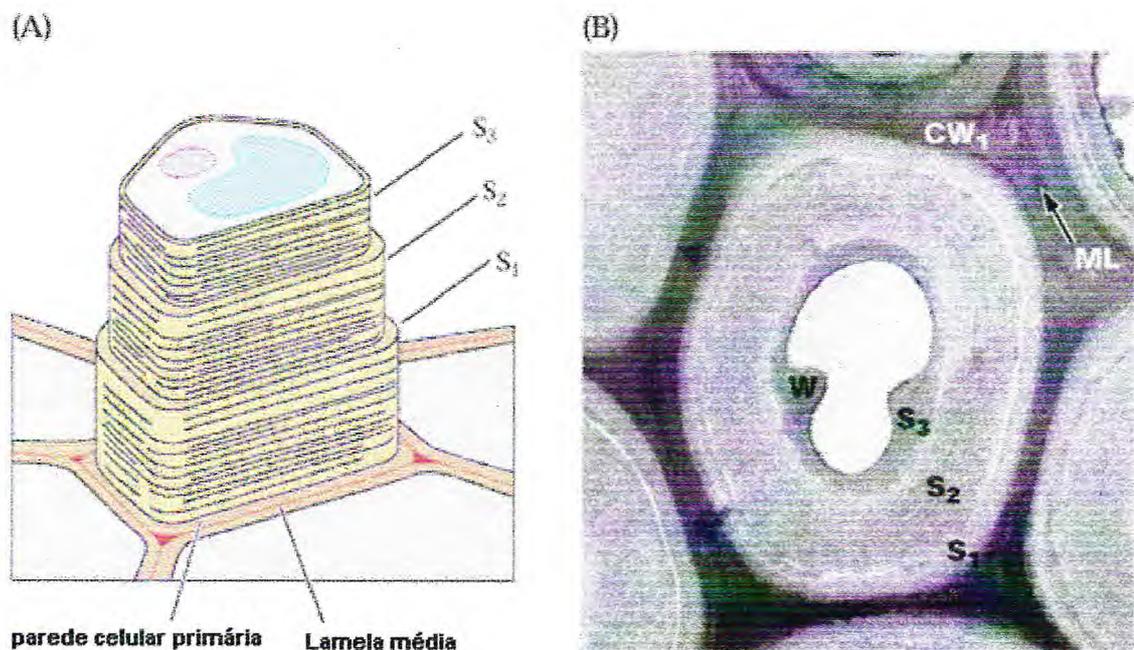


Figura 7 - O lúmen da célula às vezes é rodeado por várias camadas diferentes de parede secundária (S1-S3), pela parede celular primária (CW1) e pela lamela média (ML).
Fonte: BUCHANAN, 2000.

A parede celular secundária é uma espessa camada depositada internamente à parede primária, constituindo cerca de 90 % da parede celular em espessura (Figura 7), cada camada possui uma orientação própria das microfibrilas de celulose entre as quais se encontram localizadas porções de lignina e hemiceluloses. Essa parede começa a ser formada no momento em que cessa a expansão da parede celular primária, deposita-se na forma de um cilindro, em torno da parede primária pré-existente (EMONS & MULDER, 1998).

A característica mais óbvia para distinguir a parede secundária é a incorporação de ligninas, rede complexa de compostos aromáticos chamados fenil-propanoides. A parede secundária de cotilédones e endospermas de algumas sementes de vegetais não contém ou contém

INTRODUÇÃO

celulose em baixa quantidade, mas em compensação apresenta polissacarídeos não celulósicos encontrados na parede primária (CARPITA & McCANN, 2000).

1.1.3 Polissacarídeos de reserva de parede celular (PRPC)

A ampla variedade de formatos de sementes encontrada na natureza pode ser vista como consequência de uma estratégia de adaptação da planta. Existem extremos, algumas sementes não contêm compostos de reserva e dependem essencialmente de interações interespecíficas, como em sementes de algumas orquídeas (BRYANT, 1995), em outras espécies, as sementes acumulam grande quantidade de compostos de reserva no endosperma (amido, em cereais e galactomananas, de parede celular em algumas leguminosas) nos cotilédones (proteínas, em soja e xiloglucanas, polissacarídeos de reserva de parede celular (PRPC) em algumas leguminosas), enquanto outras espécies têm adotado uma terceira estratégia, uma adaptação dos cotilédones como órgão fotossintético, como exemplo: *Anadenanthera falcata*, *Peltogyne gracilipes*, ambas leguminosas (BUCKERIDGE & REID, 1996).

Os polissacarídeos de reserva da parede celular de sementes são muito similares em estrutura às hemiceluloses individuais ou aos componentes pécticos da matriz “normal” da parede celular vegetal (MEIER & REID, 1982, REID, 1985, REID & EDWARDS, 1995).

Os polissacarídeos de reserva da parede celular têm sido usualmente classificados em três grupos: mananas, xiloglucanas e galactanas (BUCKERIDGE & REID, 1996; REID, 1985; REID & BEWLEY, 1979). Esta classificação é essencialmente baseada na estrutura, sendo que as mananas podem também ser divididas em mananas puras, glucomananas e galactomananas (Tabela 1) (BUCKERIDGE & REID, 1996).

Os polissacarídeos de reserva da parede celular são relativamente inertes no que concerne à sua reatividade química e apresentam diferentes graus de solubilidade em água. Essas características conferem-lhes vantagens que são similares às do amido (alta compactação e baixa reatividade). O custo para produzir tais polímeros é alto, pois necessitam de um complexo sistema de biossíntese, secreção e montagem extracelular. (BUCKERIDGE, 2000b)

A biossíntese dos polissacarídeos de parede celular requer nucleotídeo-açúcares como doadores de monossacarídeos. As enzimas da biossíntese dos polissacarídeos são traduzidas, pode sofrer modificações no retículo endoplasmático e transportadas para o complexo de Golgi,

INTRODUÇÃO

onde a maioria das reações de biossíntese destes polissacarídeos ocorre. Os polissacarídeos são secretados para o espaço intercelular onde ocorrerá a “montagem” da parede através da orientação das microfibrilas de celulose e constituição dos diferentes domínios de polissacarídeos da parede. Como essa montagem ocorre ainda é desconhecida (BUCKERIDGE, 2000b).

Tabela 1 - Algumas características dos polissacarídeos de reserva da parede celular e sua ocorrência:

Polissacarídeo	Unidades da cadeia principal	Unidades de açúcar nas ramificações	Nucleotídeo açúcar necessário para biossíntese	Enzimas hidrolíticas envolvidas na mobilização	Localização na planta e exemplo
Mananas	Manose	Não	GDP-man UDP-gal	Endo- β -mananase	Semente (<i>Palmae</i> , café, gergelim)
Glucomananas	Glucose Manose	Galactose	GDP-man UDP-glc UDP-gal	Endo- β -mananase, Endo- β -glucanase, α -galactosidase	Semente (alface, tomate) e órgãos subterrâneos (<i>Liliaceae</i>)
Galactomananas	Manose	Galactose	GDP-man UDP-gal	Endo- β -mananase, α -galactosidase, exo-mananase,	Semente (leguminosa, Convolvulácea, Anonácea)
Xiloglucanas	Glucose	Xilose Galactose Arabinose	UDP-glc UDP-xyl UDP-gal	Xiloglucana- endo- β -transglicosilase, Xiloglucana- endo- β -glucanase, β -galactosidase, α -xilosidase, β -glucosidase	Semente (leguminosa, <i>Tropaeolaceae</i> , <i>Mirineaceae</i>)
(Arabino)galactanas	Galactose	Arabinose	UDP-gal UDP-ara	Exo-galactanase, α -arabinosidase	Semente (leguminosae, café)

Fonte: BUCKERIDGE & REID, 1996

INTRODUÇÃO

Além da função de reserva como o amido, os polissacarídeos de reserva da parede celular apresentam outras funções paralelas. Como por exemplo uma função associada à dureza que é encontrada para mananas em endospermas de sementes de palmeiras, tomate e alface. As xiloglucanas em cotilédones e galactomananas em endospermas de sementes de leguminosas podem estar associadas à relação hídrica. As galactanas em cotilédones de lupino e, em menor proporção, em sementes de feijão e soja podem está associada ao controle da expansão celular (BUCKERIDGE & REID, 1996).

1.1.3.1 Xiloglucana

As xiloglucanas são os polissacarídeos hemicelulósicos mais característicos presentes em parede celular primária. Mas também podem ser localizados em tecidos vasculares secundários (BOURQUIM *et al.*, 2000). São bastantes encontrados em paredes de dicotiledôneas, mais também, em menor extensão, em paredes de monocotiledôneas (JOSELAU & CHAMBAT, 1984).

A presença e a mobilização de xiloglucanas foram primeiramente reportada pela descrição de “amiloides” em sementes de *Impatiens balsamina*, *Tropaeolum majus* e *Cyclamen europaeum* por Heinricher, (1888), (REISS, 1889). A distribuição botânica de xiloglucana foi revisada por Kooiman (1960) utilizando a capacidade deste polímero de se corar com iodo/iodeto (apresentando uma coloração azul), como uma forma de detecção em sementes de diferentes espécies. Mas, somente após a descrição da xiloglucana de *Tamarindus indica* (SHIBUYA & MISAKI, 1978; SIDDIQUI & WOOD 1971) foi que várias outras foram isoladas e caracterizadas, como as xiloglucanas de sementes de *Copaifera langsdorffii* (BUCKERIDGE *et al.*, 1992); de *Hymenaea courbaril* (LIMA *et al.*, 1993), de *Detarium senegalense* (WANG *et al.*, 1996), de *Detarium microcarpum* e de *Mucuna flagellipes* (ONWELUZO *et al.*, 2002).

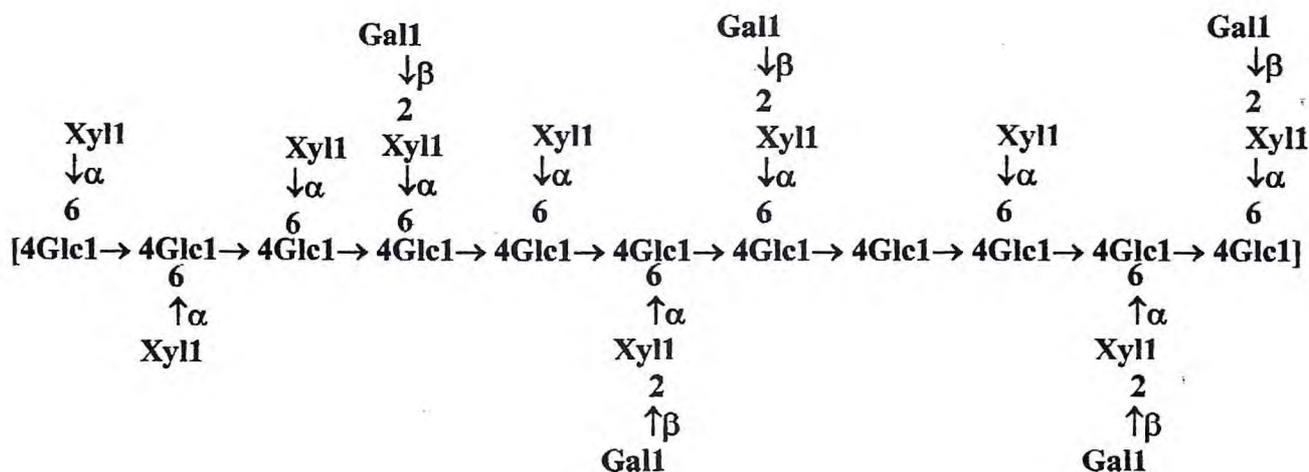
Também foram encontradas xiloglucanas em fibras, folhas e cultura celular em suspensão de algodão (*Gossypium hirsutum*) (BUCHALA *et al.*, 1993), em folhas de *Hymenaea courbaril* (BUSATO *et al.*, 2001), em tecido do parênquima de maçã (*Malus domestica*) (RUPEREZ *et al.*, 1985), em casca de uva *Vitis vinifera* (IGARTUBURU *et al.*, 1998), em casca de ervilha (GOFF *et al.*, 2001), em casca de *Picea engelmanni* ou tecidos de troca de *Populus tremuloides* e de *Tilia americana* (SIMSON & TIMELL, 1978), em paredes celulares de *Olea europaea* (VIERHUIS *et*

INTRODUÇÃO

al., 2001), de *Nicotiana tabacum* (EDA & KATO, 1978), de *Solanum tuberosum* (VINCKEN *et al.*, 1996), polissacarídeos extracelular e de parede celular (ECPs) de cultura em suspensão de *Nicotiana tabacum*, ECPs de *Nicotiana plumbaginifolia* (SIMS & BASIC, 1995; SIMS, *et al.* 1996), e de “Paull’s Scarlet” rosa (*Rosa* sp.) (Mc DOUGALL & FRY 1990), as de tomate (*Lycopersicon esculentum*) (YORK *et al.*, 1996) e até de flores de *Nerim indicum* (DING *et al.*, 2003).

As hemiceluloses podem ser extraídas com água fria, quente ou soluções alcalinas, geralmente NaOH 2,5 N ou KOH 4,0 N. As xiloglucanas consistem de D-glucose, D-xilose e D-galactose em diferentes proporções. L-fucose e L-arabinose podem também estar presentes. As xiloglucana com L-fucose não sejam extraídas com água. A estrutura básica consiste em uma cadeia principal de unidades de D-glucopiranosil ligadas β(1→4) com substituições de uma cadeia lateral de unidades de D-xilopiranoses α-ligadas em O-6. Existem evidências que algumas cadeias laterais são estendidas pela adição de β-D-galactopiranosose ou α-L-fucopiranosídeos(1→2)-β-D-galactopiranosose ligados em O-2 das unidades de α-D-xilopiranosídeos (BAUER *et al.*, 1973; DARVILL *et al.*, 1980).

As xiloglucanas de sementes de várias origens apresentam características estruturais comuns. A única diferença sistemática é que em xiloglucanas de reservas (Figura 8a), as unidades de galactose estão presentes como terminais redutores da cadeia lateral (SIDDIQUI & WOOD, 1971) e nas de parede primária, muitas vezes, são encontrados unidades fucosil ligados aos unidades de galactose nesta posição (FIAYASIII, 1989).



INTRODUÇÃO

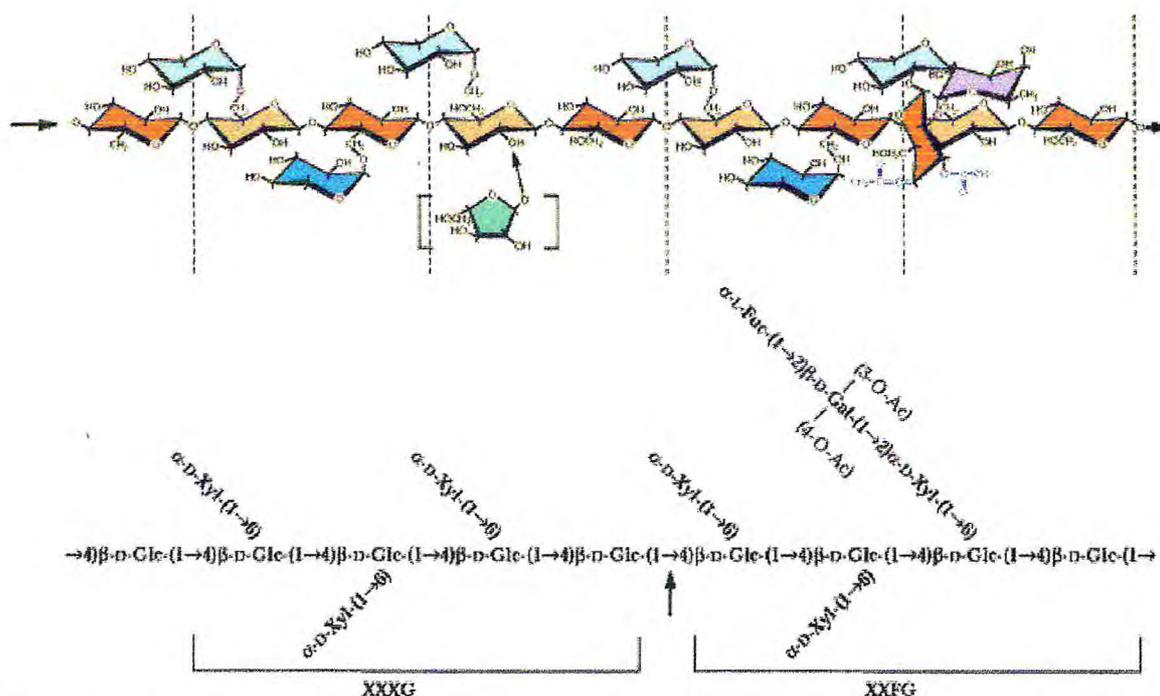


Figura 8b - Estrutura química parcial de uma xiloglucana estrutural de parede primária. Fonte: Buchanan *et al* (2000).

Segundo Hayashi (1989), as xiloglucanas foram primeiramente identificadas nas sementes de plantas, como carboidratos de reserva, sendo chamadas de amilóides devido à sua semelhança ao amido, apresentando coloração azul após tratamento com uma solução de iodo/iodeto de potássio (GAILLARD *et al*, 1969; GAILLARD, 1961; KOOIMAN, 1960; KOOIMAN, 1961). Em comum com muitas gomas de polissacarídeos extraídas de plantas, algumas xiloglucanas de sementes possuem potencial para importantes aplicações industriais, particularmente na indústria farmacêutica, alimentícia, no controle de liberação de drogas e modificação de texturas (WANG *et al*, 1997; SUISHA *et al*, 1998; TAKAHASHI *et al*, 2002).

Sem dúvida, por causa de sua posição ultraestrutural como polissacarídeo ligante entre microfibrilas de celulose e polímeros pécticos, as xiloglucanas devem ter um importante papel no alongamento da parede celular primária de vegetais (CHAMBAT *et al*, 1984, SOMERVILLE *et al*, 2004). Porém, esse certamente não é o único papel biológico destas hemiceluloses já que elas se apresentam como estruturas macromoleculares variadas indicando a possibilidade de desempenhar diferentes funções (JOSELAU & CHAMBAT, 1984). A função de reserva das

INTRODUÇÃO

se apresentam como estruturas macromoleculares variadas indicando a possibilidade de desempenhar diferentes funções (JOSELAU & CHAMBAT, 1984). A função de reserva das xiloglucanas em cotilédones já foi demonstrada de forma circunstancial em sementes de *Tropaeolum majus* (EDWARDS *et al.*, 1985), *Tamarindus indica* (REIS *et al.*, 1987), *Copaifera langsdorffii* (BUCKERIDGE *et al.*, 1992), e *Hymenaea courbaril*, (TINÉ *et al.*, 2000). Embora nenhuma evidência direta indique ainda que as xiloglucanas de reserva de sementes tenham dupla função, Buckeridge e colaboradores (2000b) sugerem que estes polissacarídeos tenham função no controle da embebição de água e xeroproteção devido suas propriedades hidrodinâmicas serem muito semelhantes às encontradas em galactomananas. Estes autores ressaltam que as relações entre estrutura e função em xiloglucanas estão nas mudanças na estrutura fina que são também relacionadas com o posicionamento das galactoses na molécula.

O aumento no peso molecular e a suspensão da fucosilação foram passos importantes na transferência de funções da parede primária para a de reserva. Enquanto o alto peso molecular leva a uma menor interação intermolecular entre as xiloglucanas, facilitando o processo de mobilização, a redução na fucosilação está provavelmente relacionada ao fato de que oligossacarídeos de xiloglucanas fucosiladas possuem efeito anti-auxina e também interferem em interações intermoleculares (McDOUGALL & FRY, 1990).

1.1.3.1.1 Biossíntese de xiloglucanas

A biossíntese de xiloglucana de semente com função de reserva, ocorre no complexo de Golgi de forma semelhante à biossíntese de xiloglucana de parede primária (BOLWELL, 2000). A cadeia principal de glucose e as ramificações de xilose são sintetizadas simultaneamente na face cis desta organela, enquanto as galactoses são adicionadas na face trans (BRUMMELL, 1990). Considerando que muitas xiloglucanas são baseadas em repetições de blocos de quatro unidades de β -D-glucosil ligados em 1 \rightarrow 4 com três substituições de unidades terminais de xilose, deve existir um mecanismo de polimerização que pode reconhecer muitas unidades de polissacarídeos. A formação da cadeia principal de glucana na xiloglucana é da mesma maneira que é sintetizada a glucana de celulose, cada açúcar ligado na cadeia principal é orientado aproximadamente a 180^o do seu vizinho. Se duas glucosiltransferases trabalham juntas para polimerizar a cadeia de glucana, duas unidades por vez, então duas xilosiltransferases devem

INTRODUÇÃO

existir. Portanto, duas glucosil e duas xilosiltransferases formam um complexo funcional e estruturalmente ligado. O alongamento do polímero deve acontecer através do complexo de síntese de xiloglucana com uma mínima rotação da cadeia e adição das unidades de xilosil no lado oposto do polímero. Também deve haver um mecanismo para deixar as unidades de glucose livres. Talvez somente uma unidade de xilosiltransferase seja ativa durante a polimerização e esta deve ter um mecanismo para permutar as unidades de xilosil. A mesma glucosil e xilosiltransferase deve iniciar e terminar o heptassacarídeo porque duas ou três unidades de xilosil de cada heptassacarídeo estão sempre do mesmo lado da cadeia. Apesar do mecanismo, as glucosil e xilosil aparecem fortemente acopladas, quando as ligações de açúcares adicionais às unidades xilosil ocorrem independentemente. Há pelo menos três tipos estruturais de xiloglucanas, todas baseadas na unidade estrutural fundamental do heptassacarídeo e adição de um mono e dissacarídeo *t*-Galp, α -L-Fuc-(1→2)- β -D-Gal-p, ou *t*-Araf na posição O-2 de algumas unidades de xilose (GIBEAUT & CARPITA, 1994). Gordon e MacIchnan (1989) demonstraram que muitos polímeros de xiloglucanas podem ser encontrados sem a adição de fucose. Os polissacarídeos são secretados para o espaço intercelular onde ocorrerá a *montagem* da parede celular através da orientação das microfibrilas de celulose e constituição dos diferentes domínios polissacarídicos da parede. O mecanismo desta montagem ainda é desconhecido.

1.1.3.1.2 Degradação de xiloglucanas

A quebra hidrolítica completa de uma molécula de xiloglucana requer teoricamente um mínimo de quatro atividades enzimáticas. Uma β -D-galactosidase, para remover as unidades terminais galactosil (1→2) ligadas, uma α -D-xilosidase para remover as unidades terminais não redutoras xilosil (1→6) ligadas, uma endo- β -D-(1→4)-glucanase que posteriormente foi chamada mais apropriadamente de xiloglucana endotransglicosilase (XET) (FANUTTI *et al*, 1993), para quebrar as ligações internas da cadeia de glucana, e uma β -D-glucosidase para completar a quebra das ligações internas na cadeia de glucana.

Reid e colaboradores, 1985 isolaram as quatro principais enzimas responsáveis pela degradação de xiloglucana em *Tropaeolum majus*. São elas, uma endo- β -D-(1→4)-glucanase, ou XET (EDWARDS *et al*, 1986; FANUTTI *et al*, 1993); uma β -D-galactosidase com alta especificidade para xiloglucana (EDWARDS *et al*, 1988), uma α -D-xilosidase específica por

INTRODUÇÃO

oligossacarídeos de xiloglucana também chamada de exo-xilo-hidrolase oligoxiloglucana (FANUTTI *et al*, 1991) e uma transglicosilante β -D-glucosidase (CROMBIE *et al*, 1998). Com base nesses resultados e em alguns outros Crombie e colaboradores (1998) propuseram um modelo para a mobilização de xiloglucana em *T. majus*. Nesse modelo, as quatro enzimas agem em conjunto sobre o polissacarídeo para liberar os monossacarídeos constituintes que seriam internalizados pela célula. Essa degradação seria um processo linear que levaria do polímero diretamente aos monossacarídeos.

Reis e colaboradores (1987) descreveram citoquimicamente a digestão da xiloglucana de parede celular de cotilédones de *Tamarindus indica*. Eles demonstraram que durante a degradação da xiloglucana a proporção entre monossacarídeos (glucose:xilose:galactose) não se altera significativamente.

Posteriormente um padrão semelhante de atividades enzimáticas foi encontrado por Alcântara e colaboradores (1999) em *Copaifera langsdorffii*. No entanto uma β -D-galactosidase mostrou uma alta especificidade frente a oligossacarídeos de xiloglucana mas não mostrou especificidade na presença do polímero íntegro. A mobilização dos cotilédones de reserva da parede celular de *C. langsdorffii* foi observada citoquimicamente, fisiologicamente e bioquimicamente por Buckeridge e colaboradores (1992). Eles estudaram duas populações diferentes, uma de floresta e outra de savana, e encontraram diferenças na mobilização das xiloglucanas das duas fontes.

Em cotilédones de *Hymenaea courbaril*, Tiné e colaboradores, (2000) mostraram que xiloglucana é mobilizada após a germinação (Figura 10) e, ao mesmo tempo, observaram a produção de frutose, glucose e sacarose. Posteriormente, esses autores detectaram as mesmas quatro enzimas de degradação de xiloglucana que foram encontradas em *T. majus*. No entanto descreveram um novo modelo para representar a degradação de xiloglucana que ocorre em apenas três etapas: (1) transglicosilação, (2) desgalactosilação, e (3) desmontagem dos oligossacarídeos. É um modelo que possui dois ciclos diferentes (transglicosilação e desmontagem) o qual está ligado pela ação de uma β -galactosidase (Figura 11). Logo depois os mesmos autores (BUCKERIDGE *et al*, 2000a) desenharam um modelo ainda mais geral para degradação de xiloglucana (Figura 12).

INTRODUÇÃO

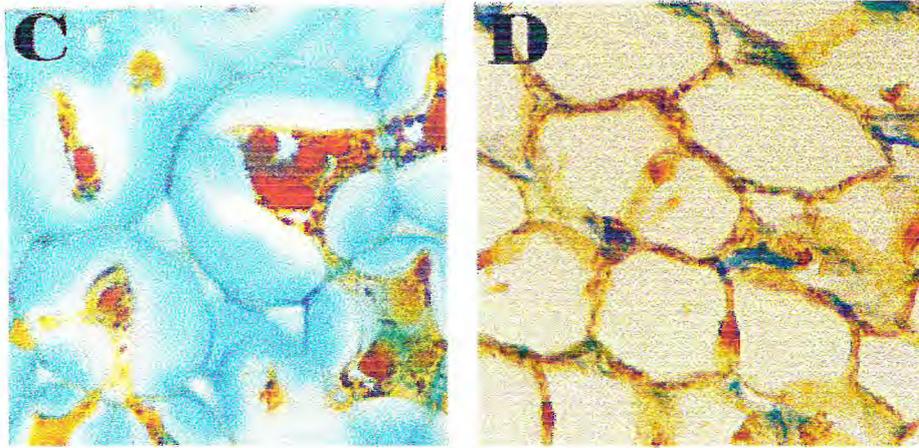


Figura 10 - Visão microscópica do corte transversal de *Hymenaea courbaril*, mostrando o espessamento da parede contendo xiloglucana (corada em azul com iodo) C- antes da mobilização e D após a mobilização. Ambos com um aumento de 400 ×. Fonte: Buckeridge *et al* (2000a).

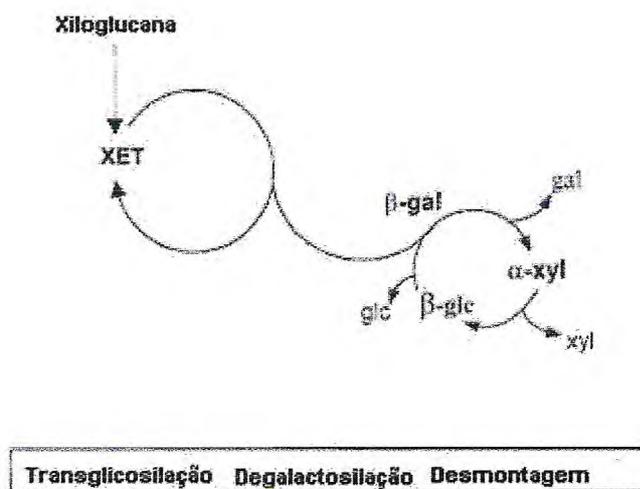


Figura 11 – Modelo proposto para a degradação de xiloglucana de reserva. Fonte: Tiné *et al* (2000).

INTRODUÇÃO

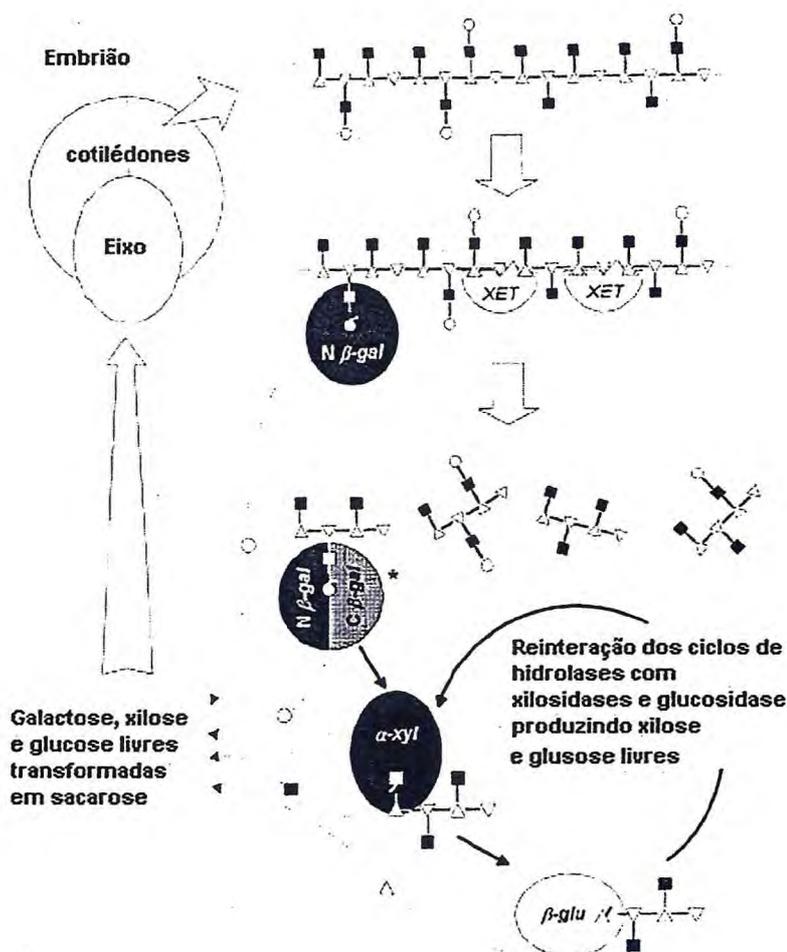


Figura 12: Representação esquemática da degradação de xiloglucana em sementes. A seqüência XLXGXLLGXXXGXXLG é usada como um exemplo de um segmento de polímero de xiloglucana com o final não redutor à esquerda. O primeiro ataque é feito pela xiloglucana endo- β -transglicosilase (XET) e β -galactosidase. Os oligossacarídeos produzidos pela ação endo são atacados pela β -galactosidase. α -xilosidase e β -glucosidase realizam hidrólises alternadas das posições terminais de finais não redutores. Fonte: Buckeridge *et al* (2000a).

Embora muitos trabalhos tenham sido realizados para desvendar a mobilização de xiloglucana em sementes, pouco tem sido feito para entender o mecanismo de controle envolvido neste processo.

Assim como muitos outros organismos, os vegetais apresentam sistemas sinalizadores que regulam a expressão de genes para o crescimento, desenvolvimento e sobrevivência em seu meio ambiente. A expressão de alguns desses genes é regulada por oligossacarídeos (DARVILL *et al*,

INTRODUÇÃO

1992). Os oligossacarídeos livres relacionados às xiloglucanas são considerados como oligossacarinas. Os oligossacarídeos derivados das xiloglucanas regulam o crescimento celular induzido por auxina, a morfogênese e a indução de inibidores das proteinases (DARVILL *et al*, 1992). A atividade biológica desses oligossacarídeos pode estar relacionada com o número e tipo de unidades monossacarídicas que compõem o oligossacarídeo (McDOUGALL & FRY, 1990; VARGAS-RECHIA *et al*, 1998).

Fry e colaboradores (1993) sugeriram uma nomenclatura para os oligossacarídeos livres relacionados às xiloglucanas, estabelecida através das unidades dos oligossacarídeos que não são substituídas, da esquerda para a direita, sendo designadas pelas letras, G (glucose), X (xilose), L (galactose), F (fucose) e S (arabinose). Quando a unidade redutora de cada oligossacarídeo esta sob a forma reduzida acrescenta-se a terminação ol (Figura 13).

INTRODUÇÃO

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

Figura 13 - Estruturas simplificadas e nomenclatura para alguns oligossacarídeos relacionados às xiloglucanas. Nas estruturas, as setas indicam as ligações glicosídicas: \rightarrow , ligação β - $(1 \rightarrow 4)$; \downarrow , ligação α - $(1 \rightarrow 6)$; \uparrow , ligação $(1 \rightarrow 2)$; \bullet , terminal redutor que pode estar sob a forma reduzida, sendo então acrescentado o sufixo ol. Fonte: Fry *et al* (1993).

INTRODUÇÃO

Um estudo de xiloglucanas de sementes de *Tropaeolum majus*, *Tamarindus indica* e *Copaifera langsdorffii*, utilizando uma celulase fúngica de *Trichoderma* altamente purificada, apresentou as mesmas quatro unidades básicas XXXG, XLXG, XXLG e XLLG nas três espécies (BUCHERIDGE *et al.*, 1992). As proporções entre estas unidades demonstraram a existência de estruturas finas (distribuição das ramificações com galactose) específicas entre as diferentes espécies e entre populações de mesma espécie crescidas em diferentes ambientes. Uma diferença nas ramificações de xilose foi encontrada em xiloglucana de sementes de *Hymenaea courbaril* (jatobá), sendo este polímero formado por uma mistura de unidades de XXXG e XXXXG que podem ser ramificadas com galactose nas diferentes posições (BUCKERIDGE *et al.*, 1997).

O efeito de auxinas na parede celular primária de xiloglucanas fucosiladas tem sido estudado mais extensivamente, inclusive já foi citado o envolvimento de lectinas ligantes de fucose ter a capacidade de diminuir a quebra de xiloglucanas bem como o afrouxamento da parede (HOSON & MASUDA, 1991). No entanto poucos trabalhos foram encontrados estudando o mecanismo de controle envolvido na mobilização de xiloglucanas de reserva. Foram os de Hansel e colaboradores (1991), que demonstraram que o ácido 2,4-diclorofenolacético (2,4-D, uma auxina sintética) foi capaz de induzir a mobilização de xiloglucana em cotilédones isolados de *T. majus* e o trabalho de Santos e colaboradores (2004) que investigaram alguns aspectos do efeito de auxinas na mobilização em cotilédones de sementes em crescimento de *H. courbaril* verificando que as auxinas parecem estar envolvidas no controle de mobilização de xiloglucana nos cotilédones.

Será que lectinas galactose ligantes também não estão envolvidas na mobilização da degradação de polissacarídeos de reserva da parede celular especificamente de xiloglucanas?

1.2 Lectinas

Durante mais de cento e vinte anos, o estudo das lectinas tem percorrido um longo caminho desde a sua primeira detecção como fito-hemaglutininas (SHARON, 2004). O estudo das lectinas teve início no século XIX, com os trabalhos de Stillmark (1888) que demonstrou a aglutinação de eritrócitos de animais pelo extrato de sementes de mamona (*Ricinus communis*). Ele denominou a substância responsável pela atividade hemaglutinante de ricina.

INTRODUÇÃO

Lectinas são encontradas na maioria dos organismos, desde vírus e bactérias a vegetais e animais. Entretanto, o maior número de lectinas já estudado pertence ao reino *Plantae*. Segundo Van Damme e colaboradores (1998), as lectinas são freqüentemente consideradas um grupo de proteínas muito extenso porque, à primeira vista, a lista de espécies que contém lectina é quase infinita. Todavia, somente um número limitado de plantas superiores contém lectinas em níveis detectáveis. Dentre as plantas, as famílias que possuem o maior número de lectinas já isoladas são as *Leguminosae* e *Solanaceae*. Também tem sido isoladas várias lectinas das famílias *Euphorbiaceae* e *Solonaceae*. Nas solonáceas, a maior parte das lectinas está associada aos turbéculos e não às sementes (MARINKOVICH, 1964; ALLEN & NEUBERGUER, 1973). A família *Leguminosae* é uma das mais estudadas. Esta família está subdividida em três subfamílias: *Caesalpinoideae*, *Mimosoideae* e *Papilonoideae* (POLHILL *et al*, 1981).

Cada molécula de lectina contém tipicamente um ou mais sítios de ligação a carboidrato. Quando elas são di ou polivalentes ao reagirem com células, por exemplo, eritrócitos, não apenas se combinam com açúcares da sua superfície, mas também ocasionam ligações cruzadas entre as células resultando na sua subsequente precipitação, um fenômeno referido como aglutinação celular. A aglutinação de eritrócito ou hemaglutinação é o principal atributo para determinar a atividade destas proteínas e é usado rotineiramente para sua detecção e caracterização. Lectinas formam também ligações cruzadas entre moléculas de polissacarídeos ou glicoproteínas em solução e induzem suas precipitações. As reações de aglutinação e precipitação de lectinas são inibidas por açúcares específicos ligantes de cada lectina (LIS & SHARON, 1998).

A habilidade das aglutininas vegetais para distinguir eritrócitos de diferentes tipos sanguíneos levou Boyd e Shapleigh (1954) a proporem o nome lectina do latim *legere*, que significa, pegar ou escolher. (SHARON & LIS, 1972).

Muitas definições foram atribuídas às lectinas porém a mais aceita atualmente é a de Peumans e Van Damme (1995). Eles definiram as lectinas como proteínas que se ligam específica e reversivelmente a carboidratos. Estas moléculas formam um grupo de proteínas heterogêneas, do ponto de vista estrutural, pois variam muito quanto ao tamanho, estrutura e organização molecular (LIS & SHARON, 1998).

Baseado na estrutura global do produto de tradução primária e proteína madura, as lectinas vegetais são subdivididas em: 'merolectinas', 'hololectina', 'quimerolectinas' (PEUMANS & VAN DAMME, 1995). As merolectinas possuem um único domínio de ligação a

INTRODUÇÃO

carboidrato, elas são monovalentes e conseqüentemente não podem precipitar glicoconjugados ou aglutinar células. Um exemplo típico de merolectina é a heveína, uma proteína pequena ligante a quitina derivada do látex de *Hevea brasiliensis* (VAN PARIJIS *et al*, 1991). As hololectinas apresentam pelo menos dois domínios de ligação para açúcares idênticos ou muito homólogos que se ligam ao mesmo açúcar ou açúcares semelhantes estruturalmente. Pelo fato das hololectinas serem por definição di ou multivalente, aglutinam células e ou precipitam glicoconjugados. A maioria das lectinas vegetais pertence ao subgrupo das hololectinas. Quimerolectinas são proteínas que compreendem um ou mais domínios ligantes a carboidratos ligados a um domínio não relacionado. Este domínio não relacionado deve ter uma função enzimática ou outra função biológica bem definida. Exemplos típicos de quimerolectinas são as quitinases tipo 1 e RIPs tipo 2. Em alguns casos, quando possuem mais de um sítio ligante a carboidrato, as quimerolectinas comportam-se como hololectinas (Figura 14).

Em um quarto grupo, denominado de “**superlectinas**”, proposto por Van Damme (1998), encontramos proteínas que possuem no mínimo, dois sítios de ligação a carboidratos não relacionados, como por exemplo, a lectina de tulipa com um domínio N-terminal para manose e um segundo domínio específico para N-acetil-galactosamina. Mais recentemente, Monteiro-Moreira (2002) sugeriu um novo grupo, as “**multilectinas**”, proteínas com sítios idênticos de ligação a distintos carboidratos.

INTRODUÇÃO

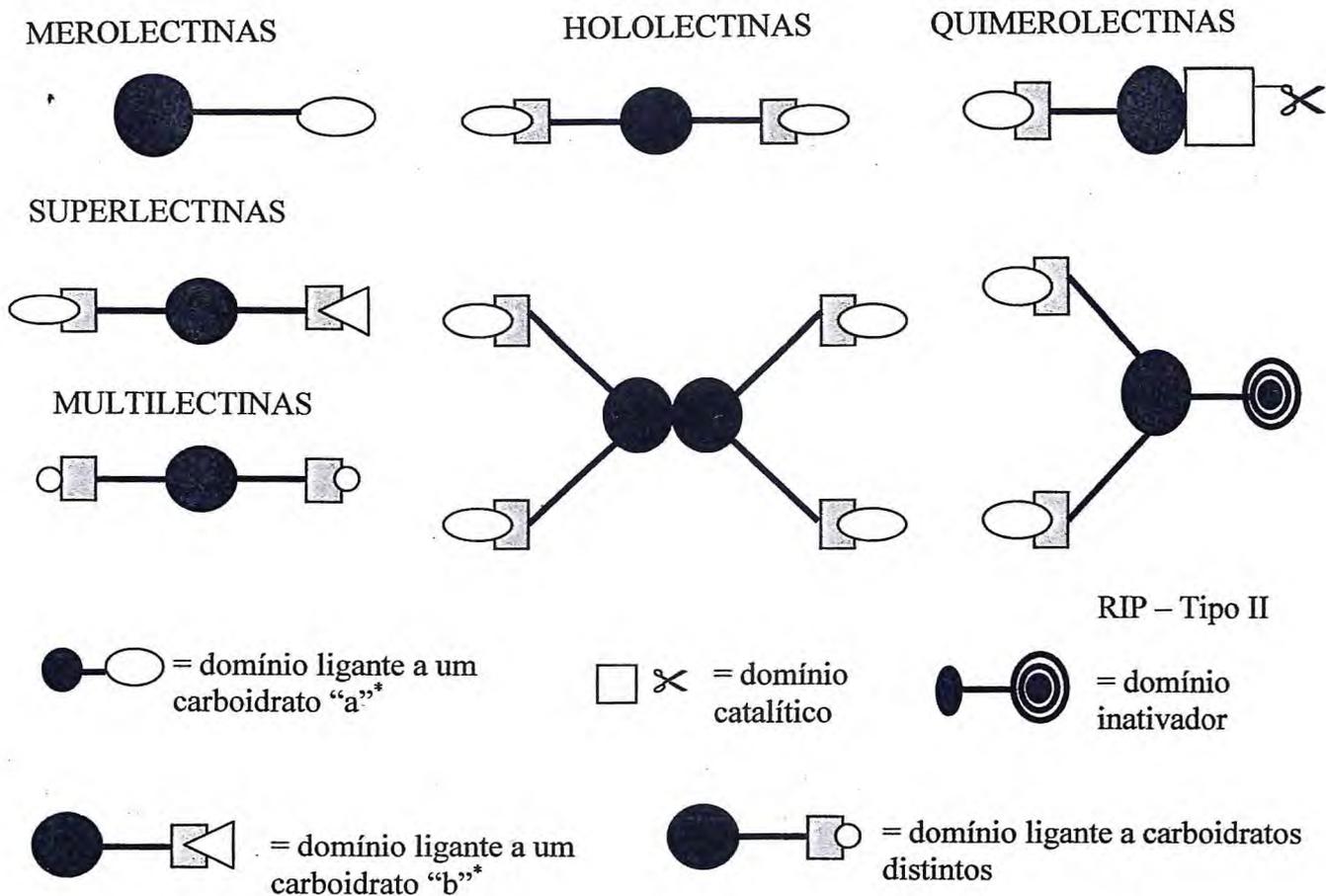


Figura 14 - Representação esquemática dos diferentes tipos de lectinas vegetais: merolectinas, hololectinas, quimerolectinas, multilectinas e superlectinas. Fonte: PEUMANS & VAN DAMME, 1995 com modificações.

Segundo Lis e Sharon (1998), com base na sua especificidade, as lectinas poderiam ser classificadas em cinco grupos de acordo com os monossacarídeos pelos quais elas exibem grande afinidade: i) manose, ii) galactose/N-acetilgalactosamina, iii) N-acetil-glucosamina, iv) fucose e v) ácido N-acetil-neuramínico (Todos estes monossacarídeos tendo configuração D com exceção da L-fucose).

A especificidade das lectinas por monossacarídeos é, no entanto, uma especificidade operacional, pois na realidade, as lectinas não encontram na natureza os monossacarídeos por si

INTRODUÇÃO

só fazendo parte de nenhuma estrutura. Tanto é, que as lectinas apresentam uma especificidade também por oligossacarídeos e polissacarídeos (OCHIENG *et al*, 1998; LIS & SHARON, 1998).

Para o isolamento de lectinas em vegetais, inicia-se normalmente pela preparação da farinha e extração desta com solução tamponada, seguida por um fracionamento com sulfato de amônio e uma cromatografia. Pelo fato da lectina ligar-se especificamente a carboidratos nas últimas décadas, utiliza-se com frequência a cromatografia de afinidade, onde a matriz contém o açúcar ligante da lectina. Se necessário, a lectina purificada por afinidade pode ser submetida a uma segunda cromatografia de afinidade ou purificação adicional por técnicas clássicas tais como, filtração em gel, troca iônica, e interação hidrofóbica (MONTEIRO-MOREIRA, 2002).

A purificação por cromatografia de afinidade é baseada nas seguintes propriedades biológicas das macromoléculas: seletividade, alta afinidade de reconhecimento e interação reversível com outras moléculas (WILCHEK & MIRON, 1999).

A primeira função fisiológica proposta para as lectinas seria de proteínas de reserva, porque as lectinas de leguminosas são sempre encontradas nos corpos protéicos; uma segunda proposta é relacionada ao transporte de açúcares (LIENER *et al*, 1986).

Outra função proposta para as lectinas seria a de estar envolvida no empacotamento das proteínas de reserva, desde que várias lectinas de leguminosas testadas demonstraram habilidade para interagir com as proteínas de reserva de suas respectivas espécies (EINHOFF *et al*, 1986).

Também já foi demonstrado que a lectina tem papel no alongamento da parede celular, na interação célula-célula, na regulação do crescimento, na interação membrana receptor, na redistribuição dos componentes da superfície celular, sendo que os mais importantes efeitos biológicos das lectinas são a aglutinação de células e a estimulação mitogênica (LIS & SHARON, 1998).

Devido ao fato de as lectinas serem encontradas também em partes vegetativas das plantas como folhas, caules, cascas de árvores e raízes pode-se supor que a sua função esteja diretamente relacionada com sua localização na planta. Existem indicações de que as lectinas participam do fenômeno de reconhecimento intercelular, propondo-se dessa maneira, duas possíveis funções fisiológicas às lectinas vegetais: a mediação da simbiose entre bactérias fixadoras de nitrogênio de raízes de leguminosas e como agentes de defesa de plantas contra patógenos e predadores, principalmente insetos e fungos (CHRISPEELS & RAIKEL, 1991).

INTRODUÇÃO

As diferentes atividades biológicas apresentadas pelas lectinas advêm da sua propriedade de interagir com carboidratos. Assim a presença de açúcares na superfície das células, correspondendo à porção glicídica das glicoproteínas e glicolipídeos de membrana, servem como sítios potenciais de ligação para as lectinas. Essa ligação poderá induzir uma variedade de mudanças, levando à expressão das propriedades biológicas (SHARON & LIS, 1993).

Apesar de mais de um século de pesquisas, as possíveis funções desempenhadas pelas lectinas nos organismos onde estão localizadas ainda continua numa posição como molécula de reconhecimento ambíguo com miríades de aplicações e funções excitantes (SHARON, 2004).

A aplicabilidade das lectinas oferecem muitas vantagens, considerando sua alta estabilidade e sua distinta especificidade, possibilitando uma ferramenta poderosa tanto para propósitos analíticos como preparativos em bioquímica, biologia celular, imunologia e áreas correlatas. O uso das lectinas em áreas clínicas e na agricultura também teve um desenvolvimento significativo. O emprego de lectinas como ferramenta biotecnológica tem sido cada vez mais ampliado, indo desde reagentes no isolamento de substâncias contendo açúcares como bioefetores e em bioensaios (MOREIRA, 1998). Abaixo são relacionadas algumas aplicações das lectinas:

- Isolamento, purificação e estudos estruturais de glicoconjugados;
- Investigação de estruturas de carboidratos complexos na superfície de células e de partículas subcelulares de animais, bactérias e vírus;
- Estudos de mudanças na superfície celular sobre transformações malignas;
- Estimulação mitogênica de linfócitos e estudos de divisão celular, constituição cromossomal celular e anormalidades cromossômicas;
- Separação celular;
- Diagnóstico e identificação de microorganismos;
- Tipagem sanguínea;
- Transportadores de drogas;
- Defesa de plantas contra predadores;
- Uso de plantas transgênicas expressando lectinas, tornando a planta mais resistente;
- Lectinas como marcadores taxonômicos.

INTRODUÇÃO

Várias lectinas foram isoladas da subfamília *Fabaceae*, como aquela, amplamente estudada de *Canavalia ensiformes* Concanavalina A (Con A) (GOLDSTEIN *et al*, 1965), a de *Phaseolus vulgaris* (MOREIRA & PERRONE, 1977), a de *Dioclea grandiflora* (MOREIRA *et al*, 1983), e de *Cratylia floribunda* (OLIVEIRA *et al*, 1991). Esta subfamília contém muitas espécies de ervas trepadeiras do género *Mucuna*. Uma lectina ligante a N-acetilgalactosamina de semente de *Mucuna derringiana* foi caracterizada por Mo e Goldstein (1994), e foi isolada por uma combinação de cromatografia de afinidade e cromatografia de fase reversa em HPLC. Em sementes de espécies indiana e nigeriana de *Mucuna pruriens*, uma lectina também foi detectada (SIDDHURAJU *et al*, 1996; AGBEDE & ALETOR, 2004), mas esta proteína não foi detectada em sementes da mesma espécie crescidas no Brasil (UDEDIBIE & CARLINI, 1998). MACHUKA (2000) estudando 11 variedades de *Mucuna pruriens* não observaram aglutinação quando ensaiadas contra sangue de coelho tripsinizado, de porco ou eritrócitos humanos, indicando níveis baixos ou indetectáveis de lectinas.

Será que a não observação da atividade hemaglutinante seja devido a interações da lectina se semente de *Mucuna pruriens* com ligantes polissacarídeos presentes na semente desta espécie? O estudo da interação entre polissacarídeo e carboidrato de diferentes fontes tem sido amplamente evidenciado sendo que a maioria dos trabalhos avaliam a interação da lectina de uma fonte animal ou vegetal interagindo com carboidratos oriundos de outra fonte.

1.3 Interação entre polissacarídeo e lectina

Na última década, o interesse entre interações proteínas e carboidratos tem aumentado consideravelmente. As primeiras investigações entre proteínas e açúcares foram negligenciadas em detrimento de investigações de peptídeos, DNA e suas interações um com o outro. Isto porque se pensava que os aminoácidos e nucleotídeos fossem as primeiras letras do alfabeto da vida. No entanto, devido as inúmeras possibilidades de ligações entre as unidades, pois os carboidratos possuem um potencial mais alto para codificar informações que nucleotídeos e aminoácidos (NEUMANN, 2004).

Até a descoberta da atividade lectínica de ligação a carboidrato, o mecanismo relacionado à atividade biológica de lectinas vegetais permanecia enigmático. Tão logo se tornou evidente que a atividade da lectina é baseada no reconhecimento e ligação a unidades de açúcares

INTRODUÇÃO

específicos, o conceito de um receptor-lectina foi introduzido para explicar as várias atividades de lectinas vegetais em termos moleculares. Com o isolamento de muitas lectinas, recentemente, acumularam evidências que muitas das lectinas vegetais exibem diferenças óbvias com respeito à sua atividade biológica, relacionadas a células animais e humanas. Como era esperado que estas diferenças fossem intimamente relacionadas com a estrutura dos receptores glicanos da respectiva lectina, a necessidade para uma determinação detalhada da ligação específica carboidrato-lectina logo foi reconhecida e vários grupos de pesquisa voltaram seus esforços para a elucidação da especificidade fina de diferentes lectinas. Como resultado, informações detalhadas estão agora disponíveis no que diz respeito a especificidade para açúcar de muitas lectinas de plantas que são usadas como investigador molecular e/ou proteínas ativas biologicamente (PEUMANS & VAN DAMME, 1998).

A idéia de que lectinas e carboidratos estão eminentemente disponíveis para atuar no reconhecimento celular é evidenciada com a demonstração que estas duas classes de compostos estão comumente presentes na superfície celular e com o reconhecimento que carboidratos tem um enorme potencial para codificar informações biológicas (LIS & SHARON, 1998).

Embora muitas funções específicas para as lectinas tenham sido propostas, o seu papel endógeno ainda é motivo de especulação pela comunidade científica.

Receptores endógenos (ligantes a lectinas) foram isolados de sementes de *Pisum sativum*, *Canavalia ensiformes*, *Vicia cracca*, *Vicia faba* e *Ricinus communis*, mas os mesmos não foram caracterizados (GANSERA *et al*, 1979; GEBAUER *et al*, 1979).

Nos anos oitenta e início dos anos noventa, um grupo alemão descreveu uma possível ocorrência de um composto endógeno ligante de lectina diante da idéia que lectina de legumes são proteínas vacuolares armazenadas nos corpos protéicos das sementes, podendo ser ligantes naturais para outros glicocompostos localizados nos corpos protéicos incluindo suas membranas (EINHOFF *et al*, 1986; RUDIGER & SCHERCHER, 1993; GERS-BARLAG *et al*, 1993; SCIERCHER & RUDIGER, 1994; WENZEL & RUDIGER, 1995). Tendo em vista o que foi descrito acima, Ramos e colaboradores (2002) evidenciaram a interação da lectina de semente de *Cratylia floribunda* com moléculas solúveis presentes nas frações protéicas obtidas de farinha da mesma semente mostrando que esta interação deve ser mediada pelo sítio de ligante de carboidrato na lectina.

INTRODUÇÃO

Em 2002, Tavares detectou receptores endógenos de lectinas de sementes de *Dioclea sclerocarpa* a partir da cromatografia do extrato salino de cotilédones de sementes em coluna Sepharose 4B com lectinas glucose específicas acopladas.

1.4 *Mucuna sloanei*

Mucuna sloanei Fawcett & Rendle, pertencente a ordem *Fabales*, família *Leguminosae* (*Fabaceae*) subfamília *Papilionoideae* é encontrada no nordeste do Brasil, sudeste dos Estados Unidos, nas Ilhas do Havai, na Nigéria e alguns países da África (AJIWE *et al*, 1997).

Mucuna sloanei é uma erva trepadeira, cultivada juntamente com milho e inhame. Como muitas leguminosas, ela produz muitos frutos por planta, sendo que cada fruto possui de 1 a 8 sementes. A semente tem uma casca dura que pode ser utilizada como alimentos para porcos (OKIGBO, 1978). Esta espécie tem sido utilizada por suas propriedades medicinais por grávidas para evitar o aborto (AJIWE *et al*, 1997). Afolabi e colaboradores (1985) realizaram uma avaliação química e nutricional preliminar de semente de *Mucuna sloanei* e sugeriram que pode ser uma fonte rica de proteína, quando detoxificada por aquecimento. A semente é geralmente utilizada como espessante em estados da Nigéria, sendo também encontrada em Gana, Camarão, Senegal e Togo (AJIWE *et al*, 1997).

O gênero *Mucuna* está intimamente relacionado com o gênero *Dioclea* onde já foram detectadas inúmeras espécies contendo lectina (MOREIRA, 1998). A detecção da presença de lectinas em extratos vegetais é normalmente feita por ensaio de atividade hemaglutinante. Muitas vezes extratos vegetais, embora contendo lectinas, não apresenta, atividade, ou apresentam atividade extremamente baixa, devido, em alguns casos, à ausência de receptores apropriados para a lectina naquelas hemácias. No entanto, em alguns extratos, tem sido detectada tanto a presença de ligantes solúveis da lectina que podem diminuir a atividade hemaglutinante como a presença de ligantes insolúveis, aos quais a lectina se liga durante o processo de extração (MOREIRA, 1998; MO & GOLDSTEIN, 1994).

Em estudos preliminares realizados com extratos salinos de sementes de *Mucuna sloanei*, não foi encontrada atividade hemaglutinante e este extrato apresentou-se como uma solução viscosa. Onweluzo (2002) estudando polissacarídeos de *Mucuna flagellipes* identificou a presença de uma xiloglucanas em sementes desta espécie.

INTRODUÇÃO

Este trabalho de isolamento e caracterização tanto da lectina como do polissacarídeo, presentes em sementes de *Mucuna sloanei* se justifica como uma tentativa de esclarecer essa inibição da atividade hemaglutinante no extrato salino da semente e avaliar se esta interação é específica e característica de uma interação lectina-receptor.

HIPÓTESE DE TRABALHO

2.0 HIPÓTESE DE TRABALHO

Através de extração aquosa de sementes de *Mucuna sloanei*, foram obtidos extratos salinos, que se apresentam como uma solução viscosa, contendo proteína, mas sem atividade hemaglutinante. Por outro lado, já foi observada a presença, em extratos aquosos de outras sementes do gênero *Mucuna* de polissacarídeos contendo unidades de galactose, xilose e glucose (ONWELUZO, 2002).

Assim alguma perguntas podem ser feitas:

- ❖ Conterá a semente de *Mucuna sloanei*, lectinas?
- ❖ Estarão presentes na semente de *Mucuna sloanei* açúcares capazes de inibir a atividade hemaglutinante?
- ❖ Conterá a semente de *Mucuna sloanei* receptores endógenos específicos para a lectina?

ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

3.0 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

1. Caracterização da semente de *Mucuna sloanei*.
2. Isolamento dos polissacarídeos solúveis de cotilédones de sementes de *Mucuna sloanei* por extração aquosa seguido de precipitação etanólica.
3. Determinação da composição em monossacarídeos por cromatografia líquida gasosa e a estrutura do polissacarídeo isolado por metilação seguido de espectrometria de massa e por ressonância magnética nuclear de próton, ^{13}C , e ressonância bidimensional HMQC.
4. Obtenção dos oligossacarídeos derivados do polissacarídeos cotiledonário, através de hidrólise enzimática.
5. Isolamento e caracterização estrutural dos oligossacarídeos e comparação com a estrutura do polissacarídeo.
6. Preparação de uma matriz cromatográfica, a partir do polissacarídeo cotiledonário de *Mucuna sloanei*.
7. Isolamento e caracterização da lectina de *Mucuna sloanei* por cromatografia de afinidade e cromatografia de exclusão molecular em Superdex 75-HR.
8. Caracterização da estrutura da lectina de *Mucuna sloanei*, através de eletroforese, técnicas espectroscópicas e análise da seqüência amino terminal.
9. Estudo das propriedades biológicas da lectina como atividade hemaglutinante, inibição por açúcares, atividade tóxica.
10. Avaliação da interação da lectina com os receptores endógenos da semente de *Mucuna sloanei*.

MATERIAL E MÉTODOS

4.0 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Substâncias químicas e reagentes

Açúcares: (D(+)-glucose, D(+)-galactose, D(+)-xilose, D(+)-manose, D(-)-arabinose, D(-)-frutose, sacarose, α -lactose, metil- α -D-manopiranosideo, metil- α -D-galactopyranosidio e metil- β -D-galactopiranosideo) foram adquiridos da Sigma Chemical Co. Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

4.1.2 Hemácias

Hemácias humanas: foram obtidos do HEMOCE.

Hemácias de coelho: foram obtidos de animais provenientes do Biotério do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Ceará.

As demais hemácias foram adquiridas de animais domésticos.

4.1.3 Sementes

As sementes de *Mucuna sloanei* foram coletadas no interior do Ceará, identificadas em comparação com uma exsicata da planta catalogada sob o número 000024482 no Herbário Prisco Bezerra – EAC (UFC) e adequadamente estocadas. Depois de retirada a casca com ajuda mecânica, as sementes foram pulverizadas e foi feita a análise elementar desta farinha.

4.2 Métodos

4.2.1 Análise centesimal da semente de *Mucuna sloanei*

4.2.1.1 *Determinação de umidade*

Para a determinação de umidade, pesa-filtros previamente tarados, contendo amostras foram colocados em estufa a 110 °C por 24 horas. Em seguida, foram deixados em um dessecador, sob sílica, até atingir o equilíbrio com a temperatura ambiente, sendo então pesados, e assim sucessivamente, até pesos constantes. O teor de umidade foi calculado pela diferença entre os pesos inicial e final das amostras, sendo este valor expresso em percentagem.

4.2.1.2 *Determinação de cinzas*

Para a determinação do teor de cinzas, cadinhos de porcelana previamente tarados, contendo 1 g da amostra foram colocados em mufla a 600 °C até a incineração completa da matéria orgânica, sendo posteriormente mantidos em um dessecador sob sílica, até atingir a temperatura ambiente. A seguir, os cadinhos foram pesados e o teor de cinzas calculado pela relação entre o peso do resíduo e o peso inicial da amostra sendo o resultado expresso em percentagem.

4.2.1.3 *Determinação de proteína total*

A determinação do teor de proteína total das amostras foi feita pelo método de Kjeldahl (HILLER, 1948).

4.2.1.4 *Determinação de lipídios*

Esta fração compreende principalmente as gorduras embora estejam nela incluídas outras substâncias solúveis em hexano, tais como ceras, resinas e alguns pigmentos. A extração foi feita com 1 g de amostra em extrator contínuo de Soxhlet, usando como solvente o tolueno:etanol

MATERIAL E MÉTODOS

(2:1). Após 8 horas de refluxo, o balão foi colocado em banho maria para que o solvente fosse evaporado, o balão contendo o extrato lipídico foi pesado, como também a amostra delipidada e calculado por diferença a quantidade de lipídio contido na amostra.

4.2.2 Isolamento e análise dos polissacarídeos de sementes de *Mucuna sloanei*

Três métodos foram utilizados para isolar os polissacarídeos, dependendo do modo de inativação ou do solvente de extração.

4.2.2.1 *Tratamento da semente com água quente*

Sementes inteiras de *Mucuna sloanei* foram colocadas em água fervente por 20 minutos para inativação enzimática. Depois de retirada a casca manualmente, estas sementes foram submetidas a extração com água (1:25) em liquidificador. O material foi centrifugado (10000 x g:0,5 h); o sobrenadante foi precipitado com etanol (1:3) e centrifugado (10000 x g:0,5 h); o precipitado foi suspenso em água, reprecipitado com etanol e liofilizado (PFH₂O).

4.2.2.2 *Tratamento com MeOH:H₂O e extração com TCA*

A farinha das sementes de *Mucuna sloanei*, depois de retirada a casca, foi submetida a extração com metanol:água (4:1) sob refluxo por 30 minutos, (REICHER *et al*, 1992) seguido por extração aquosa por 1 h, centrifugação (10000 x g: 0,5h); precipitação com etanol (1:3) e centrifugação. O precipitado foi solubilizado com TCA 10% e reprecipitado com etanol. (ONWELUZO *et al*, 2002). O precipitado foi seco sob vácuo a 25 °C (PTCA).

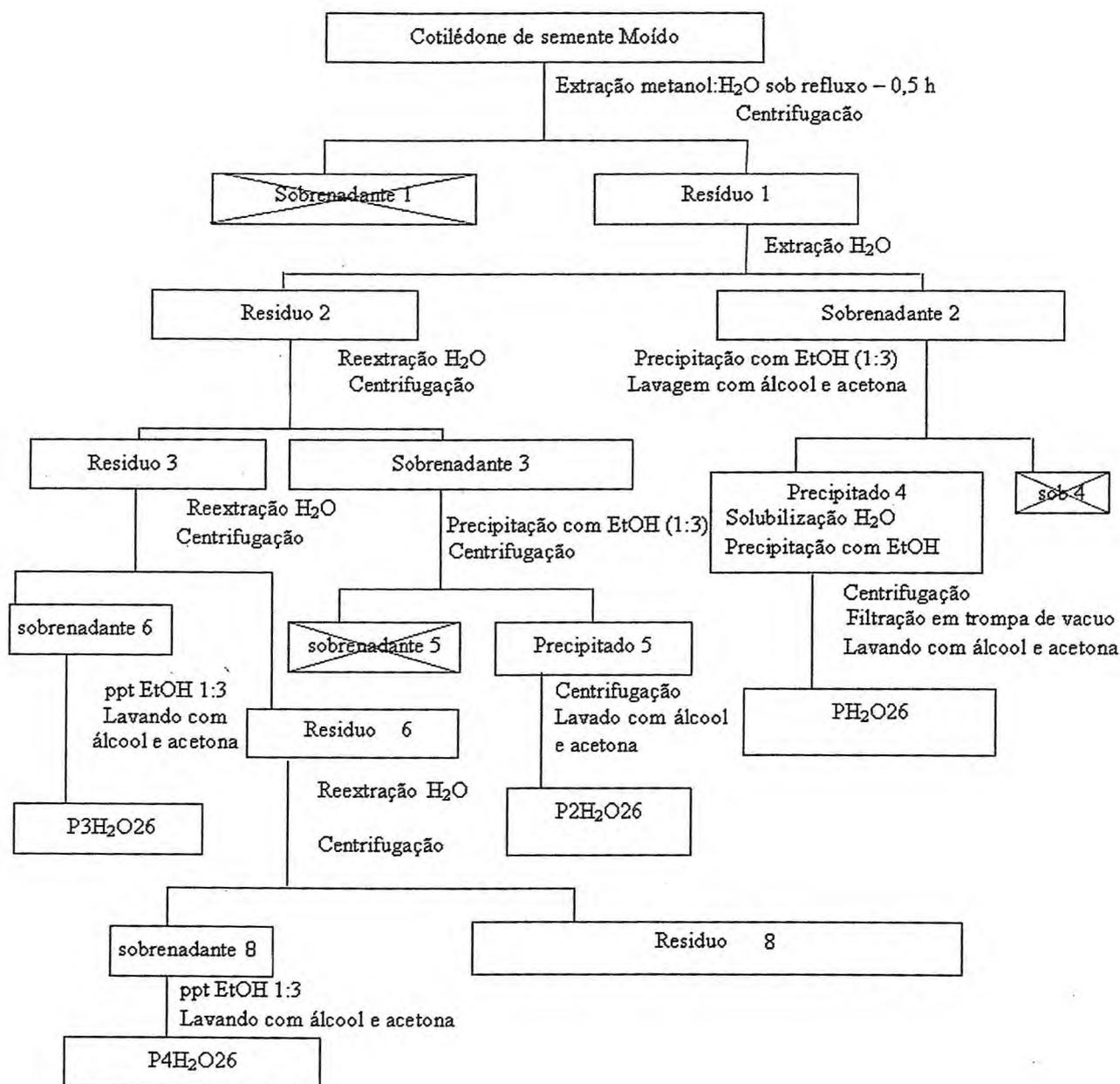
4.2.2.3 *Tratamento com MeOH:H₂O e extração com água*

Seguiu as mesmas condições descritas acima exceto que a etapa de purificação foi feita com água no lugar de TCA (PH₂O).

MATERIAL E MÉTODOS

4.2.2.4 Extração seqüencial dos polissacarídeos de semente de *Mucuna sloanei*

Após a extração dos polissacarídeos solúveis em água das sementes de *Mucuna sloanei* foi feito também uma extração seqüencial dos polissacarídeos para ter-se uma idéia do perfil em polissacarídeos da semente (Figura 15).



MATERIAL E MÉTODOS

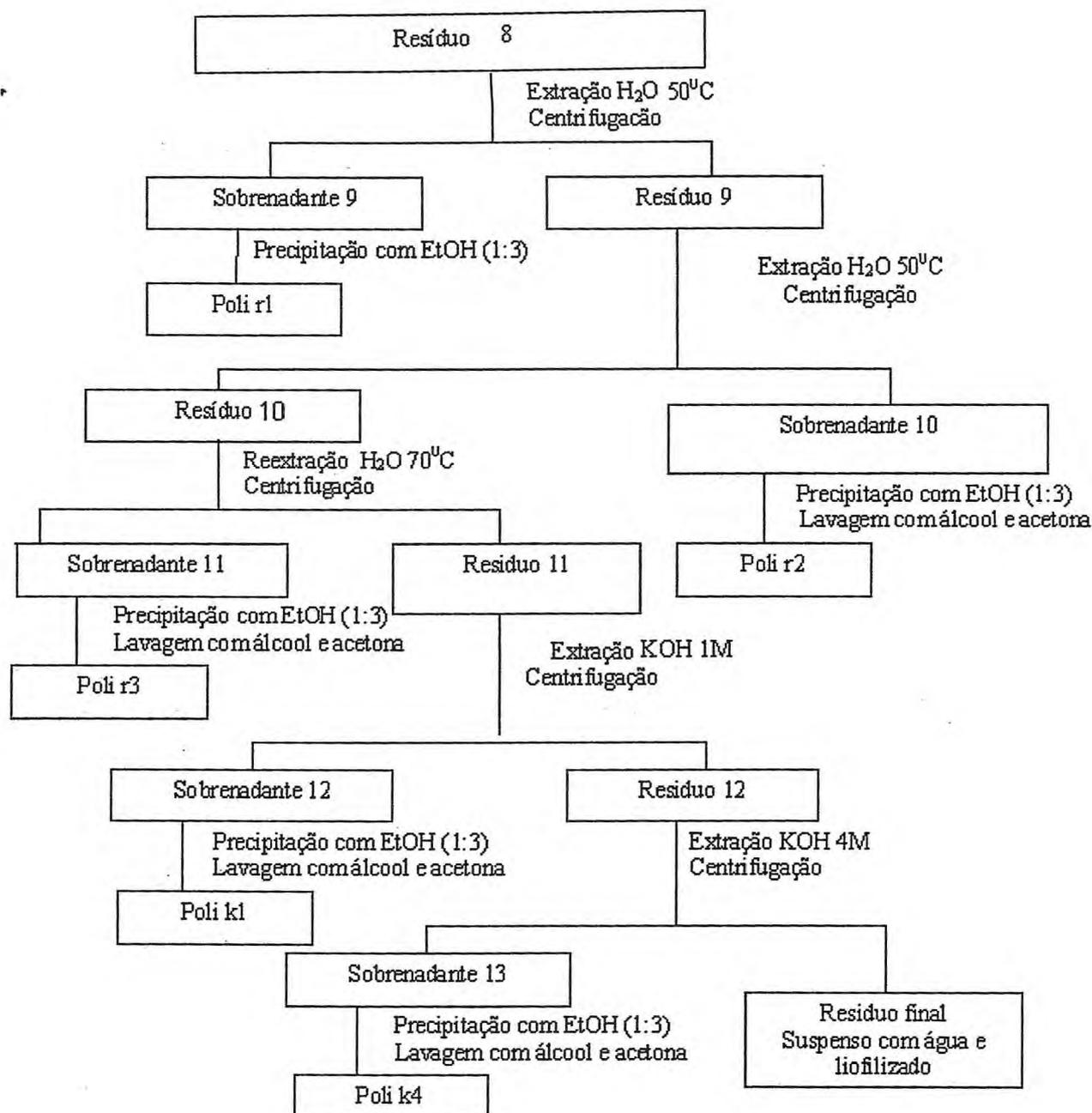


Figura 15: Extração seqüencial dos polissacarídeos de semente de *Mucuna sloanei*.

MATERIAL E MÉTODOS

4.2.2.5 Teor de carboidrato

Em todas as frações obtidas pelo diversos métodos de isolamento do polissacarídeo, foi determinado o teor de carboidrato por fenol-sulfúrico (DUBOIS *et al*, 1956) usando glucose como padrão. Para isto as amostras foram solubilizadas em água na concentração de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ e a uma alíquota de $500 \mu\text{L}$ de amostra foram adicionados $500 \mu\text{L}$ de fenol 5% e $2500 \mu\text{L}$ de ácido sulfúrico concentrado. Após agitação, a mistura foi deixada em repouso por 15 min. Em seguida, após o término da reação o ensaio foi lido em espectrofotômetro a 490 nm e a concentração de carboidrato foi estimada com relação a uma curva padrão de glucose variando de 10 a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de concentração.

4.2.2.6 Determinação de proteína

O conteúdo de proteína de todas as frações foi estimado de acordo com o método de Lowry modificado por HARTREE (1972), sendo as leituras feitas a 660 nm. O padrão utilizado foi albumina serica bovina (BSA) nas concentrações de 20-100 $\mu\text{g/mL}$.

4.2.2.7 Espectroscopia de absorção no UV-VIS

Uma análise do espectro de absorção na região de UV-VIS foi realizada para a amostra PH_2O em espectrofotômetro Ultraspec 2000 Biotech-Pharmacia.

4.2.2.8 Hidrólise ácida total

Os polissacarídeos foram submetidos a hidrólise ácida total em tubos hermeticamente fechados, utilizando ácido trifluoracético (TFA) ou ácido sulfúrico, de acordo com os seguintes procedimentos:

MATERIAL E MÉTODOS

- a) Com TFA: a 1 mL das frações polissacarídicas (PH₂O, PFH₂O; PTCA; PH₂O26; P2H₂O26; P3H₂O26; P4H₂O26; poli r1; poli r2; poli r3; poli k1; poli k4) solubilizadas em água na concentração de 10 mg/mL foi adicionado 1 mL de TFA 2 M. Depois as amostras foram aquecidas por 5 horas em banho fervente. Após este tempo, o excesso do ácido foi removido por evaporação a vácuo, e foram feitas sucessivas lavagens com água;
- b) Com H₂SO₄: o resíduo final da extração seqüencial foi dissolvido em H₂SO₄ a 72% (v/v) em banho de gelo por 1 hora, após a solubilização a solução foi diluída para 8% e mantida a 100°C por 16 horas. O excesso de ácido sulfúrico foi neutralizado com carbonato de bário e o sulfato de bário resultante foi removido por filtração;

4.2.2.9 Cromatografia em papel

As análises por cromatografia em papel foram realizadas em papel Whatman n^o 1. O sistema solvente empregado foi benzeno:butanol:piridina:água na proporção de 1:5:3:3 (v/v) e como revelador nitrato de prata alcalino.

As amostras hidrolisadas foram aplicadas ao lado de padrões de monossacarídeos (ácido galacturônico, ácido glucurônico, arabinose, ramnose, manose, glucose, xilose, galactose) todos na concentração de 20 mg/mL. O cromatograma correu em sistema ascendente em cuba saturada pelo solvente.

4.2.2.10 Redução e acetilação

Após a hidrólise ácida total, os monossacarídeos resultantes, foram reduzidos e acetilados para análise em cromatografia líquido-gasosa (G.L.C). Os monossacarídeos reduzidos com boroidreto de sódio, à temperatura ambiente, durante 24 h, foram, em seguida, tratados com resina Lewatit na forma H⁺, para remover os íons Na⁺. Após a filtração, as soluções foram concentradas a 50°C até a secura e codestilada com metanol para remoção do ácido bórico formado. Os alditóis assim formados foram acetilados com uma mistura piridina:anidrido acético (1:1 v/v) a temperatura ambiente, durante 16 horas. A reação foi encerrada pela adição de gelo

MATERIAL E MÉTODOS

moído e os acetatos de alditóis extraídos com clorofórmio; a solução clorofórmica era lavada diversas vezes com sulfato de cobre e água. Após a evaporação do solvente, os acetatos de alditóis foram analisados por G.L.C. ou cromatografia gasosa acoplada ao massa (G.L.C-M.S).

4.2.2.11 Cromatografia líquido-gasosa

As análises por G.L.C. foram realizadas em cromatógrafo capilar HP, com detector de ionização de chama, utilizando-se nitrogênio como gás de arraste e diferentes colunas.

4.2.2.12 Análise de HPSEC-MALLS.

Foram determinados os perfis de eluição das frações PH₂O, PFH₂O, PTCA, PH₂O26, P2H₂O26, polir1, polir2, polik1, polik4 por cromatografia de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC) WATERS, equipado com um detector de índice de refração diferencial WATERS modelo 2410 e com detector de espalhamento de luz em multiângulos (MALLS) WYATT TECHNOLOGY modelo DAWN DSP com 18 canais, acoplados em série. Foram utilizadas 4 colunas de permeação em gel (2000, 500, 120 e 050 ultra-hydrogel) permeação WATERS, em série, com limite de exclusão de 1.10^6 , 4.10^5 , 8.10^4 e 5.10^3 Da. O fluxo de eluição foi de 0,6 mL/min, pressão de 920 psi a 30°C, monitorados através de bomba peristáltica WATERS 515. Este sistema estava acoplado a três detectores diferentes: espalhamento de luz em multiângulos (MALLS), índice de refração Waters 2410 Wyatt Technology Dawn-F (RI), e viscosímetro (VIS). Como eluente foi utilizado em todas as cromatografias uma solução de nitrito de sódio (NaNO₂) 0,1 M, contendo azida sódica (NaN₃) 0,5 g L⁻¹. As amostras utilizadas foram sempre preparadas na concentração de 1,0 mg mL⁻¹ e deixadas sob agitação durante a noite, posteriormente filtrada através de membrana de nitrocelulose de 0,22 µm, e então 250 µL de amostra foram injetadas. Todas as cromatografias foram realizadas a uma temperatura de 22 °C e os dados coletados foram analisados com o programa Wyatt Technology ASTRA.

A amostra PH₂O, que pelo método de extração é semelhante a amostra PH₂O26, foi utilizada para obter os valores de massa molecular ponderal média, raio de giração (R_g) e o índice de polidispersão ($I = M_w/M_n$) através do programa ASTRA (WYATT TECHNOLOGY).

MATERIAL E MÉTODOS

O dn/dc da amostra foi determinado usando o refratômetro diferencial Waters, modelo 2410 no comprimento de onda de 633 nm e as concentrações utilizadas foram 0.8; 0.6; 0.4 e 0.2 g L⁻¹ sendo que todas as soluções foram previamente filtradas através de membrana de nitrocelulose de 0.45 μ m de diâmetro do poro.

Além disso, todas as outras análises de caracterização do polissacarídeo foram realizadas com esta amostra.

4.2.2.13 Determinação de ácido urônico

O conteúdo de ácido urônico foi estimado de acordo com Blumenkrantz & Asboe-Hansen (1973) usando ácido galacturônico como padrão.

4.2.2.14 Rotação óptica

A fração PH₂O foi solubilizada em água na concentração de 0,1% e a leitura da rotação óptica foi efetuada em polarímetro digital Autopol III, em uma célula de 1 dm.

4.2.2.15 Metilação

A fração PH₂O foi submetida a metilação de acordo com CIUCANU e KEREK (1984). 20 mg de amostra foi solubilizada em 1,0 mL de DMSO à temperatura ambiente e hidróxido de sódio pulverizado foi adicionado (10 mg) sendo que todo o sistema foi mantido sob agitação por 5 min. Em seguida, foram adicionados 0,5 mL de iodeto de metila e a reação foi agitada por mais 15 min. Em seguida, adicionados mais 0,3 mL de iodeto de metila, com agitação, e adicionados 10 mg de NaOH em pó, com agitação por 15 min e após deixado em repouso durante a noite. Pela manhã foi adicionado ácido acético até o pH 7,0. O polissacarídeo foi extraído com clorofórmio e lavado diversas vezes com água. Após a completa evaporação do solvente, o material foi submetido a mais dois ciclos de metilação. Depois da observação por infravermelho que o material estava metilado foi realizado a metanólise.

MATERIAL E MÉTODOS

Na metanólise, à amostra metilada, bem seca, foi diluída em 1,0 mL de MeOH/HCl 3-5 % de saturação agitado e deixado por 2 horas a 80 °C em seguida foi feita uma neutralização com carbonato de prata adicionado um pouco de metanol, centrifugação 10000 x g por 10 min e o precipitado foi lavado com metanol. Os sobrenadantes foram reunidos, rotaevaporados e em seguida foi realizado hidrólise com 2 mL de ácido sulfúrico 1,0 M por 8 horas a 100°C, seguido por neutralização com carbonato de bário e centrifugação. O sobrenadante, após redução do volume por liofilização, foi reduzido com boroidreto de sódio deuterado durante a noite, acetilado, e analisado por G.L.C.- M.S, na forma de acetatos de alditóis parcialmente metilados, utilizando a coluna OV-225.

4.2.2.16 Cromatografia líquida-gasosa acoplada à espectrometria de massa (G.L.C-MS)

As análises de cromatografia líquida-gasosa acoplada à espectrometria de massa foram realizadas em um cromatógrafo VARIAN 3300 acoplado a um espectrômetro de massa FINNIGAN MAT munido com ITS-40, e utilizando coluna capilar db-210, tendo como gás de arraste hélio ultrapuro com fluxo de 2 mL/min, com temperatura variando entre 50 e 220°C.

4.2.2.17 Absorção no infra vermelho

Os espectros de absorção no infravermelho foram registrados no espectrofotômetro Perkin-Elmer 1320, com o material foi envolvido em uma pastilha de KBr.

4.2.2.18 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

Os espectros de ressonância magnética nuclear de ^{13}C e ^1H (^{13}C -RMN, ^1H -RMN), DEPT, e o espectro bidimensional HMQC foram obtidos com aparelho BRUKER, modelo DRX-500, com ressonância de ^{13}C e ^1H , de 120 e 500 MHz respectivamente. Os experimentos foram realizados utilizando-se água deuterada como solvente, sendo as amostras colocadas em tubos de 0,5 cm de diâmetro interno, numa temperatura de 80 °C. Os deslocamentos químicos (δ) foram

MATERIAL E MÉTODOS

expressos em ppm o solvente CDCl_3 δ de 77.0 ppm foi referenciado com relação ao TMS absorção em 7.25.

4.2.2.19 *Estudo dos oligossacarídeos*

4.2.2.19.1 *Hidrólise enzimática*

A fração PH_2O , foi hidrolisada enzimaticamente usando 5,0 mL de uma solução 0,5% deste polissacarídeo em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0 e 200 μL de uma solução de celulase de *Trichoderma sp* (Megazime, 500 U/mL em sulfato de amônio 3,2 M , pH 7,0) diluída 1:100 por 24 horas a 30°C.

4.2.2.19.2 *Análise dos oligossacarídeos por HPAEC-PAD*

A solução de oligossacarídeos produzida foi cromatografada em uma coluna Biogel P-4 (BioRad) (1.5x170cm) e eluída com uma solução de NaN_3 0.05%. Foram coletadas frações de 1 mL e os carboidratos foram analisados quantitativamente pelo método de fenol-sulfúrico (DUBOIS *et al*, 1956). A análise quantitativa das frações foi realizada por cromatografia de troca iônica de alto desempenho (HPAEC-PAD) com uma coluna Carboapak PA-100 (Dionex). A separação foi realizada com uma solução de NaOH 88 mM e um gradiente linear de acetato de sódio de 35 a 75 mM por 20 minutos seguido por outro gradiente linear de 75 a 200 mM até 50 minutos (0.9 mL.min⁻¹).

4.2.2.19.3 *Caracterização dos oligossacarídeos por eletrospray*

As determinações de ESI-MS (espectrometria de massa de ionização por “eletrospray”), foram realizadas em aparelho MICROMASS QUATTRO LC, com triplo quadrupolo, modo positivo, sendo a voltagem do capilar de 2,5 kV e do cone de 41 V. O eluente utilizado foi acetonitrila 80%, com fluxo de 0,1 mL/min, controlado por bomba peristáltica LC-10AD da SHIMADZU. Os oligossacarídeos foram solubilizados em água, sendo posteriormente adicionado o mesmo volume de metanol.

4.2.2.20 Reticulação com epícloridrina

Géis foram preparados a partir da fração PH₂O de *Mucuna sloanei* segundo Appukutan *et al* (1977) e Moreira, 1998. Para cada 1,0 g da goma foram adicionados 0,3 mL de epícloridrina e 3,0 mL de NaOH 3 M. A mistura foi agitada manualmente, mantida em estufa por 24 horas a 40°C e em seguida, por 12 horas a 70°C. Após este período, o material foi lavado exaustivamente com água destilada, até que o pH ficasse neutro. O material foi homogeneizado e passado em peneira de aproximadamente 30 mesh, tendo as partículas finas sido retiradas por lavagem exaustiva com água destilada.

Abaixo (Figura 16) está representada a reação de reticulação.

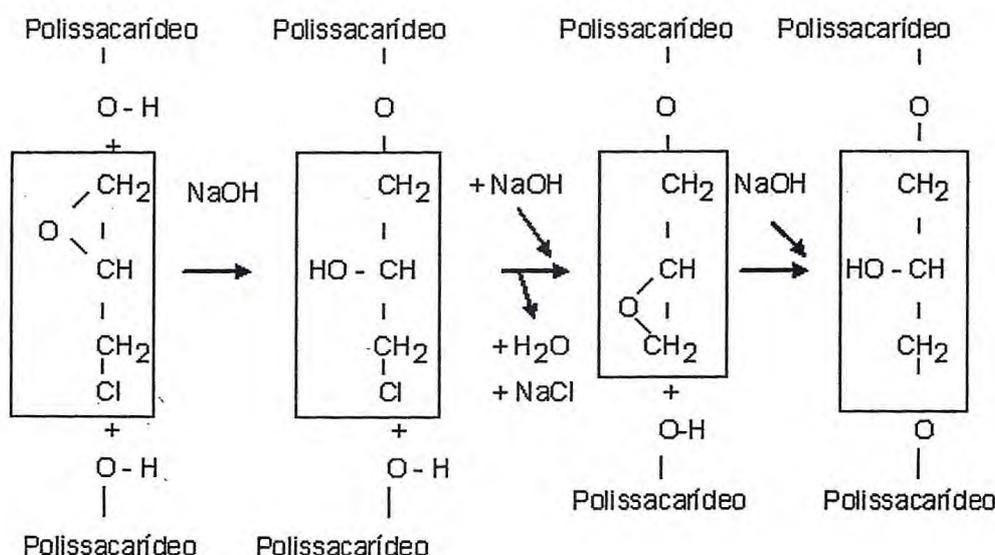


Figura 16: Reticulação do polissacarídeo pela epícloridrina.

4.2.3 Isolamento e Caracterização da Lectina de semente de *Mucuna Sloanei*

A lectina de *Mucuna sloanei* foi isolada a partir de uma extração da farinha de cotilédones de sementes de *Mucuna sloanei* com NaCl 0,15 M na proporção de 1:100 (p/v) e na presença de 0,1% de ácido ascórbico. O sobrenadante desta extração foi aplicado em colunas cromatográficas de afinidade feita com o polissacarídeo de *Adenanthera pavonina* (galactomanana) ou de *Mucuna*

MATERIAL E MÉTODOS

sloanei (xiloglucana) após serem tratados com epícloridrina seguindo o mesmo protocolo descrito em 5.2.2.20

As cromatografias foram realizadas em seringas hipodérmicas. As colunas foram montadas deixando-se o gel sedimentar por gravidade e equilibradas com NaCl 0,15 M.

Os extratos contendo lectinas foram aplicados e deixados em contato durante a noite. A eluição inicialmente foi feita com a mesma solução de equilíbrio, seguida de eluição com β -alanina 0,1 M em NaCl 0,15 M pH 2,6. A eluição foi realizada a um fluxo constante de 30 mL/h e nas frações obtidas foram lidas a 280 nm.

4.2.3.1 Cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex 75

A fração obtida do isolamento em goma de *Adenantha pavonina*, foi cromatografada em coluna de filtração em gel, em sistema AKTA (Pharmacia), utilizando Superdex-75HR. As amostras foram analisadas na solução tampão PBS 0,15 M contendo NaCl 0,15 M pH 7,4. A eluição foi procedida com o mesmo tampão de amostra, ao fluxo de 0,5 mL min⁻¹.

Além do isolamento, esse procedimento foi feito para verificar a pureza da fração obtida por cromatografia de afinidade e a estimativa da massa molecular nativa. Os padrões utilizados foram: albumina sérica bovina (BSA) - 66 kDa, anidrase carbônica - 30 kDa e citocromo C - 12,4 kDa.

4.2.3.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE-SDS)

Os experimentos de eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS e β -mercaptoetanol foram realizados segundo a técnica de LAEMMLI (1970), usando-se um gel de aplicação de 3,5% de acrilamida em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 e um gel de separação a 15% em tampão Tris-HCl 0,3 M pH 8,8 e SDS 1%, adaptada para o uso em placas medindo 10 x 8 cm (Sistema Hoefer SE250 - Pharmacia Biotech). O tampão de corrida foi preparado com Tris 0,025 M, glicina 0,2 M e SDS 0,1% a pH 8,3. As amostras dissolvidas em tampão tris-HCl 0,0625 M, pH 8,3, contendo SDS 10%, com e sem β -mercaptoetanol, azul de bromofenol 0,02%

MATERIAL E MÉTODOS

e em seguida incubadas a 110°C por 10 minutos. Para aumentar a densidade, facilitando a aplicação, foram adicionados ainda cristais de sacarose. Alíquotas de 10 µL das amostras tratadas foram aplicadas no gel, e então submetida a uma corrente de 40 mA durante aproximadamente uma hora e trinta minutos.

As bandas foram visualizadas usando Coomassie Brilliant Blue R-250 a 0,05% em metanol, ácido acético e água (1:3:8). O descoramento foi feito por lavagem em uma solução de ácido acético, metanol e água (1:3:8), por reagente de Schiff ou por revelação das bandas protéicas com prata (BLUM *et al*, 1987).

4.2.3.3 Eletroforese bidimensional

Eletroforese bidimensional foi realizada de acordo com Bahrman & Thiellement (1987). Primeiramente foi realizada uma eletrofocalização em um gel de 24 cm de comprimento e 1,5 mm de diâmetro em três fases (1 – 300 V; 2 mA; 5 W; 0,01 h, 2 – 3500 V; 2 mA; 5 W; 1,30 h, 3 – 3500 V; 2 mA; 5 W; 3:35 h). Com um pH variando de 3-8. A eletroforese em gel de SDS foi realizada com um gel de 0,15 cm a uma concentração de 12,5 % de acrilamida e em seguida o gel foi revelado com prata. Foram utilizados como padrões de pesos moleculares uma mistura contendo as seguintes proteínas: albumina bovina (66 kDa), ovalbumina (45 kDa), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de músculo de coelho (36 kDa), anidrase carbônica de eritrócitos bovino (30,0 kDa), tripsinogênio (24 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa), α-lactoalbumina (14,2 kDa). E como marcadores de ponto isoelétrico o kit I-3018 IEF-MIS 3,5-9,3 da Sigma contendo as seguintes proteínas: amiloglucosidase de *Aspergillus niger* (pI - 3,6; MM – 70 kDa), Inibidor de tripsina de soja (pI - 4,6; MM – 20,1 kDa), β-lactoglobulina A de leite bovino (pI - 5,1; MM – 18,4 kDa), anidrase carbônica II de eritrócitos humana (pI - 6,6; MM – 29 kDa), mioglobina de coração de cavalo (pI - 6,8; 7,2 ; MM – 17 kDa), lectina de *Lens culinares* (pI - 8,2; 8,6; 8,8 - 6; MM – 49 kDa) e tripsinogênio de pâncreas bovino (pI - 9,3; MM – 24 kDa).

4.2.3.4 Determinação de carboidrato na fração lectínica

A lectina de semente de *Mucuna sloanei* foi investigada quanto a presença de carboidrato (determinação qualitativa) em sua estrutura utilizando o reagente de Schiff como já foi descrito

MATERIAL E MÉTODOS

no item de eletroforese, mas também foi determinado o seu conteúdo (determinação quantitativa) segundo o método descrito por Dubois et al, (1956). A lectina (1mg/mL) foi dissolvida em água milli-Q. A uma alíquota de 500 μL de amostra foram adicionados 500 μL de fenol 5% e 2500 μL de ácido sulfúrico concentrado. O sistema foi então agitado, a mistura foi deixada em repouso por 15 min, depois de cessada a reação o ensaio foi lido em espectrofotômetro a 490 nm e a concentração de carboidrato foi estimada com relação a uma curva padrão de glucose variando de 10 a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

4.2.3.5 Espectroscopia de UV-VIS

Foi feita uma varredura espectrofotométrica na região do ultravioleta-visível (200-900 nm) para a lectina em um espectrofotômetro modelo Ultraspec 2000 da Biotech-Pharmacia. A amostra da lectina utilizada foi diluída em solução de NaCl 0,15M em uma concentração de 0,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

4.2.3.6 Dicroísmo circular (CD) e cálculo das frações da estrutura secundária

Espectros de dicroísmo circular foram obtidos usando o espectropolarímetro Jasco, modelo J-720 em um comprimento de onda de 195-240 nm. As quantificações foram realizadas em cubetas de quartzo de 1 mm de caminho óptico. As amostras estavam dissolvidas em PBS pH 7,4 (0,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e foi adquirido o espectro após um média de 32 varreduras. O espectro de CD obtido em escala de elipticidade mgra θ foi transformado usando o resíduo de peso principal e primeira concentração para a análise da estrutura secundária. Para o cálculo das frações de estrutura secundária foi utilizado o programa Selcon 2 (Self Consistent Method) (SREERAMA & WOOD, 1993). Para estimar o conteúdo de estrutura secundária pelo SELCON foi utilizado um grupo de proteínas de referência contendo 33 espectros de CD.

4.2.3.7 Análise da seqüência amino-terminal

Uma alíquota da fração de lectina eluída da cromatografia de exclusão molecular, contendo 300 pmoles em água/Sequa-Brene (Sigma-Aldrich), foi aplicada em um disco de vidro

MATERIAL E MÉTODOS

especial tratado com Sequa-Brene. A seqüência de aminoácido N-terminal foi realizada por degradação de Edman em um seqüenciador de proteína automático da Shimadzy PPS-Q10 sob as condições recomendadas pelo fabricante. Esta seqüência foi submetida a alinhamento automático, o qual foi realizado usando o sistema de busca NCBI-Blast para proteína-proteína.

4.2.3.8 Atividade Biológica da lectina de *Mucuna sloanei*

4.2.3.8.1 *Ensaio de atividade hemaglutinante*

Os ensaios de atividade hemaglutinante foram realizados conforme metodologia descrita por MOREIRA & PERRONE (1977). As placas de microtitulação receberam inicialmente 50 µL de NaCl 0,15 M em cada poço, em seguida 50 µL das amostras foram acrescentados ao primeiro poço de cada fileira e diluídas duplo-seriadamente. Posteriormente, foi adicionado a esta diluição igual volume de uma suspensão de hemácias a 2% (diluída em NaCl 0,15 M). Para este ensaio foram utilizados eritrócitos não tratados e tratados com bromelaína de galinha, pato, ganso, capote, galo, coelho, cabra, ovelha e hemácias humanas do sistema ABO. As placas foram incubadas por 30 minutos a 37°C, seguido por repouso de 30 minutos à temperatura ambiente durante a noite na geladeira. Decorrido esse tempo, foi então procedida a visualização dos aglutinados a olho nu. Os títulos de hemaglutinação foram calculados como sendo o inverso da maior diluição ainda capaz de provocar aglutinação das hemácias.

4.2.3.8.2 *Inibição da atividade hemaglutinante*

A especificidade de ligação a carboidrato da lectina foi estimada pela habilidade de inibição da atividade hemaglutinante por açúcares simples. Para isso, uma combinação de diluições de lectina e açúcares simples foi utilizada, resultando em diferentes proporções variando de 0.2 a 4096. Isto foi realizado, em placas de microtitulação, inicialmente foi feito diluições seriadas (1:2) da lectina na direção de A a H com NaCl 0,15 M diluindo sequencialmente e então foi feita diluições seriadas (1:2) do açúcar na outra direção (1 a 12). A inibição da atividade hemaglutinante pelos açúcares (D(+)-glucose, D(+)-galactose, D(+)-xilose,

MATERIAL E MÉTODOS

D(+)-manose, D(-)-arabinose, D(-)-frutose, sacarose, α -lactose, metil- α -D-manopiranosídeo, metil- α -D-galactopiranosídeo, metil- β -D-galactopiranosídeo) foi avaliada após incubar previamente a lectina e o açúcar por 1 hora a temperatura ambiente antes da adição das hemácias de coelho. O resultado foi determinado macroscopicamente e o título de hemaglutinação expresso em UH/mgP.

4.2.3.8.3 Ensaio de atividade tóxica em cavidade peritoneal

A atividade tóxica aguda da lectina foi determinada por uma injeção intraperitoneal em camundongos (grupo de cinco animais) em dose única na concentração de $2.0 \mu\text{g} \times 10^{-1}$ g de peso de animal (RAMOS *et al*, 1998). Cada animal recebeu 1,0 mL de amostra dissolvida em solução salina. Essa solução diluente serviu como controle negativo para o experimento. A atividade tóxica foi caracterizada no caso de morte do animal no período de até 72 horas, depois da injeção da amostra.

4.2.3.8.4 Interação de lectina e polissacarídeo *in vitro*

Para testar a presença de um receptor endógeno da lectina no extrato da semente de *Mucuna sloanei*, a xiloglucana foi reticulada e realizada uma cromatografia de afinidade com a matriz formada e o extrato total de semente de *M. sloanei* com NaCl 0,15 M. A interação da lectina e da xiloglucana solúvel foi avaliada por espectroscopia de fluorescência.

4.2.3.8.4.1 Cromatografia de afinidade

Foram utilizadas as mesmas condições do item 4.6.1 sendo que a matriz de afinidade utilizada foi a xiloglucana de *M. sloanei* reticulada como descrito em 5.2.3.

Também foi realizada uma cromatografia com a lectina de *Mucuna sloanei* acoplada a SepharoseCL-4B onde 5,0 mL de uma solução de xiloglucana 2 mg mL^{-1} foi adicionada como amostra e seguido o perfil cromatográfico com os mesmos eluentes do item 5.2.3. As frações eluídas da coluna foram analisadas quantitativamente por determinação do teor de açúcar através do método de Dubois (1956).

MATERIAL E MÉTODOS

4.2.3.8.4.2 Preparação da matriz de afinidade de lectina de *Mucuna sloanei*-Sephrose 4B

Para a preparação da matriz de lectina de *Mucuna sloanei* imobilizada a ser utilizada na interação do polissacarídeo solúvel com a matriz imobilizada, lectina foi acoplada a um gel de Sepharose ativado com brometo de cianogênio (Spharose-CNBr, Pharmacia Biotech, Suécia).

À 3,00 g de Sepharose CL-4B, ativada com brometo de cianogênio, lavado exaustivamente com HCl 1 mM, foi misturada uma solução de lectina (27mg/7mL) em tampão NaHCO₃ 0,1 M pH 8,3 contendo NaCl 0,15 M e Galactose 0,2 M. A mistura foi deixada em repouso por 2 h, em seguida centrifugada a 2000 g por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com tampão NaHCO₃ 0,1 M pH 8,3 contendo NaCl 0,15 M. Em seguida os grupos reativos remanescentes foram bloqueados transferindo o gel para uma solução tampão Tris-HCl, 0,1 M, pH 8,0 (2 h à temperatura ambiente). O gel foi então empacotado em uma coluna de 1,0 cm de diâmetro e 10 mL de capacidade, e lavado com três ciclos de pH alternantes (5 volumes de cada tampão). Cada ciclo consistia de uma lavagem com tampão acetato 0,1 M pH 4,0 contendo NaCl 0,5 M seguindo por uma lavagem com tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,3, contendo NaCl 0,5 M.

4.2.3.8.4.3 Espectroscopia de fluorescência

A quantificação da fluorescência foi realizada usando um espectrofluorímetro ISS K2 (ISS – Illinois). As amostras contendo lectina foram excitadas em 280 e 295 nm e os espectros de emissão foram monitorados de 295-395 até 450 nm. Para todos os experimentos foram utilizados cubetas de quartzo com 1 mL de volume e 1 cm de caminho óptico.

A quantificação da fluorescência foi também utilizada para avaliar a interação lectina – polissacarídeo. Amostras contendo 1,25 mol L⁻¹ de polissacarídeo foram adicionadas a diferentes quantidades de lectina (0,283 a 1,84 mol L⁻¹) e os tubos foram deixados durante a noite sob agitação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Características gerais da semente e análise elementar

Mucuna sloanei como outras leguminosas, produz muitos frutos por planta e possui de 1 a 8 sementes por fruto. As sementes são arredondadas com comprimento de 3,0 cm e largura de 2,5 cm, com massa de $8,0 \pm 0,2$ g, e espessura de 1,8 cm (Figuras 17 e 18). Depois de retirada a casca, as sementes de *Mucuna sloanei* foram trituradas obtendo-se assim uma farinha (Figura 19) e esta farinha apresentou 23,4% de proteína, determinado pelo método de Kjeldahl; 9,5% de lipídio e 4,8% de cinzas em relação ao peso seco da farinha estes valores são compatíveis quando comparamos com os encontrados por Afolabi, 1985 para sementes de *Mucuna sloanei* nigeriana, 24,0% ($\pm 2,6\%$) de proteína, 6,5% ($\pm 1,5\%$) de lipídio e 3,0% ($\pm 0,7\%$).



Figura 17 – Vagens e sementes verdes e quiescente de *Mucuna sloanei*

RESULTADOS E DISCUSSÃO



Figura 18 – Vagens e sementes quiescentes de *Mucuna sloanei*



Figura 19 – Semente inteira, triturada e farinha de sementes de *Mucuna sloanei*.

5.2 Isolamento e análise dos polissacarídeos de sementes de *Mucuna sloanei*

5.2.1 Extração e composição

Em todas as frações obtidas no isolamento do polissacarídeo, descrito na metodologia, foram determinados o teor de carboidrato pelo método de fenol sulfúrico (DUBOIS *et al*, 1956), o teor de proteína solúvel pelo método de HARTREE (1972) e a composição em monossacarídeo (Tabela 2).

Tabela 2 - Composição das diversas frações polissacarídicas extraídas de farinha de semente de *Mucuna sloanei* após ter sido retirada a casca.

Frações	Açúcar (g %)	proteína (g %)	Rendi- mento* (g %)	Composição monossacarídica (mol %)					
				Glc	Xyl	Gal	Rha	Ara	Man
PFH ₂ O	42	26	50	46,6	31,5	19,4		2,5	
PTCA	69	1	ND	46,3	33,7	20,0			
PH ₂ O	68	2	30	40,1	38,1	21,8			
PH ₂ O26	64,8	3,3	28,5	40,1	38,1	21,8			
P2H ₂ O26	70,6	4,2	5,3	40,6	39,1	20,3			
P3H ₂ O26	78,2	7,5	3,4	39,5	39,1	21,4			
P4H ₂ O26	73,1	19,2	0,5	45,2	32,5	18,7		3,6	
poli r1	77,3	4,5	1,5	53,8	29,6	15,4		1,1	
poli r2	68,3	14,3	1,2	47,5	33,4	18,2		0,9	
poli r3	74,7	13,9	0,2	49,1	31,1	17,6		2,2	
poli k1	87,5	11,3	2,0	62,5	21,9	11,3	1,4	2,9	
poli k4	66,6	17,3	0,9	52,6	22,5	18,0		6,9	
Resíduo final	ND	ND	0,3	1,1	4,4	4,5		58	32

* Teor calculado a partir da massa fresca das sementes pulverizadas sem casca

Para a obtenção do polissacarídeo nativo foi necessário fazer um pré tratamento para a inativação enzimática. A primeira tentativa feita para inativar as enzimas foi deixar a semente inteira em água fervente por 20 minutos (fração PFH₂O). Foi também usado um pré-tratamento alternativo proposto por Zawadzki-Baggio *et al* (1992) com MeOH:H₂O como descrito na metodologia. O resíduo da inativação enzimática foi extraído com água (PH₂O) ou TCA (PTCA). TCA foi utilizado por Onweluzo *et al* (2002) quando eles caracterizaram

Teixeira, D. M. A., 2005

RESULTADOS E DISCUSSÃO

polissacarídeo de *Mucuna flagellipes*. Na fração PFH₂O foi observado um alto conteúdo protéico (26%) enquanto que as frações PTCA e PH₂O mostraram um baixo teor de proteína (1 e 2% respectivamente). Para confirmar a presença de proteína, foi feito um espectro no UV-VIS das frações PFH₂O e PH₂O (Figura 20) onde foi observada uma alta absorção a 280 nm para a fração PFH₂O.

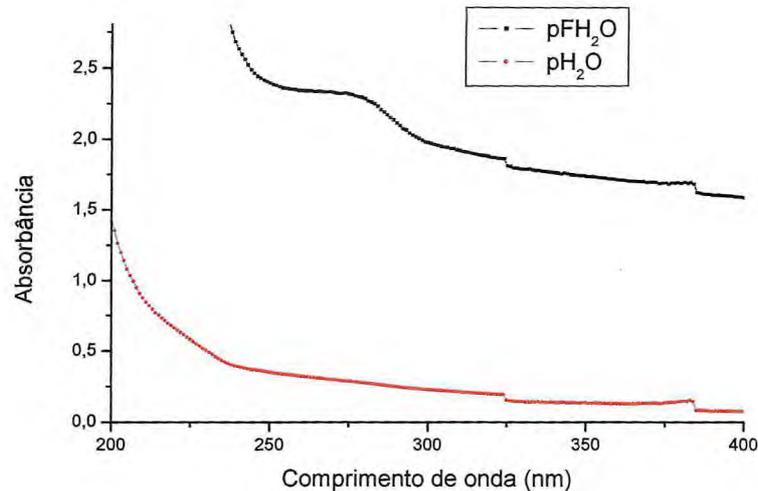


Figura 20 – Espectro de UV-Visível usando amostras de 1mg/mL em preto a fração PFH₂O e em vermelho a fração PH₂O.

A composição em monossacarídica (Tabela 2) das frações extraídas com água fria e TCA apresentam apenas glucose, xilose e galactose em concentrações semelhantes, exceto a fração PFH₂O e P4H₂O que contém concentrações baixas de arabinose (2,5 e 3,6 % respectivamente), provavelmente devido à presença de outro polissacarídeo. Todas as frações extraídas com água quente (50 °C ou 70 °C) apresentam pequenas quantidades de arabinose variando de 0,9 a 2,2% e o percentual de glucose é maior do que para as frações extraídas com água fria. Este comportamento é seguido pela extração com KOH. Já o resíduo final da extração quando hidrolisado pela hidrólise de Seamens apresentou uma grande quantidade de arabinose e manose.

A composição de monossacarídeos nas frações extraídas com água fria ou quente e com NaOH em diferentes concentrações indicaram portanto, a presença de uma xiloglucana, como as encontradas em sementes de *Tamarindus indica* (REID,1985), de *Copaifera langsdorffii* (BUCKERIDGE *et al*, 1992), de *Hymenaea courbaril* (LIMA *et al*, 1993), de *Detarium senegalense* (WANG *et al*, 1996), de *Detarium microcarpum* e de *Mucuna*

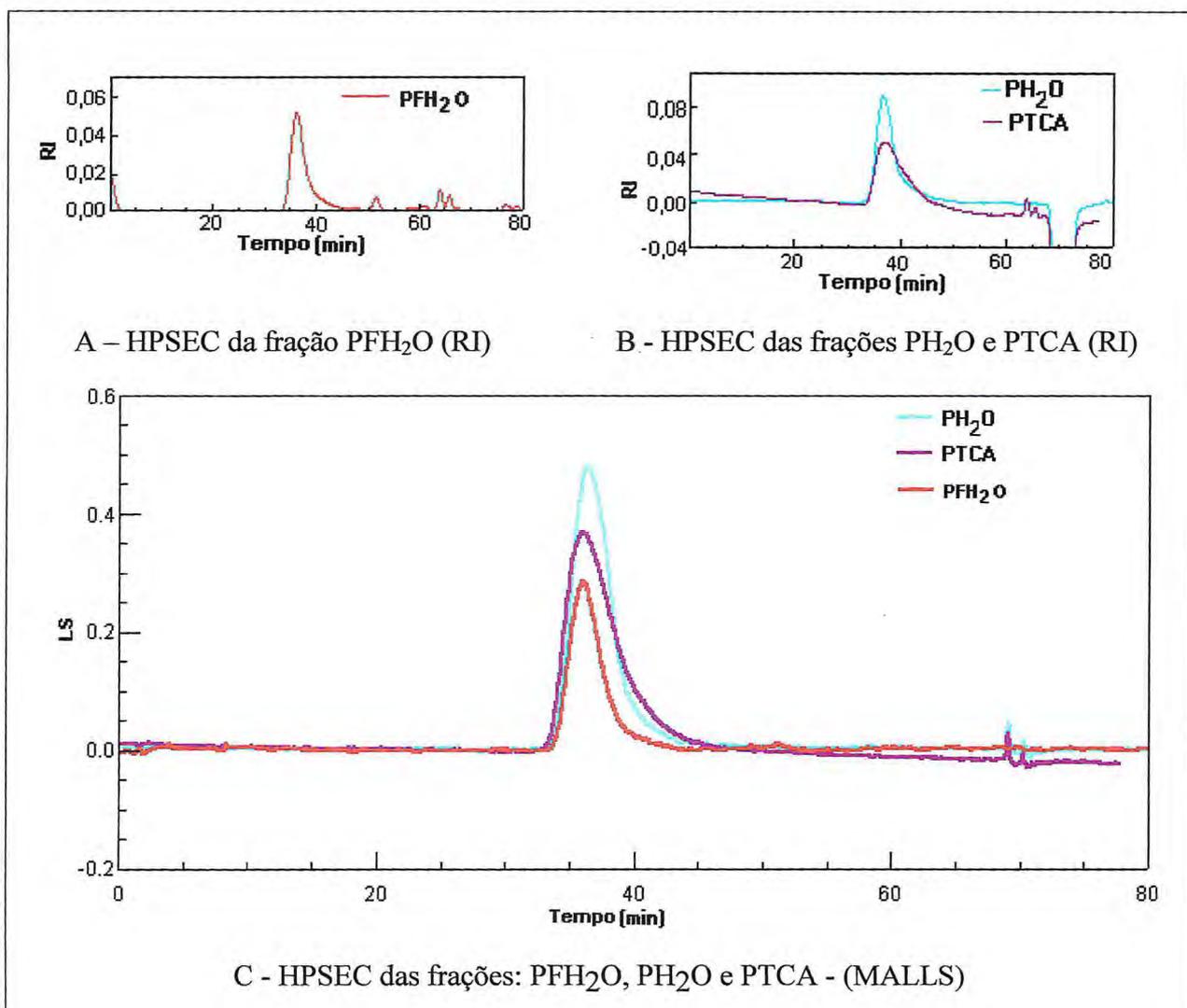
RESULTADOS E DISCUSSÃO

flagellipes (ONWELUZO *et al*, 2002).

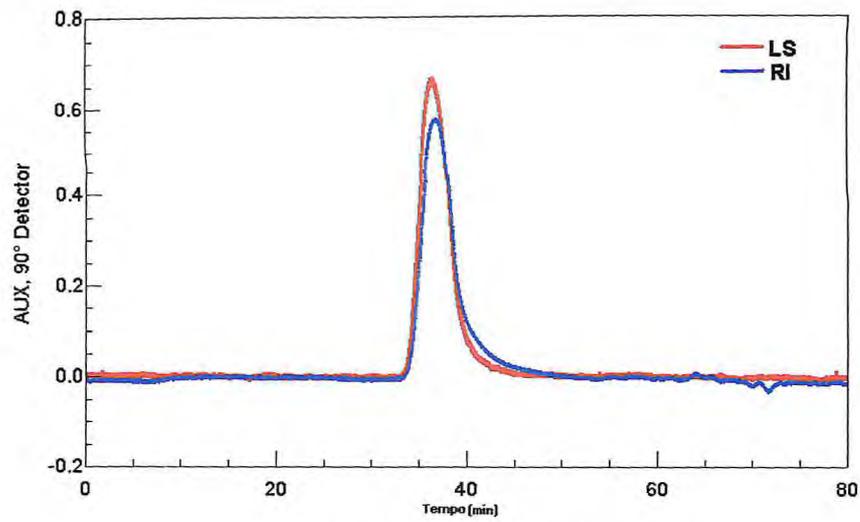
Pela tabela 2 também podemos observar que a principal hemicelulose presente nesta semente é a fração extraída com água chegando a representar 30% do cotilédone da semente de *Mucuna sloanei* isto representa 22% do peso seco da semente sendo que este valor ainda é baixo quando comparado com a xiloglucana de semente *Hymenaea courbaril* (jatobá) que representa 45% do peso seco (LIMA *et al*, 1993).

5.2.2 Análise de HPSEC-MALLS

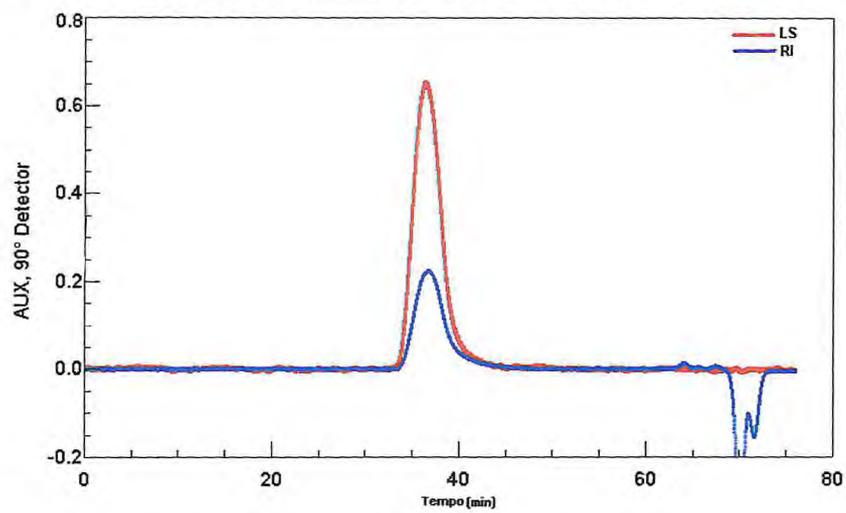
Os perfis de eluição (Figura 21) das principais frações polissacarídicas de *Mucuna sloanei* dissolvidas em água foram determinados por cromatografia de exclusão molecular de alto desempenho (HPSEC), estão apresentados abaixo:



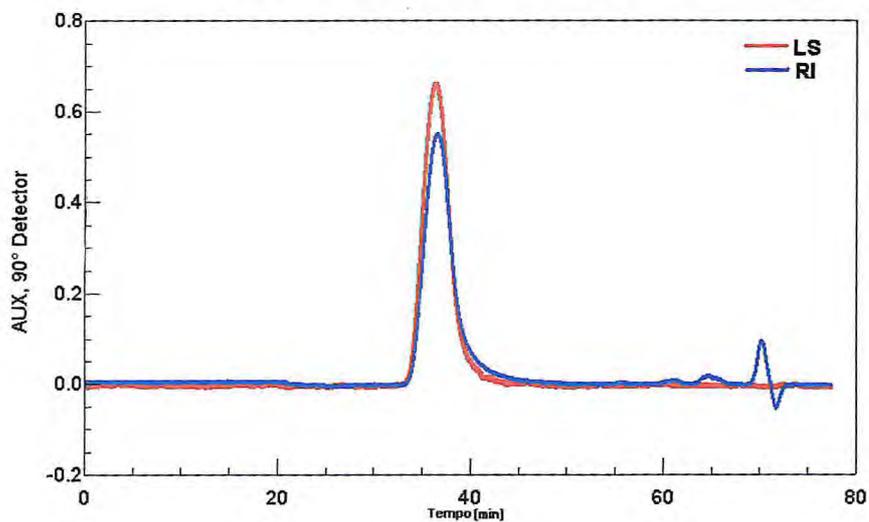
RESULTADOS E DISCUSSÃO



D - HPSEC da Fração PH₂O₂₆ (LS e RI)

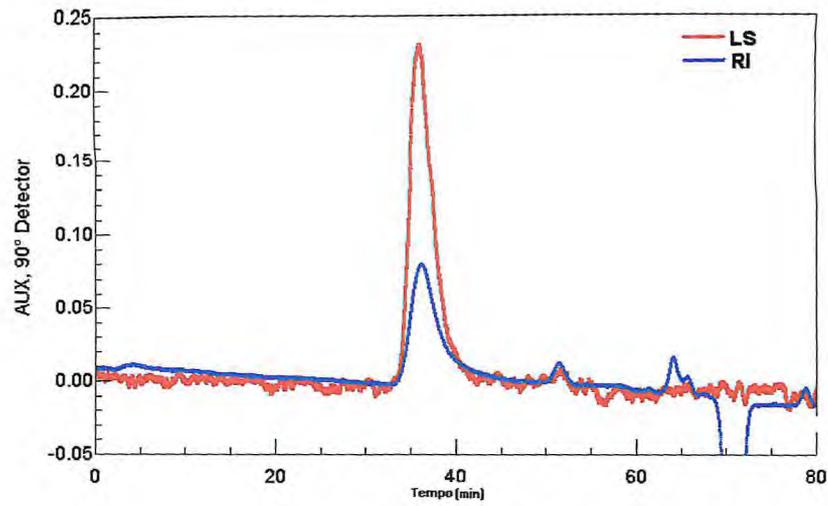


E - HPSEC da Fração P₂H₂O₂₆ (LS e RI)

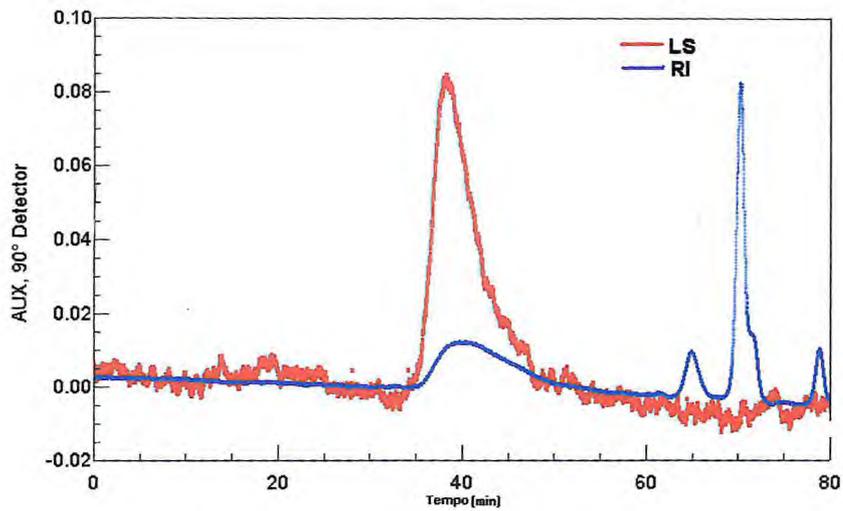


F - HPSEC da Fração P₃H₂O₂₆ (LS e RI)

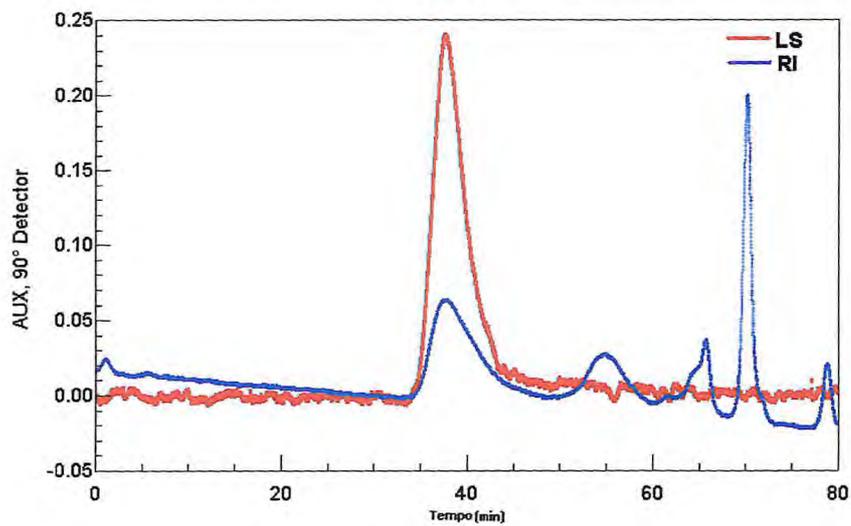
RESULTADOS E DISCUSSÃO



G – HPSEC da Fração poli r2 (LS e RI)



H – HPSEC da Fração poli k1 (LS e RI)



I – HPSEC da Fração poli k4 (LS e RI)

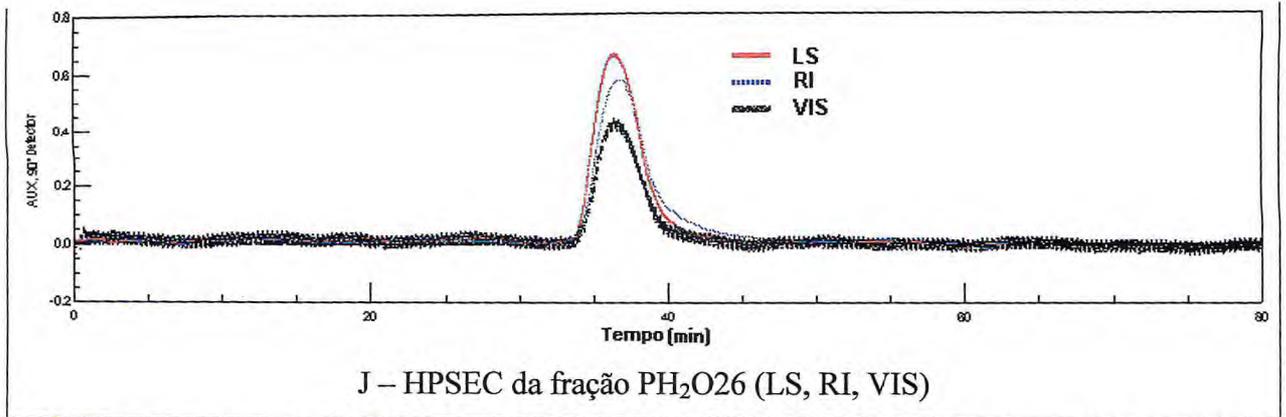


Figura 21: Perfil de eluição da cromatografia por exclusão estérica (HPSEC) das frações PFH₂O (A,C), PTCA (B, C), PH₂O (B, C), PH₂O₂₆ (D, J), P₂H₂O₂₆ (E), P₃H₂O₂₆ (F), poli r₂ (G), poli k₁(H) e poli k₄ (I) com diferentes detectores: espalhamento de luz em multiângulos (MALLS), índice de refração Waters 2410 Wyatt Technology Dawn-F (RI), e viscosímetro (VIS).

Pode-se observar que em todas as amostras extraídas com água fria (Figuras 21 - C, D, E, F, J) é encontrado apenas um pico entre 33-45 min quando analisado apenas com o detector de espalhamento de luz. A fração PFH₂O (Figura 21 – A) apresenta pelo menos quatro picos quando analisado por detector de índice de refração comprovando mais uma vez que esta mostra está contaminada como já revelada por determinação de proteínas nesta amostra. E quando observamos o perfil de eluição das frações PFH₂O e PTCA por índice de refração observamos também apenas um pico. No entanto uma banda larga é observada para a fração PTCA, indicando degradação da amostra. As frações poli r₁ e poli r₂ apresentam mais de um pico quando são observadas por índice de refração evidenciando assim que estas amostras não estão puras. Estes resultados também são observados para as frações extraídas com hidróxido de potássio. A fração PH₂O foi analisada por mais um detector o de viscosidade comprovando a sua homogeneidade também por este detector.

A fração PH₂O, obtida através de extração com água e resultante de um pré tratamento com metanol:água em refluxo apresentou-se homogênea e com baixo teor de proteína. Portanto, esta fração foi utilizada para as outras análises de caracterização deste polissacarídeo.

Foi feita a determinação de ácido urônico, tanto seguindo a metodologia de BLUMENKRANTZ e ASBOE-HANSEN (1973) e como também por cromatografia em papel e não foi observada a presença deste composto. Em seguida foi determinada a rotação óptica

RESULTADOS E DISCUSSÃO

específica desta xiloglucana, apresentando um valor de $+60^{\circ}$ a 25°C .

Na cromatografia de exclusão por tamanho (HPSEC), é possível a determinação simultânea da massa molar numérica média (M_n), massa molar ponderal média (M_w) e da distribuição de massa molecular. A massa molecular de um polissacarídeo não pode ser calculada como normalmente é feito com compostos puros de baixa massa molecular. Os polímeros de carboidratos consistem de um agrupamento de moléculas de vários tamanhos, ou seja, exibem normalmente uma distribuição de massa molecular, sendo denominados polidisperso. O índice de polidispersão corresponde à razão entre a massa molar ponderal média e a massa numérica média M_w/M_n . Para amostras monodispersas, os valores de M_w e M_n são praticamente idênticos, e a polidispersão é igual a unidade (BUSATO, 2004).

Analisando a Figura 22 e 23 observamos esta variação para a massa molar da xiloglucana de *Mucuna sloanei*. Foi determinado o valor de massa molar média (M_w) de $1,6 \times 10^6$ g/mol, um raio de giro (R_g) de 99,9 nm, um grau de polidispersão (M_w/M_n) de 1,3 e o dn/dc (variação no aumento do índice de refração com respeito a solução soluto solvente devido a mudança na concentração) calculado experimentalmente para esta macromolécula foi de 0,137 mL/g a 633 nm. Os valores de massa molar média, raio de giro e grau de polidispersão são comparáveis aos encontrados por Freitas *et al* (2003), para a xiloglucana de *Hymenaea courbaril* que foram respectivamente, $1,44 \times 10^6$ g/mol, 75,8 nm e 1,7. Esta fração exhibe uma ampla variação na massa molar exibindo, portanto, um comportamento polidisperso. Estes gráficos são usados particularmente na determinação das massas molares que estão contidos nas amostras de polissacarídeos.

A habilidade das técnicas de “light scattering” na determinação de parâmetros relacionados a tamanho é de grande importância para a determinação da conformação das moléculas. O raio de giro (R_g) é proporcional ao tamanho geométrico das moléculas, sendo que o raio de giro versus a massa molar (M_w) fornece informações sobre a conformação. Na Figura 24 é apresentado o gráfico do raio de giro versus a massa molar da fração PH_2O . Quando R_g varia muito em função de M_w , inclinação da reta ≈ 1 , próxima a 90° , tem-se uma molécula mais rígida, com conformação em bastão. Moléculas mais flexíveis apresentam inclinação da reta $\approx 0,5$, apresentando conformação emaranhado ao acaso. Para moléculas esféricas, o raio é proporcional a raiz cúbica da massa. Neste caso, R_g varia pouco em função de M_w e a inclinação da reta é de $\approx 0,33$ (WYATT, 1993). Na Figura 24 pode-se observar uma grande variação (flutuação) nos valores do gráfico de raio de giro em função da massa molar para a xiloglucana de sementes de *Mucuna sloanei*. O $R_g \times M_w$ para esta amostra

RESULTADOS E DISCUSSÃO

forneceu inclinação da reta de 0,42, o que sugere uma conformação emaranhado ao acaso. Semelhante ao valor de 0,44 encontrado por Busato, (2004) para xiloglucana de semente de *Hymenaea courbaril*.

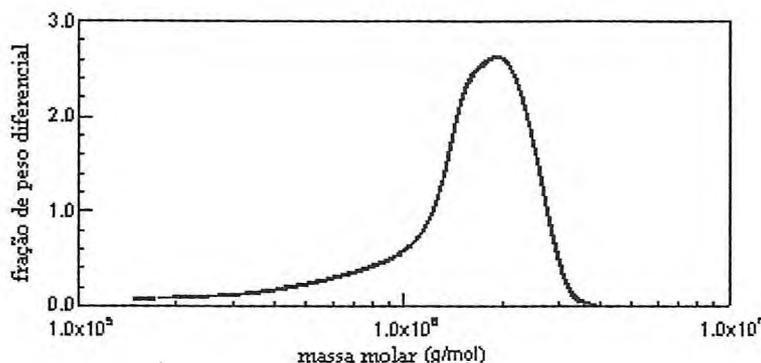


Figura 22 – Distribuição da variação da massa molar da fração PH₂O.

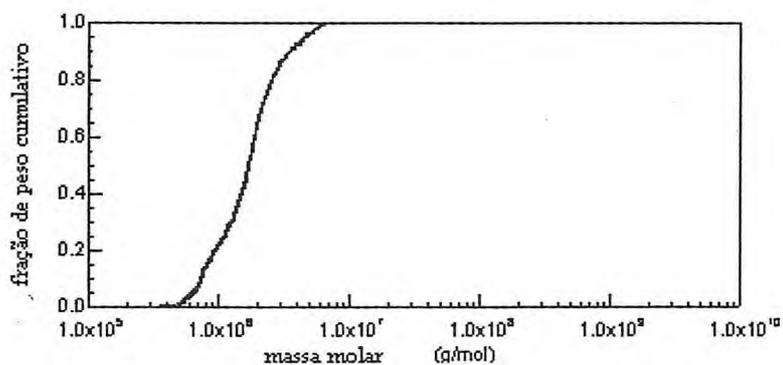


Figura 23 - Distribuição cumulativa da massa molar da fração PH₂O.

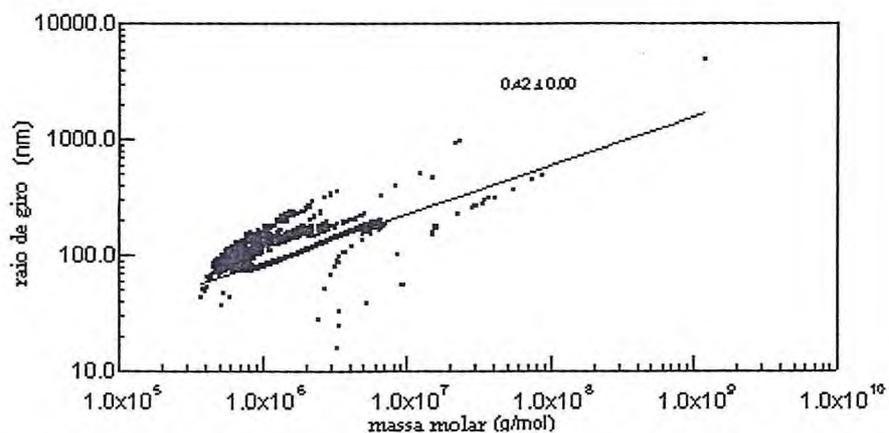


Figura 24: Gráfico do raio de giro versus a massa molar da fração PH₂O.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.2.3 Análise de Metilação

A fração PH₂O foi submetida à técnica de metilação de acordo com CIUCANU e KEREK (1984), a redução dos monossacarídeos parcialmente metilados com NaBD₄, o que permite distinguir os derivados 2,3- Me₂-xilose e 3,4- Me₂-xilose e encontramos a estrutura geral de uma xiloglucana de reserva. Apresentando uma cadeia principal celulósica (42% de unidades de são glucose ligadas (1→4)) sendo que 85% destas unidades de glucose estão ligadas em O-6 por unidades de α-D-xilopirranose; estas últimas, por sua vez podem estar substituída em O-2 (confirmado pela presença do derivado 3,4-di-O-metil-xilitol) por unidades de β-D-galactopirranose num percentual de 61 % (Tabela 3).

A formação de derivados parcialmente metilados fornece informações importantes sobre as ligações e substituições das unidades que compõem o polissacarídeo. Os perfis de fragmentação são apresentados nos espectros de cromatografia gasosa acoplada a massa (figuras 25-29) de todas as unidades monossacarídicas presentes na xiloglucana de *Mucuna sloanei*.

Tabela 3 - Análise de metilação da fração PH₂O de sementes de *Mucuna sloanei*.

alditol acetato O-metilado	Ligação indicada	Mol %	Tempo de retenção (s)
2.3.4-Me ₃ -Xyl	(Xylp)1→	11,1	454
2.3.4.6-Me ₄ - Gal	(Galp)1→	21,9	506
3.4-Me ₂ -Xyl	→2(Xylp)1→	25,0	569
2.3.6-Me ₃ -Glc	→4(Glcp)1→	9,0	679
2.3-Me ₂ -Glc	→4(Glcp)1→	33,0	969
	6 ↑		

Coluna: OV-225

RESULTADOS E DISCUSSÃO

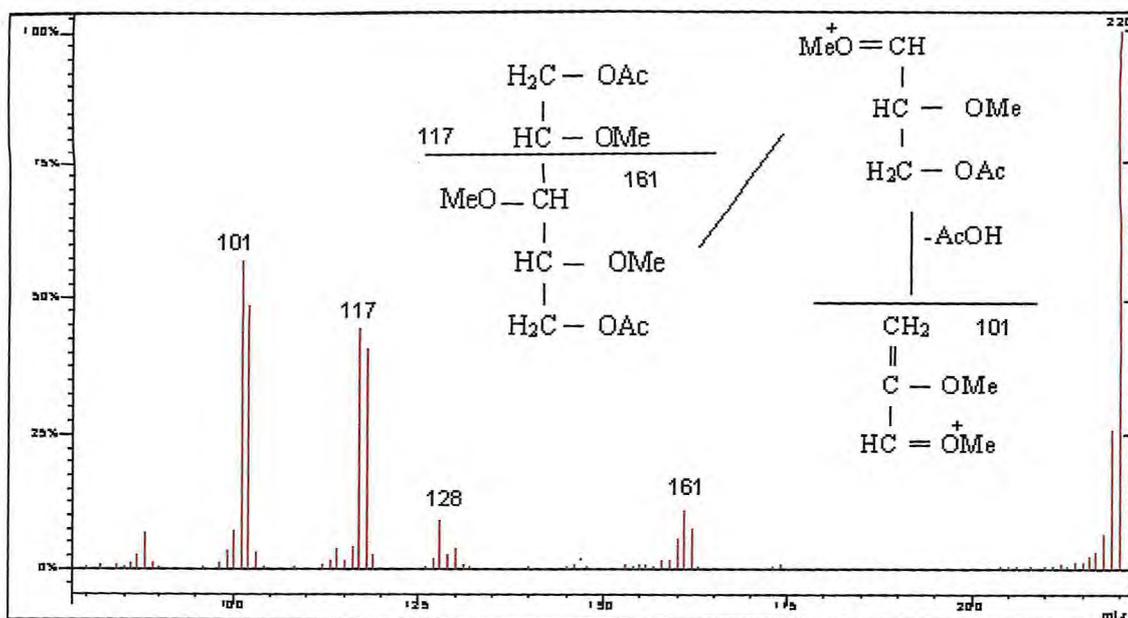


Figura 25 - Espectro de GC-MS do derivado 2,3,4-Me₃-Xyl da xiloglucana metilada na forma de acetatos de alditois parcialmente metilados.

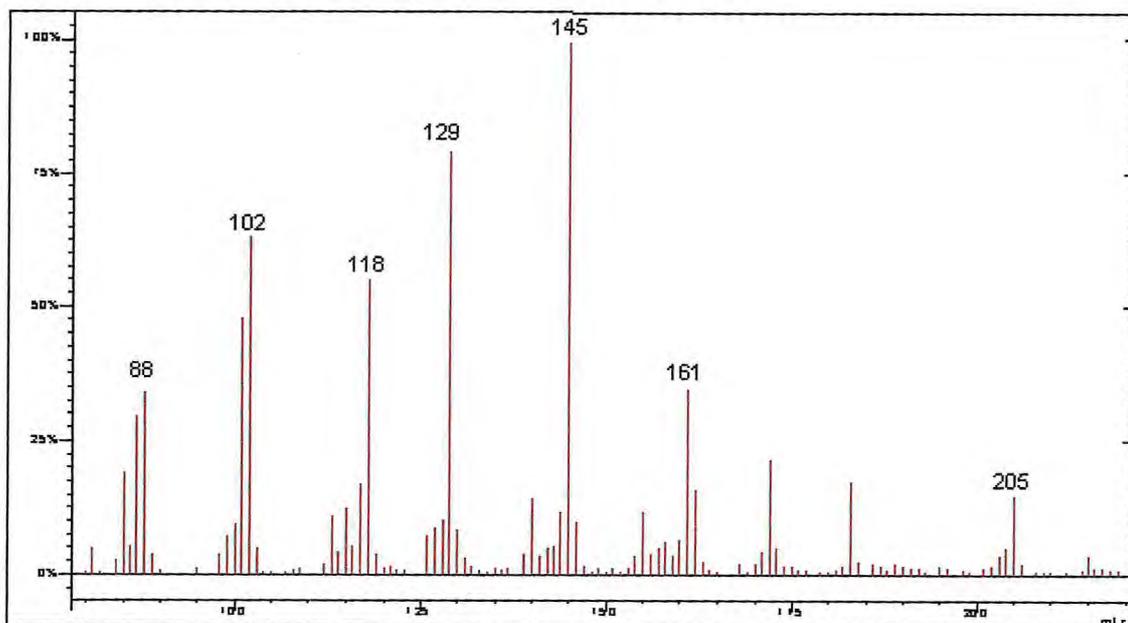


Figura 26 - Espectro de GC-MS do derivado 2,3,4,6-Me₄-Gal da xiloglucana metilada na forma de acetatos de alditois parcialmente metilados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

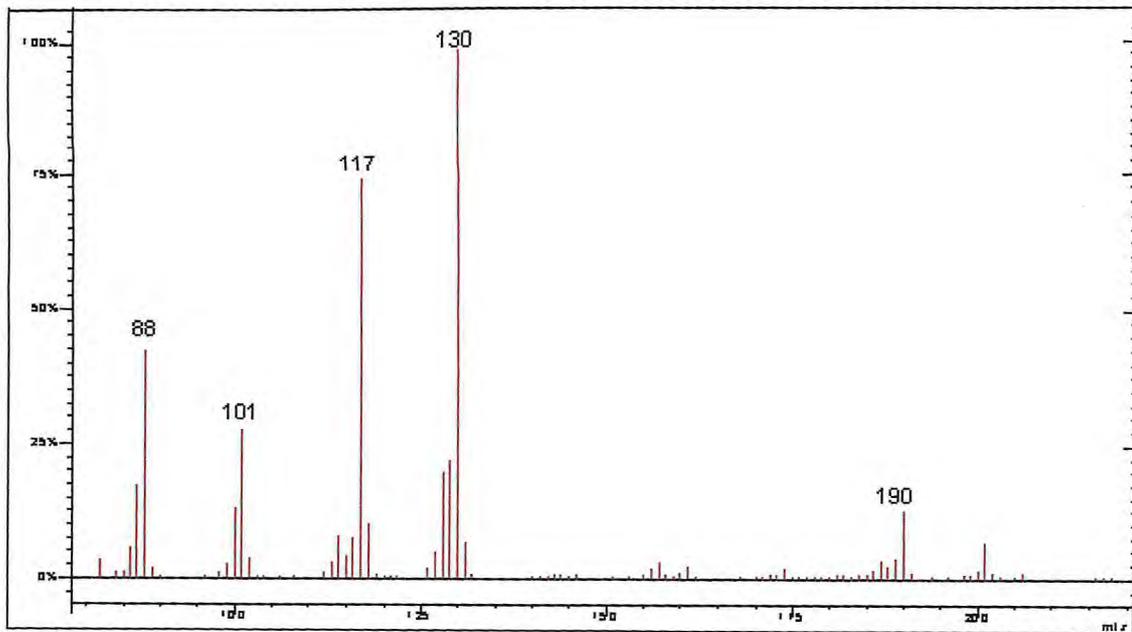


Figura 27 - Espectro de GC-MS do derivado 3,4-Me₂-Xyl da xilogucana metilada na forma de acetatos de alditois parcialmente metilados.

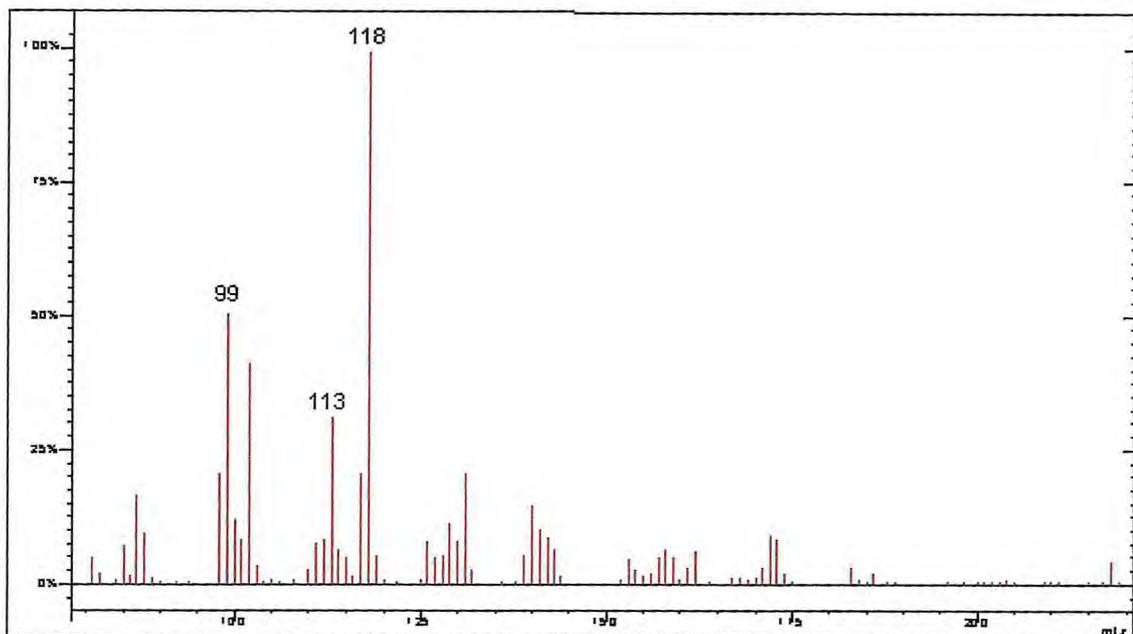


Figura 28 - Espectro de GC-MS do derivado 2,3,6-Me₃-Glc da xilogucana metilada na forma de alditois acetatos *O*-metilados.

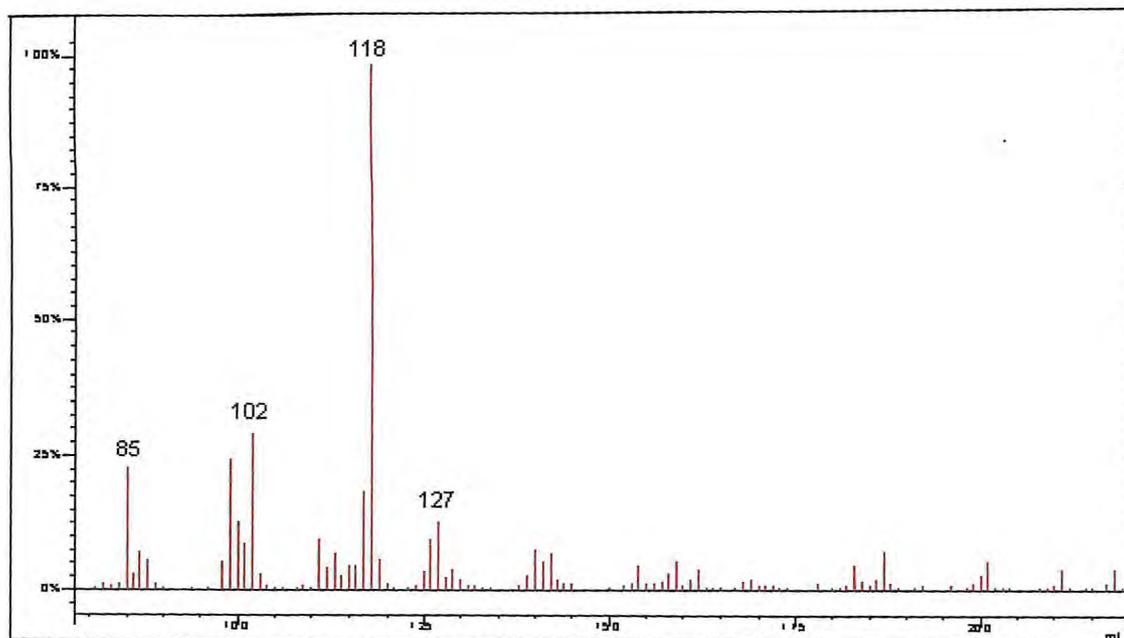


Figura 29 - Espectro de GC-MS do derivado 2,3-Me₂-Glc da xiloglucana metilada na forma de acetatos de alditois parcialmente metilados.

5.2.4 Análises de infravermelho

As análises de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) (Figura 30, Tabela 4) mostram que a xiloglucana de *Mucuna sloanei* tem uma banda específica na região de 1200-1000 cm⁻¹ devido a vibração do anel com vibrações de estiramento (ν) dos grupos laterais de (C-OH) e vibrações de estiramento (ν) de ligações glicosídicas de (C-O-C) - 1160-30 cm⁻¹ (KAKURÁKOVÁ *et al*, 2000). Unidades de galactose possuem uma ligação típica encontrada em 1155 cm⁻¹ sendo que em xiloglucanas esta banda pode aparecer em frequências mais baixas como por exemplo em xiloglucana de *Pisum sativum* esta banda foi verificada com uma frequência de 1153 (KACURÁKOVÁ *et al*, 2000). Para a xiloglucana de *Mucuna sloanei* foi atribuída a banda em 1154 para estas ligações de unidades de galactose. A banda em 1042 é devido ao estiramento (ν) C-O e C-C do anel (c) (KACURÁKOVÁ *et al*, 2002). As bandas características da região anomérica para ligações do tipo α -ligação (834 cm⁻¹) e β -ligação (1371 e 898 cm⁻¹) permitem distinguir bem estes tipos de ligações glicosídicas de compostos aldopiranos e furanóides (879 e 858 cm⁻¹). Outras bandas comuns em polissacarídeos são as correspondentes as hidroxilas que ocorrem na faixa de comprimento de onda de 3000 e 3500 cm⁻¹ e próximo a 1150 cm⁻¹, além da banda devida a deformação axial (δ) dos grupamentos COO em 2359. As frequências descritas por Kacuráková *et al*, (2000)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

para a xiloglucana de *Pisum sativum* L. estão relacionadas na Tabela 4 em comparação com as frequências encontradas para a xiloglucana de *Mucuna sloanei* aqui estudada.

Tabela 4 – Comparação de frequências de FT-IR de polissacarídeos de *Pisum sativum* (KACURÁKOVÁ *et al*, 2000 e KACURÁKOVÁ *et al*, 2002) e *Mucuna sloanei*.

	C-OH	C-O-C	C-C	anel	C1-H	anel
<i>Pisum sativum</i> L	1153	1118	1078	1041vs	945	897
<i>Mucuna sloanei</i>	1154			1042vs	945	891

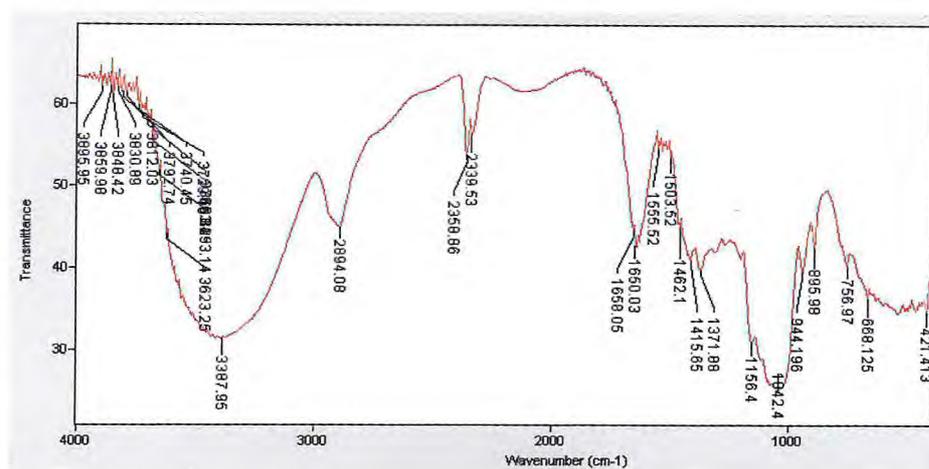


Figura 30: Espectro de Infravermelho (FT-IR) da fração PH₂O de *Mucuna sloanei*

Foi feito também a análise de infravermelho no material metilado (Figura 31) onde não detectamos bandas em 3000 e 3500cm⁻¹, correspondentes as hidroxilas, pois estas foram substituídas por grupos metila.

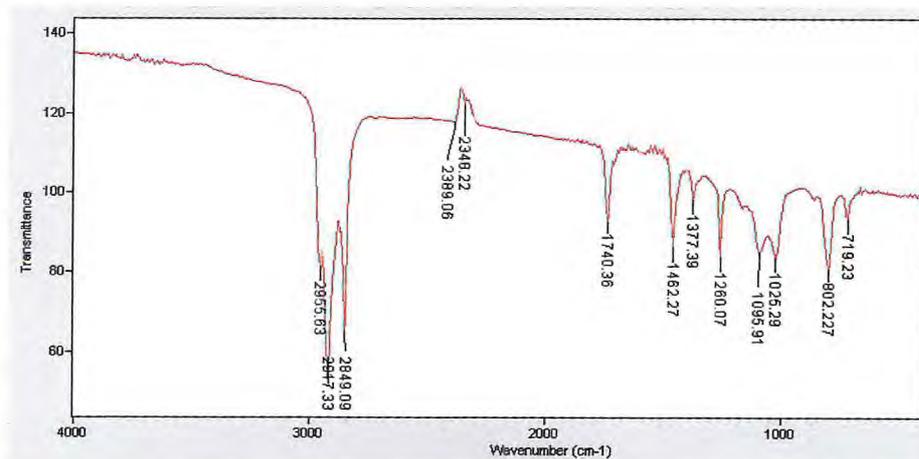


Figura 31: Espectro de Infravermelho (FT-IR) da fração PH₂O de *Mucuna sloanei* após metilação.

5.2.5 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

A xiloglucana aqui purificada de *Mucuna sloanei* também foi analisada por ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C (^{13}C -RMN) (Figuras 32-36). Os prótons anoméricos das unidades de xilose terminais e substituídas por galactose em O-2 foram identificados a 4,94 e 5,12, respectivamente. Na região anomérica das hexoses ocorreu uma sobreposição dos sinais das unidades de glucose e galactose (Figura 32).

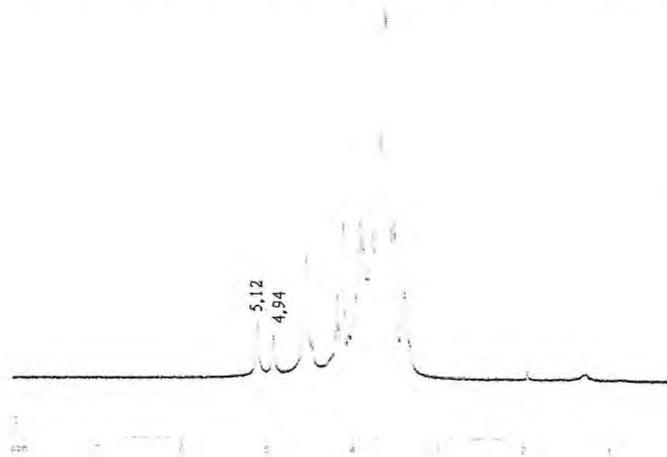


Figura 32 - Espectro de H^1 da xiloglucana (PH_2O), a 70 mg/mL (D_2O , 80 °C). Os deslocamentos químicos são expressos em δ ppm.

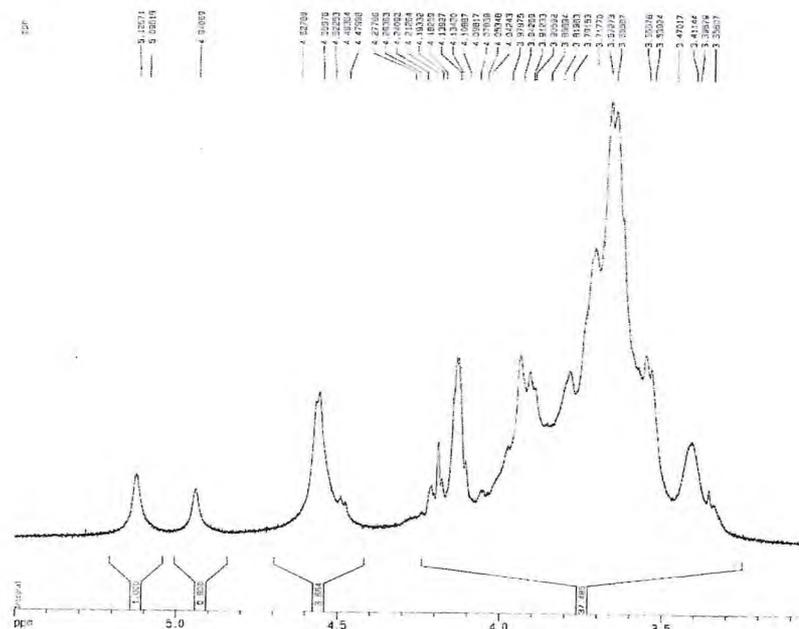


Figura 33: Expansão do espectro de H^1 da xiloglucana (PH_2O), a 70 mg/mL (D_2O , 80 °C). Os deslocamentos químicos são expressos em δ ppm

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A região anomérica do espectro de ^{13}C -RMN foi interpretada com base em dados da literatura por comparação com de xiloglucana de *Tamarindus indica* (LANG, 1992), de xiloglucana de semente (LIMA *et al*, 1993), de folha de *Hymenaea courbaril* (BUSATO *et al*, 2001) e xiloglucana de *Apple pomace* (WATT, 1999). O sinal com δ em 105,4 é assinalado para C-1 de grupos β -D-galactopiranosídeos terminais. O sinal complexo centrado em δ 103,4 foi assinalado para C-1 de unidades de β -D-glucopiranosídeos. O sinal que no espectro de ^{13}C -RMN aparece em 99,9 corresponde a C-1 de unidades de α -D-xilopiranosose.

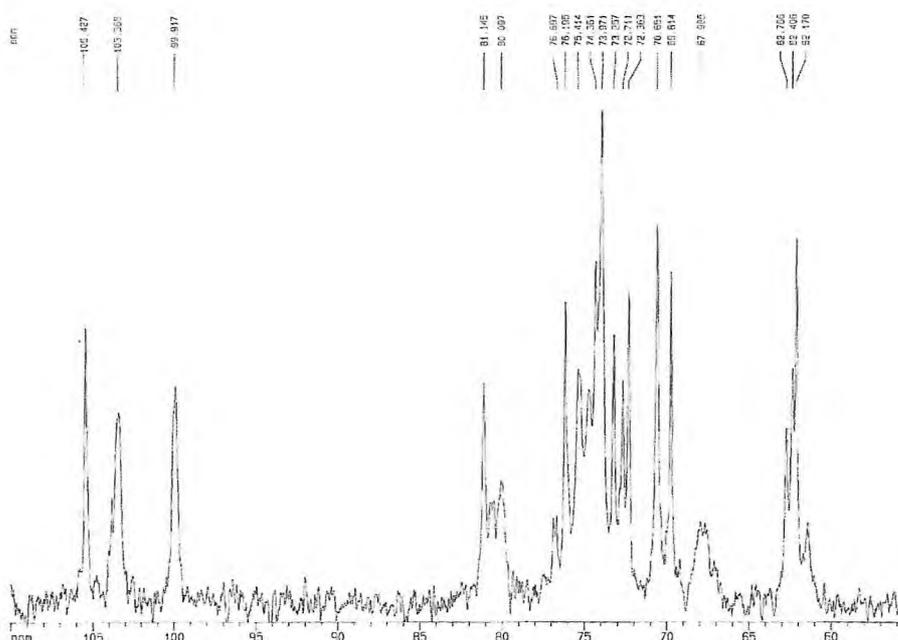


Figura 34 - Espectro de C^{13} da xiloglucana (PH_2O), a 70 mg/mL (D_2O , 80 °C). Os deslocamentos químicos são expressos em δ ppm.

Análises por RMN bidimensionais são ferramentas importantes para a identificação de sinais em moléculas cuja região anomérica apresenta-se complexa. Xiloglucanas são moléculas cuja região anomérica apresenta-se complexa, eventualmente apresentando sobreposições de sinais em espectros monodimensionais de ^{13}C -RMN. Desta maneira, os resultados das análises de metilação foram confirmados pelo espectro de ^{13}C DEPT (Figura 35) e HMQC (Figura 36) onde podemos observar que o sinal em 99,9 no espectro de ^{13}C -RMN aparece correspondente a C-1 de unidades de α -D-xilopiranosose aparecem desdobrados em 99,94 e 99,91 correspondendo a C-1 de unidades de α -D-xilopiranosose terminal e substituído respectivamente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Além destes sinais para os carbonos anoméricos, é também possível distinguir sinais de C-4 de unidades de β -glucopiranosil substituídos a 80,1 ppm. Sinais que estão invertidos no espectro de ^{13}C DEPT, em 62,17 e 62,77 podem ser assinalados para C-5 de unidades de α -xilopiranosil e C-6 de β -glucopiranosil. Estes espectros confirmam que a fração PH_2O representa uma xiloglucana com cadeia principal de unidades D-glucopiranosil ligados β -1 \rightarrow 4 e substituídos por cadeias laterais de α -D-xilopiranosil ou por α -D-xilopiranosídeos(1 \rightarrow 2)- β -D-galactopiranosil ligados em O-6.

Tabela 5 - Deslocamentos químicos de ^{13}C e alguns de ^1H -NMR da xiloglucana de semente de *Mucuna sloanei*

Unidades	C-1	C-4	C-5	C-6
β -Glc	103,4	80,1 (subst)		62,77
α -Xyl	99,91, 5,125		62,17	
α -Xyl ^t	99,94 e 4,94			
β -Gal	105,4 e 4,449			

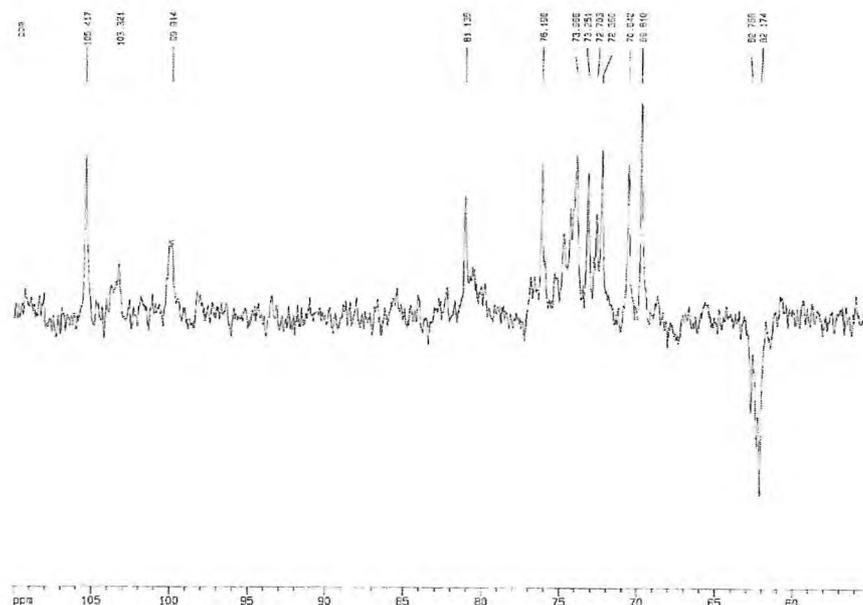


Figura 35 - Espectro de DEPT da xiloglucana (PH_2O), a 70 mg/mL (D_2O , 80 °C). Os deslocamentos químicos são expressos em δ ppm

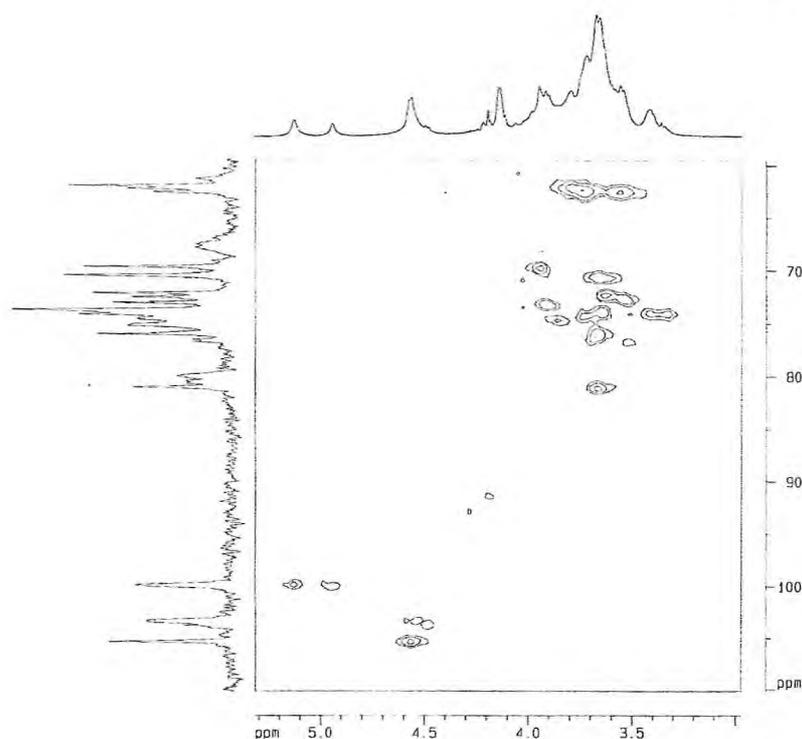


Figura 36 - Espectro de HMQC da xiloglucana (PH₂O), a 70 mg/mL (D₂O, 80 °C). Os deslocamentos químicos são expressos em δ ppm.

5.2.6 Análise HPAEC-PAD e elétron spray

A cromatografia por HPAEC-PAD de oligossacarídeos de xiloglucana gerados por endoglucanas, consiste em um método de identificação rápido (HONISHI *et al.*, 1998) e altamente reprodutível. Além disso permite a separação de oligossacarídeos estreitamente relacionados, tais como os isômeros de posição XLXG e XXLG (LEROUXEL *et al.*, 2002). Um estudo comparativo da estrutura fina de xiloglucanas de reserva de sementes de *Tropaeolum majus*, *Tamarindus indica* e *Copaifera langsdorffii* tem mostrado um padrão similar em oligossacarídeos derivados da digestão completa deste polissacarídeo com enzimas específicas, todos sendo compostos representados quase totalmente por quatro subunidades de glucose, XXXG, XLXG, XXLG e XLLG. A única exceção foi XXXXG de sementes *Hymenaea courbaril* (BUCKERIDGE *et al.*, 1997). Quando os oligossacarídeos de xiloglucanas de *Mucuna sloanei* foram analisados por HPAEC-PAD (Figura 37) foram encontrados: 8,98% de XXXG, 1,92% de XLXG, 27,96% de XXLG e 61,14% de XLLG mostrando uma estrutura comum de xiloglucana de reserva, no entanto, com uma

RESULTADOS E DISCUSSÃO

percentagem de XLXG mais baixa do que as anteriormente encontradas para xiloglucana de semente de *Tamarindus indica* e *Copaifera langsdorffii* (Tabela 6).

Tabela 6: Proporção de oligossacarídeos derivados da digestão completa em xiloglucanas de diferentes espécies.

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

*Fonte: Lima, 2004.

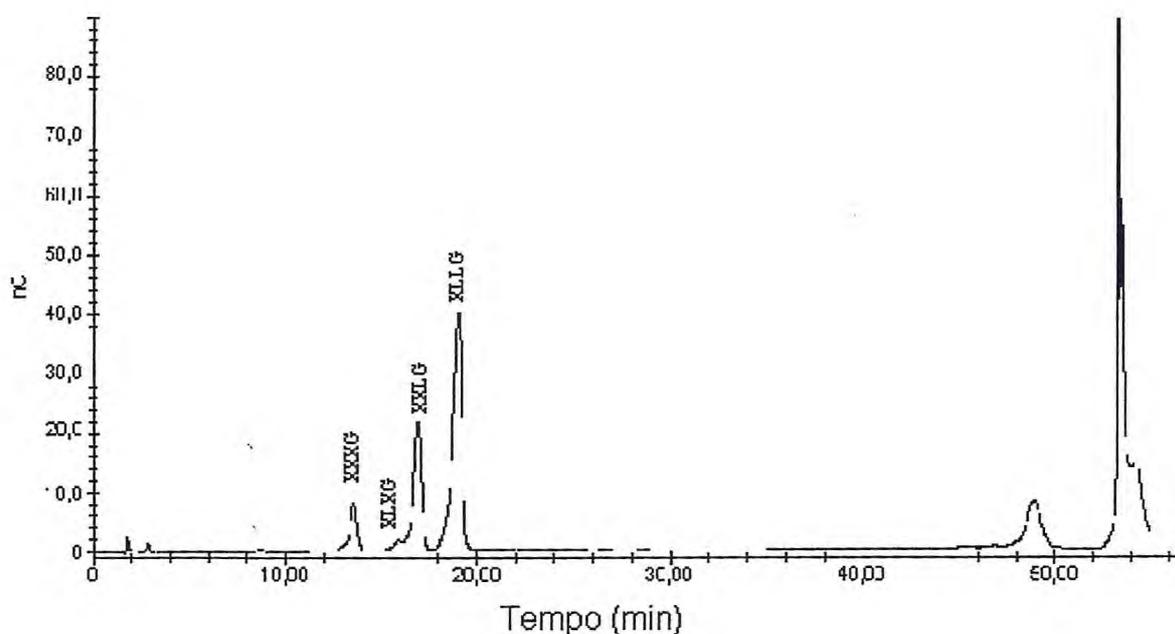


Figura 37 – Análise de HPAEC-PAD dos oligossacarídeos derivados da digestão completa de xiloglucana de *Mucuna sloanei* pela celulase.

A estrutura de oligossacarídeos da xiloglucana foi determinada pela comparação de seu comportamento de eluição no HPAEC com aqueles de referência já conhecida, e por análise de massa molecular por espectrometria de massa de ionização por “eletronspray” (Figura 38). O sinal com massa de 1085 é devido ao composto de quatro hexoses e três pentoses complexado com o íon sódio. O sinal com massa de 1247 corresponde a este mesmo oligossacarídeo com a adição de mais uma hexose e o sinal de 1409 é indicativo de seis hexoses e três pentoses.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Destas duas análises podemos concluir que os oligossacarídeos obtidos após a incubação da xiloglucana com um endo-glucanase são: XXXG, XLXG, XXLG e XLLG nomeados de acordo com a nomenclatura de FRY *et al* (1993).

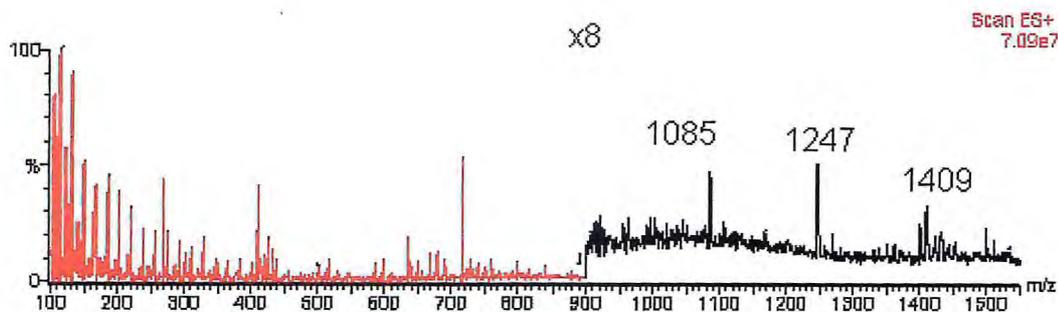


Figura 38 – Espectro de massa de oligossacarídeos derivados da digestão completa de xiloglucana de *Mucuna sloanei* por celulase através de espectrometria de massa de ionização por “eletronspray”

A partir das análises feita com o polissacarídeo derivado da extração aquosa de semente de *Mucuna sloanei* evidencia-se a presença uma xiloglucana de reserva com uma estrutura básica consistindo de uma cadeia principal de unidades de D-glucopiranosil ligadas $\beta(1\rightarrow4)$ com substituições de uma cadeia lateral de unidades de D-xilopiranoses α -ligadas em O-6, estendidas ou não pela adição de β -D-galactopiranosose ligadas em O-2 às unidades de α -D-xilopiranosídeos. Esta estrutura é semelhante à encontrada para xiloglucanas de reserva de sementes de *Copaifera langsdorffi* e *Tamarindus indica*.

O isolamento e caracterização deste polissacarídeo evidenciam e justificam a viscosidade do extrato salino de *Mucuna sloanei*. Para estudar se este polissacarídeo é o possível inibidor da atividade hemaglutinante do extrato de *Mucuna sloanei* foram feitos ensaios *in vitro* como será discutido no item 6.3.4.4.1. Sabendo que a xiloglucana é solúvel alguns dos ensaios (cromatografia de afinidade) apresentam a necessidade da obtenção de um polissacarídeo insolúvel para isto foi realizada uma reação de reticulação com a xiloglucana obtida de semente de *Mucuna sloanei*.

5.2.7 Reticulação com epiclorigrina

Quando a xiloglucana foi reticulada com epiclorigrina e submetida a em intumescimento com água, resultou em um gel que serviu como matriz cromatográfica para

RESULTADOS E DISCUSSÃO

isolamento de lectinas. Um grama de goma após reticulação resultou em uma coluna com volume de 11,0 mL, resultado similar ao encontrado quando se reticulou a galactomanana de *Adenanthera pavonina* (TAVARES, 1998).

A xiloglucana reticulada foi analisada por infravermelho e comparada com a xiloglucana antes da reticulação com epiclоридrina (Figura 39). Foram observadas mudanças nas regiões de 2339-2358, 2045 e na região de 1050 que corresponde ao estiramento (ν_{C-O}) de álcool primário. A reação de reticulação envolve a quebra da ligação hidroxila formando um ligação éter (Figura 16 da metodologia).

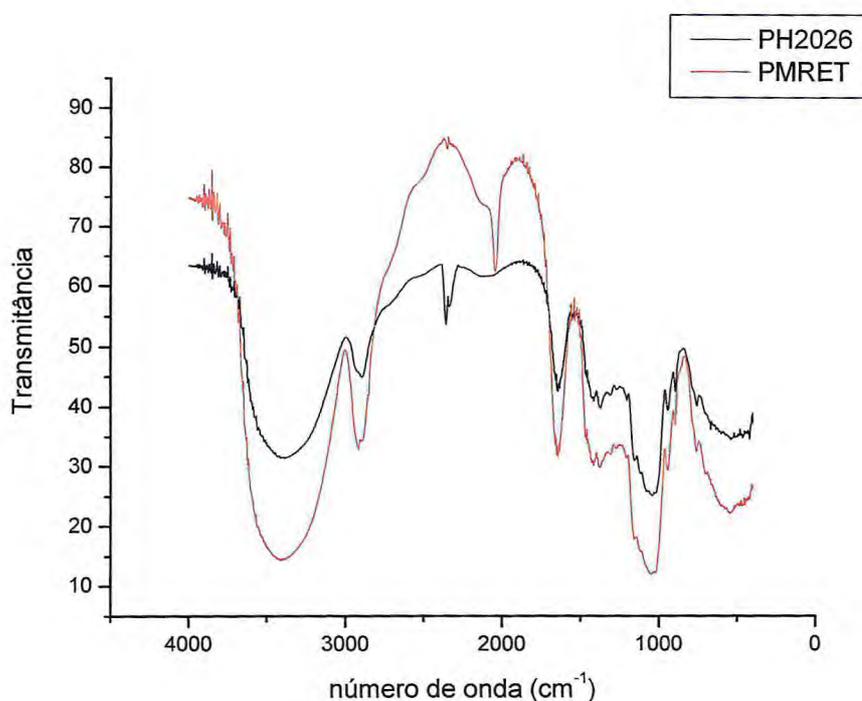


Figura 39: Espectros de Infravermelho (FT-IR) da xiloglucana de *Mucuna sloanei* (em preto) e da xiloglucana reticulada (em vermelho).

Comprovando a presença de uma xiloglucana de reserva no extrato salino de *Mucuna sloanei* algumas estratégias foram utilizadas para o isolamento da lectina de *Mucuna sloanei*. Como esta lectina não havia sido descrita até o momento a lectina foi caracterizada por técnicas químicas e biológicas como veremos adiante.

5.3 Isolamento e Caracterização da lectina de *Mucuna sloanei*

A purificação da lectina de *Mucuna sloanei* foi obtida através de uma única etapa de cromatografia de afinidade em galactomanana de semente de *Adenanthera pavonina* (TAVARES, 1998).

Foi realizado um teste de atividade hemaglutinante com eritrócitos de coelho não tratado no extrato total antes da aplicação na coluna com tempos variados de extração de 30 min, 1 hora e 2 horas. As leituras da atividade hemaglutinante no extrato foram feitas com 30 min e 24 horas após o ensaio. Os títulos de atividade hemaglutinante foram de $UH=2^1$ e 2^1 no mesmo dia com 30 min, 1 hora e 2 horas de extração e de $UH=2^6$ e 2^6 no dia seguinte com 30 min e com 1 hora de extração e de $UH=2^5$ e 2^5 com 2 horas de extração observado no dia seguinte. Portanto as extrações seguintes foram de apenas 30 min. Este fato é incomum em outras *Fabaceae*, e sugere a presença de um inibidor ou receptor da lectina no extrato. Quando a lectina foi isolada por cromatografia de afinidade obteve-se uma atividade significativa logo com 30 min após o ensaio.

Foi realizada uma cromatografia de afinidade com 47 mL de galactomanana de *Adenanthera pavonina* reticulada com epiclorigrina na presença de NaOH 3M. Para obter-se esta coluna foram reticulados 4,0 g de endosperma de *Adenanthera pavonina* pulverizados. A coluna foi lavada com solvente de equilíbrio (NaCl, 0,15M).

Para o isolamento da lectina, proteínas cotiledonarias de *Mucuna sloanei* foram extraídas com NaCl 0,15 M contendo ácido ascórbico 1% (para evitar desnaturação da proteína por fenol oxidase). Devido ao grande teor de xiloglucana existente, esta extração teve que ser feita com excesso de solução da NaCl 0,15 M (1:100, w:v), para se obter um baixo nível de viscosidade. O pico não retido da coluna foi eluído com NaCl 0,15 M e as proteínas ligadas foram eluídas com tampão acetato 0,1 M pH 2,6 na solução de equilíbrio (segundo pico), contendo atividade hemaglutinante para sangue de coelho normal. Esta fração foi denominada sloanina (Figura 40).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

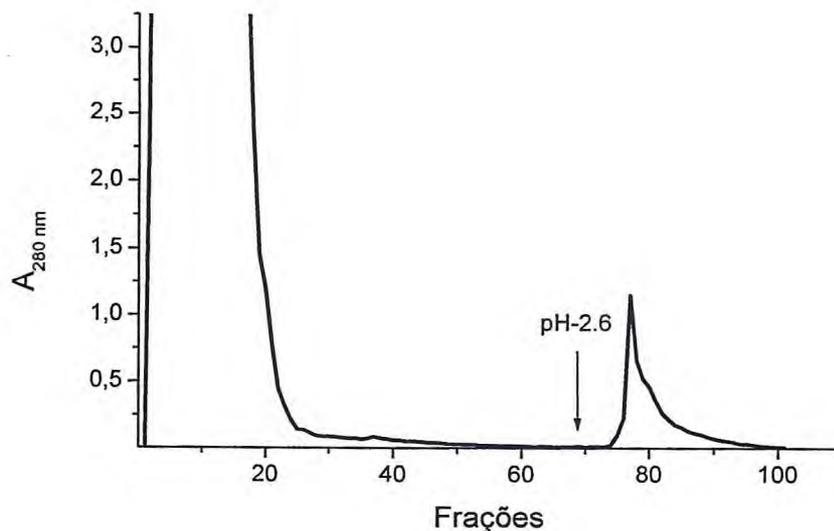


Figura 40 - Purificação da lectina de *Mucuna sloanei* por cromatografia de afinidade em galactomanana reticulada de *Adenantha pavonina*. A coluna (47 mL) foi equilibrada e primeiramente eluída com solução de NaCl 0,15 M. A lectina foi recuperada com tampão acetato em NaCl 0,15 M pH 2,6.

O extrato bruto também foi submetido a uma cromatografia de afinidade, em uma matriz contendo terminais D-galactose. Neste caso o pico retido saiu de maneira muito arrastada evidenciando a competitividade da ligação da lectina com a matriz cromatográfica e o tampão de eluição.

A lectina pôde ser obtida de forma altamente purificada usando-se matrizes de galactomanana ou de xiloglucana e foi denominada de sloanina. O padrão de eluição é típico de lectinas da família *Fabaceae*. O rendimento da lectina foi de 5,4 mg g⁻¹ de farinha de semente. Este rendimento é considerado baixo se compararmos com a lectina de *Dioclea lehmani* (DLL-I), (ca. 1300 mg) (Pérez, 1990); de *Dioclea grandiflora* (ca. 1200 mg) (MOREIRA, 1983); ou *Canavalia ensiformes* (2000-2400 mg) AGRAWAL, 1967, mas é três vezes maior do que o rendimento para a segunda lectina extraída de *Dioclea lehmani* (DLL-II) com um rendimento de 1,84 mg por grama de farinha (PÉREZ, 1998) e quase três vezes mais o rendimento da lectina TDSL de *Trichosanthes dióica* que é de 2 mg g⁻¹ de semente (SULTAN *et al*, 2004).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A sloanina mostrou-se homogênea por critérios de eletroforese em gel de poliacrilamida (Figura 41) e cromatografia de exclusão molecular em Superdex 75-HR (Figura 42).

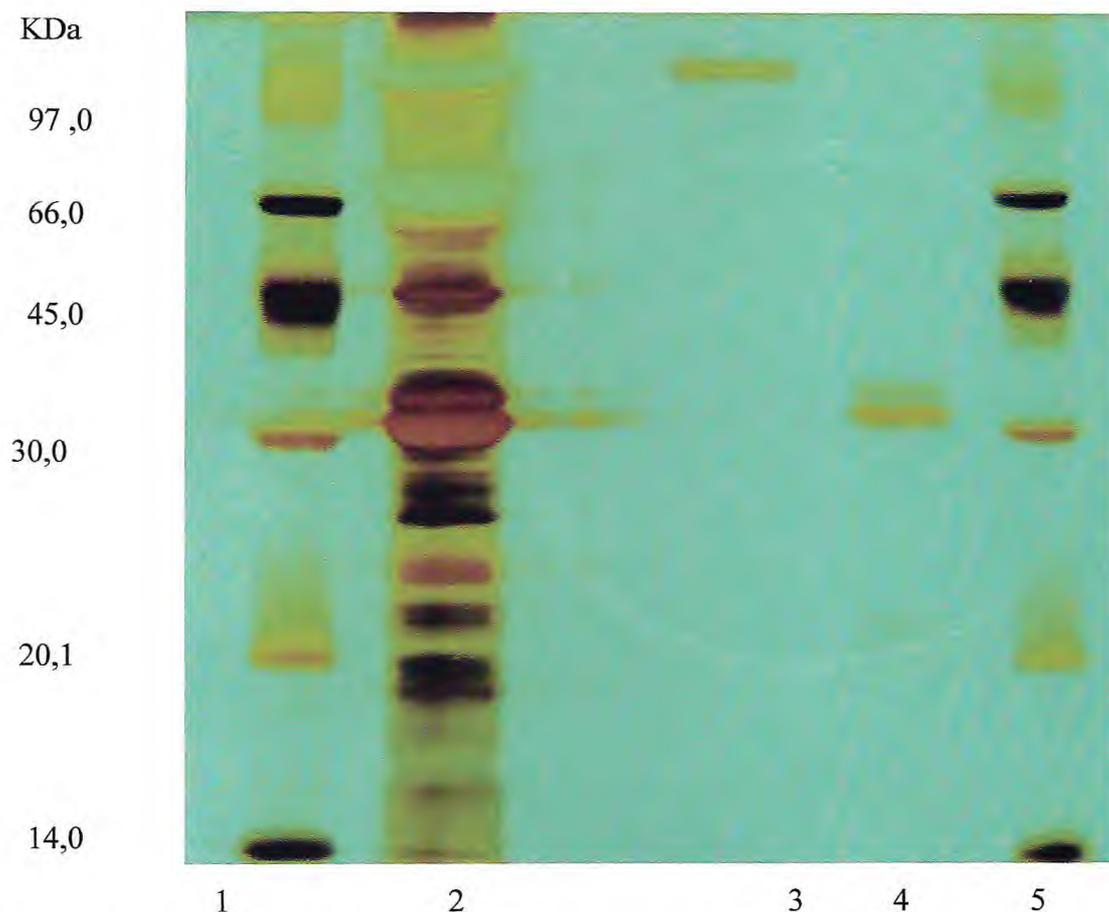


Figura 41 – Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de 2-mercaptoetanol da lectina de semente de *M. sloanei*. Linhas 1 e 5 – padrões de proteínas, linha 2 - farinha de semente de *M. sloanei*, linha 3 - sloanina sem aquecimento, linha 4 - sloanina com 15 minutos de aquecimento.

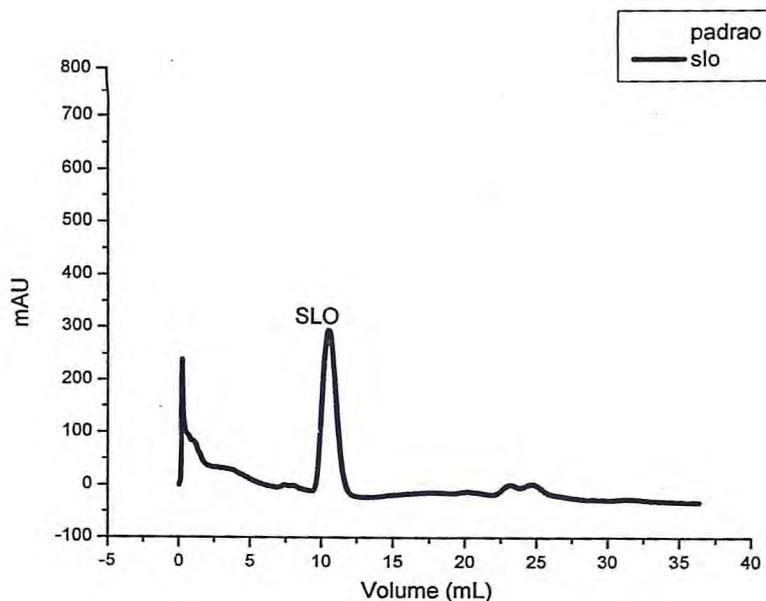


Figura 42 – Cromatografia da sloanina em coluna Superdex 75-HR. Esta coluna foi eluída com tampão PBS pH 7.2. Padrões: albumina serica bovina (BSA) (66 kDa), anidrase carbônica (30 kDa) e citocromo C (12,4 kDa)

5.3.1 Estimação da massa molecular de sloanina

A massa molecular de sloanina foi estimada por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes tendo os seguintes padrões de referência: fosforilase b (97,0 kDa), albumina serica bovina (BSA), ovalbumina (45,0 kDa), anidrase carbônica (30,0 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -Lactalbumina (14,4 kDa) (Figura 41) e usando os dados de eluição da cromatografia de exclusão molecular em Superdex 75 onde padrões utilizados foram: albumina serica bovina (BSA) (66 kDa), anidrase carbônica (30 kDa) e citocromo C (12,4 kDa), (Figura 42).

A eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS/PAGE) de sloanina na presença e ausência de 2-mercaptoetanol, mostrou duas bandas com M_r de 36 e 34 kDa (Figura 41). As duas bandas somente foram observadas quando as amostras foram previamente aquecidas. Quando esta mesma fração foi cromatografada em coluna Superdex 75-HR mostrou apenas um pico e a M_r foi de 63,6 kDa (Figura 42), sugerindo uma estrutura

RESULTADOS E DISCUSSÃO

dimérica para sloanina. Esta massa molecular foi mais alta que a obtida para lectina de *M. derringiana* (54 kDa).

5.3.2 Eletroforese bidimensional

A eletroforese bidimensional da sloanina apresentou três bandas, uma com massa superior a 66 kDa que foi atribuída a lectina nativa e outras duas bandas com massas superiores a 29 kDa que foram atribuídas as subunidades de M_r de 36 e 34 kDa já apresentadas na eletroforese unidimensional. Esta eletroforese bidimensional serviu para comprovar a pureza da lectina e para determinar o ponto isoelétrico que foi de 5,2 para a proteína (Figura 43).

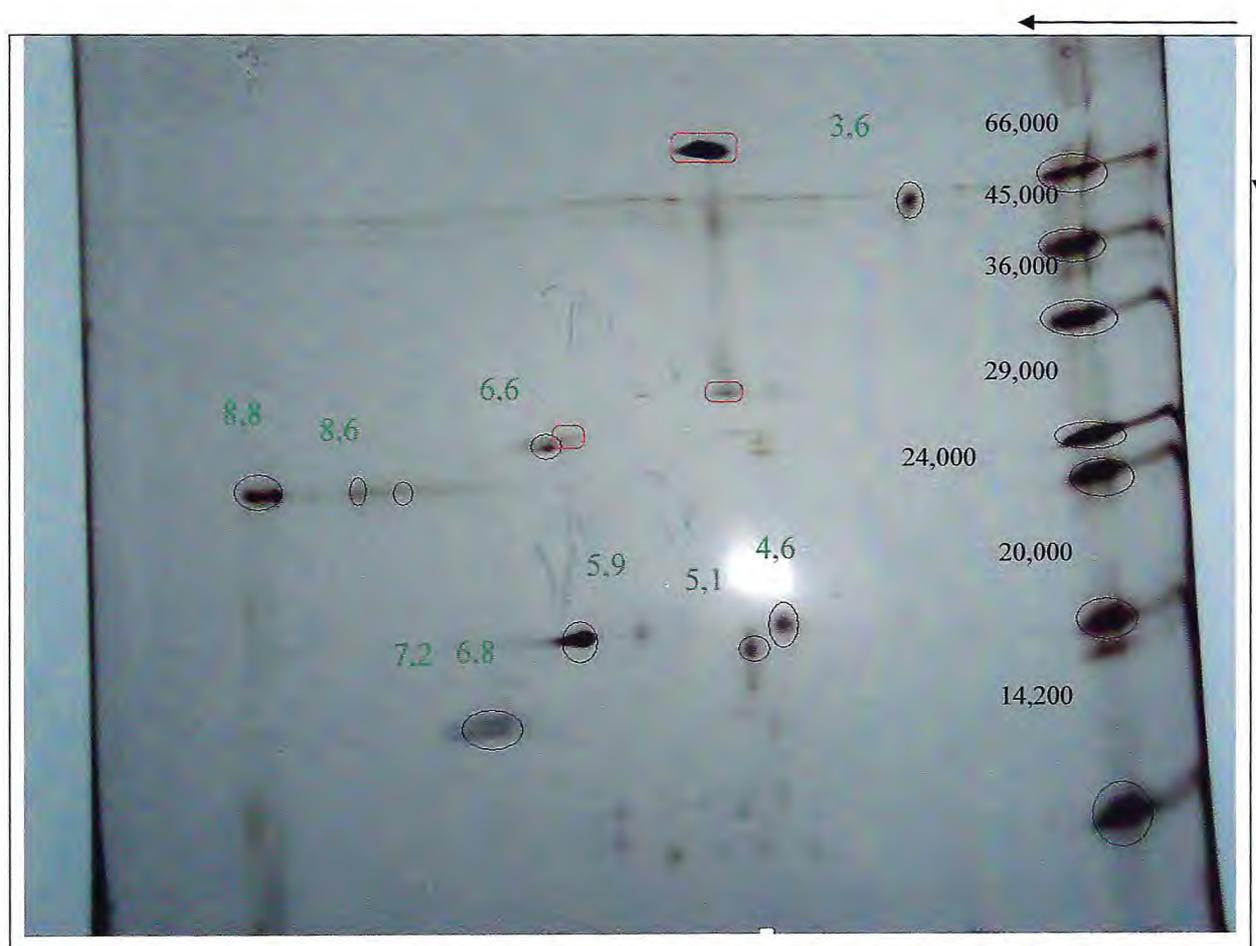


Figura 43 – Eletroforese bidimensional da lectina de *Mucuna sloanei*. A direita encontram-se os marcadores de peso molecular variando de 14,2 a 66 kDa em verde estão descritos os valores de padrões de ponto isoelétrico e em vermelho está circulada a lectina de *M. sloanei*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.3 Conteúdo de carboidrato na lectina

Quando a lectina, sloanina, foi submetida à eletroforese seguida por coramento com o reagente de Schiff-periodato foi visualizada uma única banda, indicando a presença de uma glicoproteína. Isto foi confirmado pelo método de Dubois *et al* (1956) que mostrou um conteúdo de carboidrato de 5,5%. Este teor de carboidrato da sloanina é comparável com os de lectina de *Araucaria brasiliensis* que contém 6,3% de carboidrato (DATTA *et al.* 1993); *Vaiterea macrocarpa* de 7,9% (CAVADA *et al.*, 1998); de *Dioclea lehmanni* 4,1% (PÉREZ, 1998), de *Artocarpus incisa* (frutalina) 2,1 % (MOREIRA, 1998) de *Sphenostyle stenocarpa* 4,26% (MACHUKA, 1999) de *Trichosanthes dióica* (TDSL) 4,9% (SULTAN *et al.*, 2004), de *Acácia constricta* (vinorama) 7,5% (GUZMÁN-PARTIDA *et al.*, 2004)

5.3.4 Espectroscopia UV-VIS

A sloanina, quando submetida a espectrofotometria na região do ultravioleta visível na concentração de $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$, apresentou máximo de absorção no comprimento de onda de 268 nm (Figura 44). Este padrão de absorção é característico da presença de cadeias laterais de aminoácidos aromáticos na proteína.

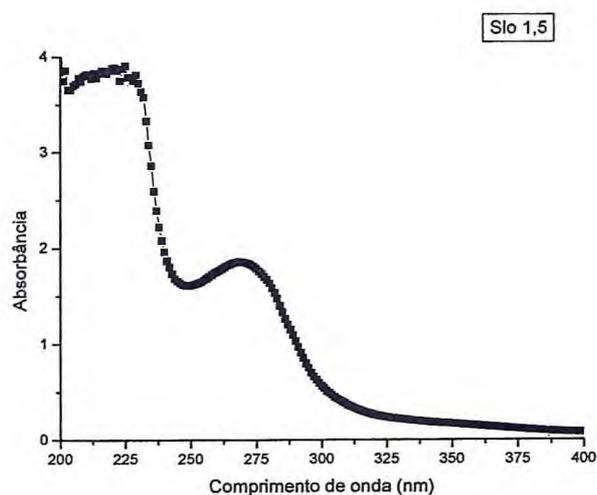


Figura 45 - Espectro de absorção molecular no ultra-violeta-visível da lectina de *Mucuna sloanei*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.5 Absorvitividade molar

A Sloanina, quando dissolvida em NaCl 0,15 M, apresentou um valor de absorção a 280 nm em células de 1 cm $E_{1cm}^{1\%}$ de 9,03. Este valor é parecido com o encontrado para lectina de semente *Dioclea violacea* que foi de 9,75 (MOREIRA, 1996); de *Canavalia ensiformis* (Com A) que foi de 11,4 (AGRAWAL, 1968), de *Dioclea lehmanni* (DLL-I) que foi de 14,85 (PÉREZ, 1990) de *Artocarpus incisa* 10,73 e de semente de *Erythrina speciosa* que foi de 14,5 (KONOZY, 2003).

5.3.6 Sequência N-terminal

A sequência N-terminal obtida para sloanina foi TETVSFAFNK¹⁰FVPDQPNLIL²⁰LEDAVITTS³⁰KLDLT³⁵. Como só foi encontrada uma sequência N-terminal evidencia-se que esta lectina é formada por um homodímero e que a diferença na massa molécula é devido à presença de açúcares na molécula. Em seguida à determinação da sequência N-terminal foi feita uma pesquisa no BLAST revelando que esta sequência tem um alinhamento significativo com muitas lectinas presentes no banco de dados, sendo que a mais alta identidade foi obtida para a cadeia A da aglutinina de soja, com uma identidade de 69%. Esta busca também indicou que a sloanina tem homologia com outras lectinas de legumes com domínio beta compatível com os dados de dicroísmo circular que iremos apresentar a seguir.

6.3.7 Espectros de Dicroísmo Circular e estimativa da estrutura secundária

O espectro de dicroísmo circular de sloanina (Figura 45) foi caracterizado por um máximo em 197 nm, dois mínimos de 216 nm e 233 nm a passagem do lado negativo para o positivo em 207 nm. Esta forma de espectro caracteriza uma proteína sem hélice (OLIVEIRA, 2002). O desconvolucionamento foi realizado usando o programa Selcon 2 e mostrou um conteúdo de 2% de α -helix, 54% folhas β paralela e anti-paralela, 17% de volta- β e 27% de outras contribuições, com um desvio médio quadrático de 1%. Estes resultados são compatíveis com lectinas de outras leguminosas que tem estruturas predominantes de folhas β (LORIS *et al*, 1998).

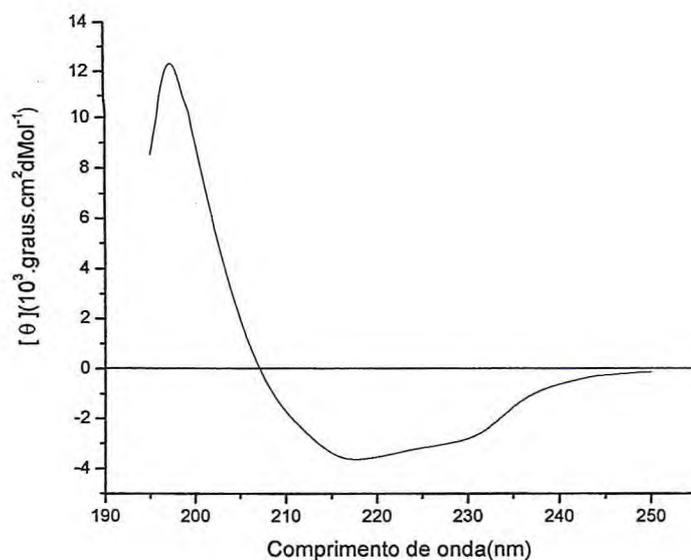


Figura 45 – Espectro de dicroísmo circular de sloanina (0.4 µg/mL) em PBS, pH 7.4, 25°C

5.3.8 Atividade biológica da lectina de semente de *Mucuna sloanei*

5.3.8.1 Atividade hemaglutinante

A lectina de *Mucuna sloanei* purificada mostrou uma atividade hemaglutinante eficiente contra eritrócitos de coelho. A concentração mínima de sloanina requerida para aglutinar eritrócitos de coelho a 2% foi 4,9 µg mL⁻¹. Foi uma concentração alta comparada com 0,3 µg mL⁻¹ para a lectina de semente de *Mucuna derringiana* (MO & GOLDSTEIN, 1994); 0,2-0,3 µg para a lectina DLL-II de *Dioclea lehmanni* para aglutinar eritrócitos do sistema ABO (PEREZ, 1998) e 0,2 µg para frutalina (lectina de *Artocarpus incisa*) também para hemaglutinar eritrócitos do sistema ABO (MOREIRA, 1998). Quando testada a atividade hemaglutinante da sloanina para eritrócitos de sistema ABO, esta lectina apresentou-se menos específica ainda. Sendo que quando estas hemácias de sangue humano foram tratadas enzimaticamente a especificidade aumentou consideravelmente (Tabela 7). A atividade hemaglutinante da sloanina também foi testada quanto afinidade por hemácias de galinha, pato, ganso, capote, galo, coelho, cabra, e ovelha não havendo aglutinação na presença de lectina na concentração de até 313 µg/mL.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 7 - Atividade hemaglutinante da lectina de sementes de *Mucuna sloanei*. Os dados são apresentados com a concentração mínima em $\mu\text{g/mL}$ capaz de aglutinar

Eritrócitos		Intacto	Tratado com		
			Tripsina	Papaína	Bromelaina
Humano	A	ND	ND	78.2	0.6
	B	ND	ND	39.1	1.2
	AB	ND	156	156	1.2
	O	ND	ND	156	1.2
Coelho		4.9			1.0

ND – sem aglutinação na presença de lectina (acima de 313 $\mu\text{g/mL}$)

5.3.8.2 Propriedades de ligação a açúcar

A atividade hemaglutinante da sloanina contra eritrócitos de coelho foi inibida somente por D-galactose e seus derivados tais como; metil- α -D-galactopiranosideo, metil- β -D-galactopiranosideo e o dissacarídeo α -Lactose que contém galactose na sua estrutura. A concentração mínima que diferentes açúcares necessitam para inibir a atividade hemaglutinante da lectina está apresentada na Tabela 8. Destes resultados pode-se evidenciar que a sloanina tem uma leve preferência para ligar-se a açúcares com anomeridade β pois uma quantidade menor de açúcar é capaz de inibir a atividade hemaglutinante da lectina.

Tabela 8: Especificidade de ligação a carboidrato de sloanina:

Açúcar	C_i (mM)
D(+)-galactose	4,5
metil- α -D-galactopiranosideo	2,7
metil- β -D-galactopiranosideo	1,7
α -Lactose	3,4
D(-)-arabinose	>60
D(-)-frutose	>60
D(+)-glucose	>60
D(+)-manose	>60
D(+)-xilose	>60
Sacarose	>30
Maltose	>30

C_i – Quantidade de açúcar (mM) requerida para inibir 1 unidade hemaglutinante

UH – corresponde a 4.9 $\mu\text{g/mL}$ de lectina

5.3.8.3 Atividade tóxica

Muitas lectinas são proteínas tóxicas ou que apresentam características antinutricionais (VASCONCELOS & OLIVEIRA, 2004). A lectina de *Mucuna sloanei* não apresentou atividade tóxica aguda numa dose de até $2.0 \mu\text{g} \times 10^{-1}$ g de peso de animal.

5.3.8.4 Interação da lectina com o polissacarídeo de semente de *Mucuna sloanei*

Para exercer um papel endógeno, as lectinas vegetais precisam encontrar um receptor específico, em quantidade compatível com a sua própria concentração no caso de sementes. Até agora tais receptores não foram ainda caracterizados. Para avaliar se o polissacarídeo de reserva de parede celular (xiloglucana) de *M. sloanei* possa ser um receptor para a sloanina, a interação entre estas macromoléculas foi determinada por cromatografia de afinidade e espectroscopia de fluorescência.

5.3.8.4.1 Cromatografia de afinidade

Para testar a presença de um receptor endógeno da lectina em semente de *M. sloanei*, foram feitos dois tipos de cromatografia de afinidade:

No primeiro tipo a xiloglucana de *Mucuna sloanei* isolada neste trabalho foi reticulada com epícloridrina e usada como matriz de afinidade. Quando o extrato bruto de farinha de sementes de *M. sloanei* foi submetido a cromatografia de afinidade, como descrito em métodos, um perfil típico de lectina foi obtido (Figura 46). Esta interação é claramente uma interação lectina-polissacarídeo já que a proteína pode ser eluída com solução de NaCl 0,15 M contendo galactose 0,2 M. É um comportamento típico de cromatografia de afinidade de lectina.

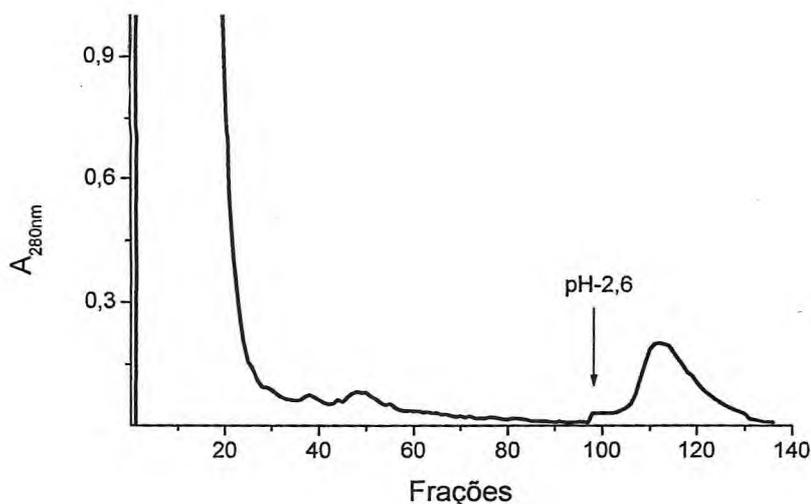


Figura 46 –Cromatografia de afinidade com xiloglucana reticulada de *Mucuna sloanei* da sloanina.

No segundo tipo de cromatografia de afinidade a matriz cromatográfica utilizada foi a sloanina acoplada a sepharose CL-4B e a amostra utilizada foi uma solução de xiloglucana de 2 mg mL^{-1} , nesta cromatografia 160 mg de xiloglucana ficaram retidas em 17 mg de lectina acoplada. Este ensaio demonstra mais uma vez a interação *in vitro* da lectina com o polissacarídeo.

5.3.8.4.2 Espectroscopia de fluorescência

O espectro de fluorescência da sloanina, de diferentes concentrações de lectina variando de 0,283 a 1,35 mM, excitado a 280 nm e monitorado nos comprimentos de onda de 290-450 nm, mostraram um máximo de emissão $\lambda_{\text{max}}^{\text{emiss}}$ de 324 nm, compatíveis com proteínas que tem resíduos de triptofano na molécula.

A interação da sloanina com a xiloglucana de *Mucuna sloanei* também foi evidenciada por espectroscopia de fluorescência de várias amostras na presença e ausência de xiloglucana. O $\lambda_{\text{max}}^{\text{emiss}}$ de diferentes concentrações de lectina foi em 324 nm em concentrações variando de 0,283 a 1,35 mM. Houve um deslocamento para a região do vermelho para o $\lambda_{\text{max}}^{\text{emiss}}$ de sloanina na concentração de 1,84 mM quando esta foi complexada com a xiloglucana (1,25 mM) de 324 para 338 nm, (Figura 47). Este deslocamento no $\lambda_{\text{max}}^{\text{emiss}}$ para o vermelho mostra

RESULTADOS E DISCUSSÃO

uma mudança no ambiente de triptofano, expondo mais este resíduo na estrutura da sloanina quando acontece a ligação com o polissacarídeo. Quando acontece a interação entre a lectina e a xiloglucana de reserva de parede celular, ambos da semente de *M. sloanei*, forma-se um complexo macromolecular que induz a mudança conformacional na estrutura da proteína. Uma supressão do aumento da intensidade de fluorescência foi observada para a sloanina nas concentrações que variam de 0,283 a 1,35 mM na presença de xiloglucana 1,25 mM (figura 48) sugerindo também uma interação entre as duas moléculas.

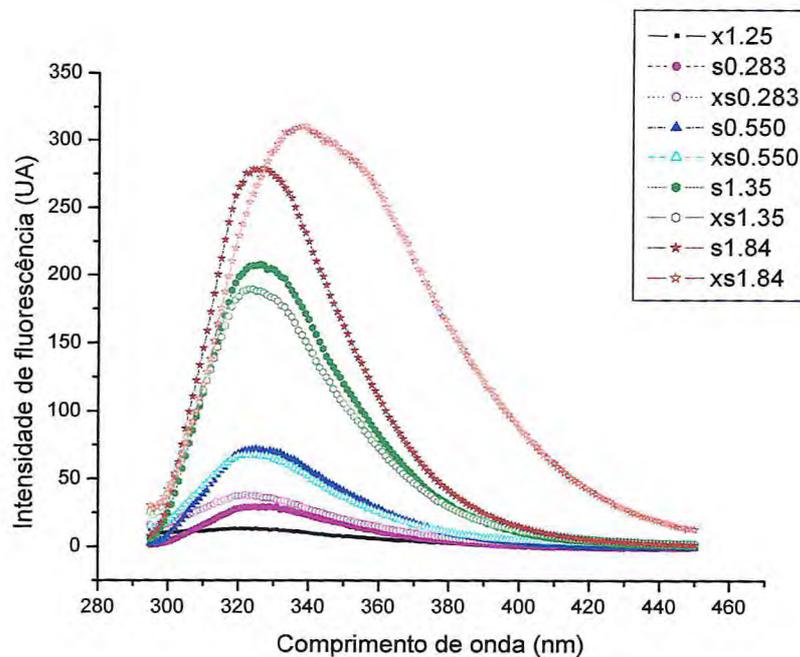


Figura 47 - Espectro de fluorescência de lectina de semente de *Mucuna sloanei* (sloanina) a diferentes concentrações (0,283 to 1,84 mmol L⁻¹) na ausência e presença de xiloglucana de semente de *M. sloanei* (1,25mM. x – xiloglucana, s – sloanina, xs – xiloglucana + sloanina).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

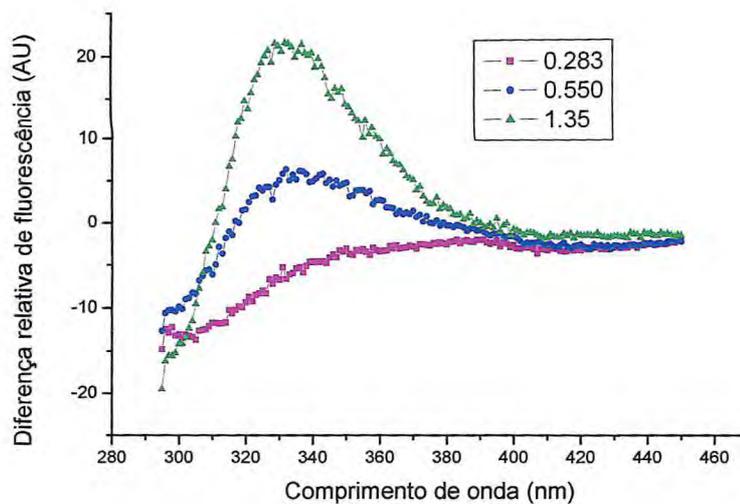


Figura 49 – Diferença relativa de fluorescência de lectina de semente de *Mucuna sloanei* (sloanina) a diferentes concentrações (0,283, 0,550, 1,35 mmol L⁻¹).

CONCLUSÕES

6.0 CONCLUSÕES

Este trabalho foi desenvolvido visando responder às perguntas iniciais, descritas na hipótese do trabalho. Assim:

- Conseguimos mostrar que, apesar do extrato salino de sementes de *Mucuna sloanei* apresentar baixa atividade hemaglutinante, ao submeter o mesmo a uma cromatografia de afinidade em matriz contendo terminais de D-galactose uma lectina foi isolada. Esta lectina mostrou ser capaz de aglutinar hemácias e ser inibida apenas por açúcares contendo tanto α ou β -D-galactose, sendo assim caracterizada como D-galactose ligante.
- Comprovou-se que, na extração aquosa da semente de *Mucuna sloanei* foram extraídos, ao mesmo tempo, uma lectina e um polissacarídeo, que por interagirem especificamente, ocasionavam uma aparente ausência de atividade.
- Através de extração seqüenciada, pode ser comprovada que uma galactoxiloglucana estava presente em cotilédones de semente de *Mucuna sloanei*, possivelmente na parede celular, que após purificação se mostrou capaz de reconhecer especificamente a lectina D-galactose ligante presente na mesma semente.

Assim, pela primeira vez, mostrou-se a existência no mesmo órgão vegetal, de uma lectina e um ligante específico, em concentrações condizentes. Este fato conduz à sugestão de que este ligante específico pode constituir o receptor endógeno da lectina. Mais ainda, podemos sugerir que o par lectina – receptor endógeno deve desempenhar um papel relevante na fisiologia da semente, possivelmente agir, por um lado no controle da exsudação da lectina da semente e por outro na modulação da degradação da parede celular durante a germinação da semente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFOLABI, O. A.; OSHUNTOGUN, B. A.; ADEWUSI, S. R.; FAPOJUWO O. O.; AYORINDE F. O.; GRISSOM F. E.; OKE O. L. Preliminary nutritional and chemical evaluation of raw seeds from *Mucuna-solanei* - an underutilized food source. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, **33** (1), 122-124, 1985.

AGBEDE, J. O.; ALETOR, V. A. Studies of the chemical composition and protein quality evaluation of differently processed *Canavalia ensiformis* and *Mucuna pruriens* seed flours. **Journal of Food Composition and Analysis**, **18** (1), 89-103, 2004.

AGRAWALL, B. B. L., GOLDSTEIN, I. J. Protein carbohydrate interaction. VI. Isolation of Concanavalin A by specific adsorption on cross-linked dextran gels. **Biochimica et Biophysica Acta**, **147**, 262-271, 1967.

AGRAWALL, B. B. L., GOLDSTEIN, I. J. Protein carbohydrate interaction. VII. Physical and chemical studies on Concanavalin A, the hemagglutinin of the jack bean. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, **124**, 218-229, 1968.

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

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

ALLEN, A. K.; NEUBERGUER, A. The purification, composition and specificity of germ agglutinin. **Biochemistry Journal**, **131** 155-162, 1973.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, A. K.; DESAI, N. N.; NEUBERGER, A.; CREETH J. M. Properties of potato lectin and nature of its glycoprotein linkages. **Biochemistry Journal**, **171**, 665-674, 1978.

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

BAHRMAN, N.; THIELLEMENT, H. Parental genome expression in synthetic wheats (*Triticum-turgidum* sp × *T. tauschii* sp) revealed by two-dimensional electrophoresis of seedling proteins. **Theoretical and Applied Genetics** **74** (2), 218-223, 1987.

BAUER W. D.; TALMADGE K. W.; KEEGSTRA, K.; ALBERHEIM, P. Structure of plant cell walls. II. Hemicellulose of walls of suspension-cultured sycamore cells. **Plant Physiology**, **51**, 174-187, 1973.

BLUM, H., BEIER H., GROSS H. J. Improved silver staining of plant-protein RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, **8**(2): 93-99, 1987.

BLUMENKRANTZ, N.; ASBOE-HANSEN, G. New method for quantitative determination of uronic acids. **Analytical Biochemistry**, **54**, 484-489, 1973.

BOLWELL, G. P. Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides. **Trends in Glycoscience and Glycotechnology**, **12**, 143-160, 2000.

BOURQUIM, V.; NISHIKUBO, N.; ABE, H.; BRUMER, H.; DENMAN, S.; EKLUND, M.; CHRISTIEMIN, M.; TEERI, T. T.; SUNDBERG, B.; MELLEROWICZ, E. J. Xyloglucan endotransglycosylases have a function during the formation of secondary cell wall of vascular tissues. **The Plant Cell**, **14**, 3073-3088, 2002.

BOYD, W. C.; SHAPLEIGH, E. Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). **Science**, **119**, 419, 1954.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRUMMELL, D. A.; CAMIRAND, A.; MACLACHLAN, G. A. Differential distribution of xyloglucan glycosyl transferases in pea Golgi dictyosomes and secretory vesicles. **Journal of Cell Science**, **96**, 705-710, 1990.

BRYANT, J. A. **Seed physiology**. Edward Arnold Pty Ltd. South-ampton, Australian, 1985.

BUCHALA, A. J.; GENOUD, T.; ROULIN, S.; SUMMERMATTER, K. Xyloglucans in different types of cotton (*Gossypium* sp) cells, **Acta Botanica Neerlandica** **42** (2), 213-219, 1993.

BUCHANAN, W.; GRUISSEM, R. J. **Biochemistry & Molecular Biology of Plant**, American Society Physiologists, 2000.

BUCKERIDGE M. S.; ROCHA, D. C.; REID, J. S. G.; DIETRICH, S. M. C. Xyloglucan structure and postgerminative metabolism in seeds of *Copaifera-langsdorffii* from savanna and forest populations, **Physiologia Plantarum**, **86**, 145-151, 1992.

BUCKERIDGE, M. S.; CROMBIE, H. J.; MENDES, C. J. M.; REID, J. S. G.; GIDLEY, M. J.; VIEIRA, C. C. J. A new family of oligosaccharides from the xyloglucan of *Hymenaea coubaril* L. (Leguminosae) cotyledons. **Carbohydrate Research**, **303**(2): 233-237, 1997.

BUCKERIDGE, M. S.; REID, J. S. G. Major cell wall storage polysaccharides in legume seeds: Structure, catabolism and biological functions. **Ciência e Cultura, Journal of the Association for the Advancement of Science**, **48** (3), 153-162, 1996.

BUCKERIDGE, M. S.; SANTOS, H. P.; TINÉ, M. A. Mobilisation of storage cell wall polysaccharides in seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, **38** (1/2), 141-156, 2000a.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BUCKERIDGE, M. S.; TINÉ, M. A.; SANTOS, H. P.; LIMA, D. U. Polissacarídeos de reserva de parede celular em sementes. estrutura, metabolismo, funções e aspectos ecológicos. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, **12**, 137-162, 2000b.

BUSATO, A. P.; VARGAS-RECHIA, C. G.; RECHIA, F. Xyloglucan from the leaves of *Hymenaea courbaril*. **Phytochemistry**, **58**, 525-531, 2001.

BUSATO A. P. Xiloglucana fucosilada de folhas de *Hymenaea courbaril* (jatobá). Tese de Doutorado. Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, 153 pp, 2004.

CAMPBELL, P.; BRAAM, J. Xyloglucan endotransglycosylases: diversity of genes, enzymes and potential wall-modifying functions. **Trends in plant science review**, **4** (9), 361-366, 1999.

CARPITA, N. C.; GIBEAUT, D. M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **Plant Journal**, **3**, 1-30, 1993.

CARPITA, N.; McCANN M. **The Cell Wall**. In: BUCHANAN, W.; GRUISSEM, R. J. **Biochemistry & Molecular Biology of Plant**, American Society Physiologists, 2000.

CAVADA, B. S.; SANTOS, C. F.; GRANGEIRO, T. B.; NUNES, E. P.; SALES, P. V. P.; RAMOS, R. L.; DE SOUSA, F. A. M.; CRISOSTOMO, C. V.; CALVETE, J. J. Purification and characterization of a lectin from seeds of *Vatairea macrocarpa* Duke **Phytochemistry**, **49** (3), 675-680, 1998.

CHAMBAT, G.; BARNOUD, F.; JOSELAU, J P. Structure of the primary cell walls of suspension – cultured *Rose glauca* cells. I. Polysaccharides associated with cellulose. **Plant Physiology**, **74**, 687-693, 1984.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHRISPEELS, M. J.; RAIKHEL, N. V. Lectins, lectins genes and their role on plant defence. **Plant Cell**, **13** (1), 1-9, 1991.

CIUCANU, I; KEREK, F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. **Carbohydrate Research** , **131** (2), 209-217, 1984.

COSGROVE, D. J. Expansive growth of plant cell walls. **Plant Physiology Biochemistry**, **38**, 109-2000.

CROMBIE, H. J.; CHENGAPPA, S.; HELLYER, A.; REID, J. S. G. A xyloglucan oligosaccharide-active, transglycosilating β -D-glucosidase from the cotyledons of nasturtium (*Tropaeolum majus* L.) seedlings-purification, properties and characterization of a cDNA clone. **Plant Journal** **15**, 27-38, 1998.

DARVILL, A.; McNEIL, M.; ALBERSHEIM, P.; DELMER, D. P. The primary walls of flowering plants. In: Tolbert NE, ed. **The biochemistry of plants**. New York: Academic Press, 91-162, 1980 citado por McNeil, 1984.

DARVILL, A.G.; AUGUR, C.; BERGMANN, C.; CARLSON, R. W.; CHEONG, J.J.; EBERHARD, S.; HAHN, M. G.; LÓ, V. M.; MARFÁ, V.; MEYER, B.; MOHNEN, D.; O'NEIL, M. A.; SPIRO, M.D.; van HALBEEK, H.; YORK, W. S.; ALBERSHEIM, P. Oligosaccharins-oligosaccharides that regulate growth, development and defence responses in plants. **Glycobiology**, **2** (3): 181-198, 1992.

DATTA, P. K; FIGUEROA, M. O. R.; LAJOLO, F. M. Chemical modification and sugar binding-properties of two major lectins from pinhao (*Araucaria brasiliensis*) seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **4111**, 1851-1855, 1993.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DING, K.; FANG, J. N.; DONG, T. X.; TSIM, K. W. K.; WU, H. M. Characterization of a rhamnogalacturonan and a xyloglucan from *Nerium indicum* and their activities on PC12 pheochromocytoma cells **Journal of Natural Products**, **66** (1): 7-10, 2003.

DRICKMER, K. Multiplicity of lectin carbohydrate interactions. **Nature Structural Biology**, **2** (6), 437-439, 1995.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, **28** (3), 350-356, 1956.

EDA, S.; KATO, K. An arabinoxyloglucan isolated from the midrib of the leaves of *Nicotiana tabacum* (tobacco). **Agricultural and Biological Chemistry**, **42**, 351–357, 1978.

EDWARDS, M.; BOWMAN, Y. J. L.; DEA, I. C. M.; REID, J. S. G. A β -D-galactosidase from nasturtium (*Tropaeolum-majus* l) cotyledons - purification, properties, and demonstration that xyloglucan is the natural substrate. **Journal of Biological Chemistry** **263** (9), 4333-4337, 1988.

EDWARDS, M.; DEA, I. C. M.; BULPIN, P. V.; REID, J. S. G. Purification and properties of a novel xyloglucan-specific endo-(1-4)- β -D-glucanase from germinated nasturtium seeds (*Tropaeolum-Majus* l). **Journal of Biological Chemistry**. **261** (20), 9489-9494, 1986.

EDWARDS, M.; DEA, I. C. M.; BULPIN, P. V.; REID, J. S. G. Xyloglucan (amyloid) mobilisation in the cotyledons of *Tropaeolum majus* L. seeds following germination, **Planta**, **163**, 133–140, 1985.

EINHOFF, W.; FLEIISCHMANN, G.; FREIER, T.; KUMMER, H.; REDIGUER, H. Interaction of leguminous seed lectins with seed proteins-lectins as packing aids of storage

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

proteins. In: DRIESSCHEE, V.; BOG-HANSEN, T. C., Eds. **Lectins: Biol., Biochem., Clinical Biochem.** 5:45-52, 1986, citado por Ramos, 2002.

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

FANUTTI, C.; GIDLEY, M. J.; REID, J. S. G. A xyloglucan-oligosaccharide-specific alpha-D-xylosidase or exo-oligoxyloglucan-alpha-xylohydrolase from germinated nasturtium (*Tropaeolum-majus* l) seeds - purification, properties and its interaction with a xyloglucan-specific endo-(1-4)-beta-d-glucanase and other hydrolases during storage-xyloglucan mobilization. **Planta**, **184** (1): 137-147 1991.

FANUTTI, C.; GIDLEY, M. J.; REID, J. S. G. Action of a pure xyloglucan endo-transglycosylase (formerly called xyloglucan-specific endo-(1-4)-β-D-glucanase) from the cotyledons of germinated nasturtium seeds. **Plant Journal**, **3** (5), 691-700, 1993.

FREITAS, R. A.; GORIN, P. A. J.; NEVES, J. SIERAKOWSKI, M. R. A rheological description of mixtures of galactoxyloglucan with high amylose and waxy corn starches. **Carbohydrate Polymers**, **51**, 25-32, 2003.

FRY, S.C.; YORK, W. S.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A.; HAYASHI, T.; JOSELEAU, J. P.; KATO, Y.; LORENCES, E. P.; MacLACHLAN, G. A.; McNEIL, M.; MORT, A.; REID, J. S. G.; SEITZ, H. U.; SELVENDRAN, R. R.; VORAGEN, A. G.,J.; WHITE, A. R. An unambiguous nomenclature for xyloglucan-derived oligosaccharides. **Physiol. Plant**, **89**: 1-3, 1993.

FRY, S. C. Primary cell wall metabolism: tracking the careers of wall polymers in living plant cells. **New Phytologist** **161**, 641-675, 2003.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

GAILLARD, B. D. E.; THOMPSON, N. S.; MORAK, A. J. The interaction of polysaccharides with iodine. Investigation of the general nature of the reaction. **Carbohydrate Research**, **11**, 509-519, 1969.

GAILLARD, B.D.E. Separation of linear from branched polysaccharides by precipitation as iodine complexes. **Nature**, **191**, 1295-1296, 1961.

GANSERA, R.; SCHURZ, H.; RUDIGER, H. Lectin-associated proteins from the seeds of Leguminosae **Hoppe-Seylers Zeitschrift Fur Physiologische Chemie**, **360** (11), 1579-85, 1979.

GEBAUER, G.; SCHILTZ, E.; SCHIMPL, A.; RUDIGER, H. Purification and characterization of a mitogenic lectin and a lectin-binding protein from *Vicia-sativa*. **Hoppe-seylers zeitschrift fur physiologische chemie** **360** (12), 1727-1735; 1979, citado por Ramos, 2002

GERS-BARLAG, H.; SCHECHER, G.; KUMAR, N. S.; RUDIGER, H. Protein body membranes as binding partners of lectins. In: Van Driessche E, Franz H, Beeckmans S, Pfuller U, Kallikorm A, Bog-Hansen TC (eds.), **Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry** v. 8, pp.97-100. Textop, Hellerup (Denmark) (1993), citado por Ramos, 2002.

GIBEAUT, D. M.; CARPITA, N. C. Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides. **The FASEB**, **8**, 904-915, 1994.

GOFF, A. L. E; RENARD, C. M. G. C.; BONNIN, E.; THIBAUT, J. F. Extraction, purification and chemical characterization of xylogalacturonans from pea hulls 325-334, 2001.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

GOLDSTEIN, I. J.; HOLLERMAN, C. E.; MERRICK, J. M. Protein-carbohydrate interaction I Interaction of polysaccharides with concanavalin A. **Biochimica et Biophysica Acta**, 97 (1) 68-& (1965).

GORDON, R.; MACLACHLAN, G Incorporation of UCP-[14C]glucose into xuloglucan by pea membranes. **Plant physiology** 91, 373-378, 1989.

GUZMÁN-PARTIDA, A. M.; ROBLES-BURGUENO, M. R.; ORTEGA-NIEBLAS. M.; VÁZQUEZ-MORENO, I. Purification and characterization of complex carbohydrate specific isolectins from wild legume seeds: *Acacia constricta* is (vinorama) highly homologous to *Phaseolus vulgaris* lectins. **Biochimie**, 86, 335–342, 2004.

HANSEL, A.; BRUMMEL, D. A., HANNA, R. MacLACHLAN, G. Auxin-dependent breakdown of xyloglucan in cotyledons of germinating nasturtium seeds. **Planta**, 183, 369-381, 1991.

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

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

HEINRICHER, E. **Zur Biologie der gattung *Impatiens***. *Flora Jena* 71 (1888) citado por Buckeridge, 2000.

HILLER, A.; PLAZIN, J.; Van-SLYKE, B. A. A study of conditions for Kjeldahl determination of nitrogen in protein. **Journal of Biological Chemistry**, 176, 1401-1420, 1948.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

HONSON, T. Regulation of polysaccharide breakdown during auxin-induced cell wall loosening. **Journal of Plant Research**, **106**, 1993.

HONSON, T.; MASUDA, Y. Inhibition of auxin-induced elongation and xyloglucan breakdown in azuki-bean epicotyl segments by fucose-binding lectins. **Physiologia plantarum** **82** (1), 41-47, 1991.

IGARTUBURU, J. M.; PANDO, E.; RODRIGUEZ LUIS, F.; GIL-SERRANO, A. The Structure of a Hemicellulose A Fraction (HA-1) in Dietary Fiber from the Seed of Grape Variety Palomino (*Vitis vinifera* cv. Palomino). **Journal of Natural Products**, **61**, 876-880, 1998.

ISHII, T. Structure and functions of feruloylated polysaccharides. **Plant Science**, **127** (2), 111-127, 1997.

JOCELYN, K. C.; ROSE, M. S.; CATALA, C. The plot thickens: new perspectives of primary cell wall Modification. **Current Opinion in Plant Biology**, **7**, 296-301, 2004.

JOSELAU, J. P.; CHAMBAT G. Structure of the primary cell walls of suspension-cultured *rosa glauca* cell II Multiple forms of xyloglucan. **Plant Physiology**, **74**, 694-700, 1984.

KAKURAKOVÁ, M.; CAPEK, P.; SASINKOVÁ, V.; WELLNERL, N.; EBRINGEROVÁ, A. FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses. **Carbohydrate Polymer**, **43**, 195-203, 2000.

KAKURAKOVÁ, M.; SMITH, A. C.; GIDLEY, M. J.; WILSON, R. H. Molecular interactions in bacterial cellulose composites studied by 1D FT-IR and dynamic 2D FT-IR spectroscopy. **Carbohydrate Research**, **337**, 1145-1153, 2002.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

KOOIMAN P. On the occurrence of amyloids in plant seeds. *Acta Botanica Neerlandica*, 9, 208-219, 1960 citado por Buckeridge, 2000.

KOOIMAN, P. The constitution of Tamarindus amyloid. *Recueil des travaux chimiques des pays-bas-journal of the royal-netherlands chemical society*, 80 (8) 849-865, 1961 citado por Buckeridge, 2000.

KOOIMAN, P. The constitution of the amyloid from seeds of *Amona muricata*. *Phytochemistry*, 6, 1665-1673, 1967 citado por Buckeridge, 2000.

KONOZY, E. H. E.; BERNARDES, E. S.; ROSA, C.; FACA, V.; GREENCE, L. J.; WARD, R. J. Isolation, purification, and physicochemical characterization of a D-galactose binding lectin from seeds of *Erythrina speciosa*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 410, 222-229, 2003.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural protein during the assembly of the Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685, 1970.

LAM, T. B. T.; IYAMA, K. STONE, B. A. An approach to the estimation of ferulic acid bridges in unfractionated cell-walls of wheat internodes. *Phytochemistry*, 37 (2): 327-333, 1994.

LANG, P.; MASCI, G.; DENTINI, M.; CRESCENZI, V.; COOKE, D.; GIDLEY, M. J.; FANUTTI, C.; REID, J. S. G. Tamarind seed polysaccharide preparation characterisation and solution properties of carboxylated sulphated and alkylaminated derivatives. *Carbohydrate Polymer*, 17(3): 185-198 (1992).

LIENER, I. E.; SHARON, N.; GOLDSTEIN, I. J. *The Lectins. Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine*. Academic Press. New York, 600 p., 1986.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

LIMA, D. U.; LOH, W.; BUCKERIDGE, M. S.; Xyloglucan-cellulose interaction depends on the sidechains and molecular weight of xyloglucan. **Plant Physiology and Biochemistry**, **42**, 389-394, 2004.

LIMA, N. N.; REICHER, F.; CORREA, J. B.; GANTER, J. L. M. S.; SIERAKOWSKI, M. R. Partial structure of a xyloglucan from the seeds of *Hymenaea courbaril* var. *Stilbocarpa* (jatobá). **Ciencia Cultura** **45**: 22-26, 1993.

LIS, H.; SHARON, N. Lectins: Carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. **Chemical Reviews**, **98**, 637-674, 1998.

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

MACHUKA, J. Characterization of the seed proteins of velvet bean (*Mucuna pruriens*) from Nigeria. **Food Chemistry**, **68**, 421-427, 2000.

MACHUKA, J. S.; OKEOLA, O. G., ELS, J. M. V. D., CHRISPPEELS, M. J., VAN LEUVEN, F, PEUMANS WJ. Isolation and partial characterisation of galactose-specific lectins from African yam beans, *Sphenostyles stenocarpa* Harms. **Phytochemistry**, **51**(6), 721-728, 1999.

MARINKOVICH, V. A. Purification and characterization of the hemagglutinin present in potatoes. **Journal of Immunology**, **93**, 732-741, 1964.

McDOUGALL, G. J.; FRY, S. C., Xyloglucan oligosaccharides promote growth and activate cellulase: evidence for a role of cellulase in cell expansion. **Plant Physiology**, **93**, 1042-1048, 1990.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

McNEIL, M.; DARVILL, A.G.; FRY, S. C., Structure and function of the primary cell walls of plants. **Annual Review of Biochemistry**, **53**, 625-663, 1984.

MEIER H.; REID, J. S. G. **Reserve polysaccharides other than starch in higher plants**, Encyclopedia of Plant Physiology, New Series 13A, Plant Carbohydrates 1 (F. A. Loewus and W. Tanner, eds), Springer-Verlag, Berlin, 1982, p. 418. Citado por Buckeridge, 1996.

MO H.Q.; I. J. GOLDSTEIN, Isolation and characterization of a Forssman antigen-binding lectin from velvet bean (*Mucuna-derringtoniana*) seeds, **Glycoconjugate**, **11**, 424-431, 1994.

MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O. Caracterização estrutural de 3 lectinas apresentando especificidade por açúcar distintas, isoladas de sementes de Fruta-Pão (*Artocarpus incisa*). **Tese de Doutorado**. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará Fortaleza, 2002.

MOREIRA, R. A., Lectinas vegetais: uma abordagem química e físico-química. **Tese de Titular**. Universidade Federal do Ceará, 600p, 1998.

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

MOREIRA, R. A.; CORDEIRO, E. F.; RAMOS, M. V.; GRANGEIRO, T. B.; MARTINS, J. L., OLIVEIRA, J. T. A.; CAVADA, B. S. Isolation and partial characterization of a lectin from seeds of *Dioclea violacea*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, **8**, 23-29, 1996.

MOREIRA, R.A.; BARROS, A. C. H.; STEWART, J. C.; PUSZTAI, A. Isolation and characterization of a lectin from the seeds of *Dioclea grandiflora* (mart.), **Planta** **158**, 63-69, 1983.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

NEUMANN, D.; LEHR, C. M., LENHOF, H. P.; KOHLBACHER, O. Computational modeling of the sugar-lectin interaction. **Advanced Drug Delivery Reviews**, **56** (4): 437-457, 2004.

NISHITANI, K.; NEVINS, D. J. Glucuronoxylan Xylanohydrolase - A unique xylanase with the requirement for appendant glucuronosyl units. **Journal of Biological Chemistry**, **266** (10), 6539-6543, 1991

OCHIENG, J.; GREEN, B.; SHAWNDA, E.; JAMES, O.; WARFIELD, P. Modulation of the biological functions of galectin-3 by matrix metalloproteinases. **Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects**, **1379**, 97-106, 1998.

OKIGBO, M. C., **Cropping and Related Research in Africa**. AAASA Occasional Publications Series, OTI, 22-23, 1978. Citado por AJIWE, 1996.

OLIVEIRA, J. T. A.; CAVADA, B. S.; MOREIRA, R. A. Isolation and partial characterization of a lectin from *Cratylia floribunda* Mart. Seeds. **Revista Brasileira de Botânica**. **14**, 63-68, 1991.

OLIVEIRA, J. T. A.; MELO, V. M. M; CÂMARA M.F.L. VASCONCELOS, I. M.; BELTRAMINI, L. M.; MACHADOD, O. L.T.; GOMES, V. M., PEREIRA, SILVANO P. ; FERNANDES, C. F.; NUNES, E. P. CAPISTRANO, G. G.G.. MONTEIRO-MOREIRA, A. C.O. Purification and physicochemical characterization of a cotyledonary lectin from *Luetzelburgia auriculata*. **Phytochemistry**, **61**, 301–310, 2002.

ONWELUZO, J. C.; RAMESH, H. P.; THARANATHAN, R. N. Characterization of free sugars and xyloglucan-type polysaccharides of two tropical legumes. **Carbohydrate Polymers**, **47**, 256-257, 2002.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

PEÑA, M. J.; RYDEN, P.; MADSON, M.; SMITH, A.C.; CARPITA, N. C. The Galactose Residues of Xyloglucan Are Essential to Maintain Mechanical Strength of the Primary Cell Walls in Arabidopsis during. **Plant Physiology**, **134**, 443–451, 2004.

PEREZ, G. Isolation and characterization of a novel lectin from *Dioclea lehmanni* (Fabaceae) seeds. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, **30** (7): 843-853, 1998.

PEREZ, G. HERNANDEZ M., MORA, E. Isolation and characterization of a lectin from seeds of *Dioclea lehmanni*. **Phytochemistry**, **29**, 1745-1749, 1990.

PERRIM, R. M.; DEROCHE, A. E.; BAR-PELED, M.; ZENG, W.; NORAMBUENA, L.; ORELLANA, A.; RAIKHEL, N.; KEEGSTRA, K. Xyloglucan Fucosyltransferase, an Enzyme involved in plant cell wall biosynthesis. **Science**, **284**, 1999.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Plant lectins: specific tools for the identification, isolation, and characterization of O-linked glycans. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, **33** (3): 209-258, 1998.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Lectin as plant defence proteins. **Plant Physiology**, **109**, 347-352, 1995.

PILLING, E.; HO, F.T.E., H. 2003 Feedback from the wall. **Current Opinion in Plant Biology**, **6**, 611–616, 2003.

POLHILL, R. M.; RAVEN, P. H.; STIRTON, C. H. Evolution and systematics of the *Leguminosae*. In POLHILL, R. M.; RAVEN, P.H. Eds.: **Advances in Legume Systematics**. Parte I, Richmond, England, 425 pp., 1981.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- PROSEUS, T. E.; ORTEGA, J. K. E.; BOYER, J. S. Separating growth from elastic deformation during cell enlargement. **Plant Physiol.**, **119**, 775-784, 1999.
- RAMOS, M. V.; BOMFIM, L. R.; BANDEIRA, G. P.; DEBRAY, H. Evidence of an endogenous lectin receptor in seeds of the legume *Cratylia floribunda*. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, **14**, 3, 1998.
- RAMOS, M. V.; CAVADA, B. S.; MAZARD, A.; ROUGÉ, P. Interaction of Diocleinae lectins with Glycoproteins based in surface plasmon resonance, **Memorial do Instituto Oswaldo Cruz**, **97**, 275-279, 2002.
- REID J.S.G., Cell-wall storage carbohydrates in seeds - biochemistry of the seed gums and hemicelluloses, **Advances in Botanical Research**, **11**, 125-155, 1985.
- REID J.S.G.; EDWARDS M., **Galactomannans and other cell wall storage polysaccharides in seeds**, in: Stephen M.A. (Ed.), **Food Polysaccharides and their Applications**, 155–186, 1995.
- REID, J. S. G.; BEWLEY, J. D. A dual role for the endosperm and its galactomannan reserves in the germinative physiology of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) an endospermic legume seed. **Planta**, **147**, 145-150, 1979.
- REIS D.; VIAN, B.; VIAN, D.; DARZENS, ROLAND, J. C. Sequential patterns of intramural digestion of galactoxyloglucan in tamarind seedlings. **Planta**, **170**, 60-73, 1987.
- REISS R., **Über die Natur der Reservecellulose und über ihre Auflösungsweise bei der Keimung der Samen**, *Landwirtsch Jahrb.* 18 (1889) 711–765 citado por Buckeridge, 2000.
- REITER, W. Biosynthesis and properties of the plant cell wall. **Current Opinion in Plant Biology**, **5**, 536–542, 2002.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

RUDIGER, H.; SCHERCHER The protein body membrane of soybean seeds as a possible lectin-binding component. In: Van Driessche E, Franz H, Beeckmans S, Pfuller U, Kallikorm A, Bog-Hansen TC (eds) *Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry* v. 8, pp.101-104. Textop, Hellerup (Denmark), 1993, citado por Ramos, 1998.

RUPEREZ, P.; SELVENDRAN, R. R.; STEVENS, B. J. H. Investigation of the heterogeneity of xyloglucans from the cell walls of apple. *Carbohydrate Research*, **142**, 107–113, 1985.

SANTOS, H. P.; PURGATTO, E.; MERCIER, H.; SILVEIRA, M. B. The Control of Storage Xyloglucan Mobilization in cotyledons of *Hymenaea courbaril*. *Plant Physiology*, **135**, 287–299, 2004.

SCHERCHER, G.; RUDIGER, H. Interaction of the soybean (*Glycine max*) seed lectin with components of the soybean protein body membrane. *Biological Chemistry* **375**, 829-232, 1994.

SHARON, N. Lectin-carbohydrate complexes of plants and animals: an atomic view. *Trends in Biochemistry Science*, **18**, 221–226, 1993.

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

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

SHIBUYA, N.; MISAKI, A. Structure of hemicellulose isolated from rice endosperm cell-wall: mode of linkage and sequences in xyloglucan, glucan and arabinoxylan. *Agriculture and Biological Chemistry*, **42**, 2267-2274, 1978.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- SHPIGEL, E.; ROIZ, L.; GOREN, R.; SHOSEYOV, O. Bacterial cellulose-bin domain modulates in vitro elongation of different plant cells. **Plant Physiology**, **117**, 1185-1194, 1998.
- SIDDHURAJU, P.; VIJAYAKUMARI, K.; JANARDHANAN, K. Chemical composition and protein quality of the little-known legume, velvet bean (*Mucuna pruriens* (L) DC). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, **44**, (9), 2636-264, 1996.
- SIDDIQUI, I. R.; WOOD, P. J. Structural investigation of water soluble rapeseed (*Brassica campestris*) polysaccharides I. Rapeseed amyloid. **Carbohydrate Research**, **17**, 97-108, 1971.
- SIMS, I. M.; BACIC, A. Extracellular polysaccharides from suspension cultures of *Nicotiana plumbaginifolia*. **Phytochemistry**, **38**, 1397-1405, 1995.
- SIMS, I. M.; MUNRO, S. L. A.; CURRIE, G.; CRAIK, D.; BACIC, A. Structural characterisation of xyloglucan secreted by suspension-cultured cells of *Nicotiana plumbaginifolia*. **Carbohydrate Research** **293** (2) 147-172, 1996.
- SIMSON, B. W.; TIMELL, T. E. Polysaccharides in cambial tissues of *Populus trmuloides* and *Tilia americana*. II. Isolation and structure of a xyloglucan. 51-62, 1978.
- SOMERVILLE, C.; BAUER, S.; BRININSTOOL, G.; FACETTE, M.; HAMANN, T.; MILNE, J.; OSBORNE, E.; PAREDEZ, A.; PERSSON, S.; RAAB, T.; VORWERK, S. YOUNGS. H. Toward a Systems Approach to Understanding Plant Cell Walls. **Science**, **306** (5705), 2206-2211, 2004.
- SREERAMA, N., WOODY, R. W. A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism, **Analytical Biochemistry**, **209**, 32-44, 1993.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

STILLMARK, H., (1888). Über ricin, ein giftiges ferment aus den samen von *Ricinus communis*. L. und einige anderen euphorbiaceen. **Inaugural Dissertation Dorpat, Tartu**, citado por Peumans & Van Damme, 1998.

SUISHA, F.; KAWASAKI, N.; MIYAZAKI, S.; SHIRAKAWA, M.; YAMATOYA, K.; SASAKI, M.; ATTWOOD, D. Xyloglucan gels as sustained release vehicles for the intraperitoneal administration of mytomyacin C. **International Journal of Pharmacia**, **172**, 27-32, 1998.

SULTAN, N. A. M.; KENOTH, R; SWAMY, M. J. Purification, physicochemical characterization, saccharide specificity, and chemical modification of a Gal/GalNAc specific lectin from the seeds of *Trichosanthes dioica*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, **432**, 212–221, 2004.

TAKAHASHI, A.; SUZUKI, S.; KAWASAKI, N.; KUBO, W.; NMIYAZAKI, S.; LOEBENBERG, R; BACHYNSKY, J.; ATTWOOD, D. Percutaneous absorption of non-steroidal anti-inflammatory drugs from in situ gelling xyloglucan formulations in rats. **International Journal of Pharmacia**, **246**, 179, 2002.

TAVARES, R. O. Galactomana de *Adenanthera pavonina* L. Aplicação para o Isolamento de Lectinas Galactose-Específicas. **Dissertação de Mestrado**. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 95 pp. 1998.

TINÉ, M. A. S.; CORTELAZZO, A. L.; BUCKERIDGE, M. S. Xyloglucan mobilisation in cotyledons of developing plantlets of *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae-Caesalpinoideae). **Plant Science**, **154**, 117-126, 2000.

UDEDIBIE, A. B. I; CARLINI, C. R.. Brazilian *Mucuna pruriens* seeds (velvet bean) lack hemagglutinating activity. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, **46** (4), 1450-1452, 1998.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VAN DAMME, E. J. M.; BARRE, A.; ROUGE, P.; VAN LEUVEN, F.; PEUMANS, W. J. The NeuAc(α -2,6)-Gal/GalNAc-binding lectin from elderberry (*Sambucus nigra*) bark, a type 2 ribosome-inactivating protein with unusual specificity and structure. **European Journal of Biochemistry**, **235**,128-137, 1996.

VAN DAMME, E. J. M.; PEUMANS, W. J. PUSZTAI, A.; BARDACZ, S. Hand book of Plant Lectins: Properties and Biochemical Applications. 452 pp., 1998.

VAN PARIJS, J.; BROEKAERT, W. F.; GOLDSTEIN, I. J.; PEUMANS, W. J. Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. **Planta**, **183**: 258-262, 1991. citado por Peumans & Van Damme, 1998.

VARGAS-RECHIA, C.; REICHER, F.; SIERAKOWSKI, M. R.; HEYRAUD, A.; DRIGUEZ, H.; LIÉNART, Y. Xyloglucan octasaccharide XXLGol derived from the seeds of *Hymenaea courbaril* acts as a signalling molecule. **Plant Physiology**, **116**, 1013-1021, 1998.

VASCONCELOS, I. M.; OLIVEIRA, J. T. A. Antinutritional properties of plant lectins. **Toxicon**, **44** (4), 385-403, 2004.

VIERHUIS, E.; SCHOLS, H. A.; BELDMAN, G.; VORAGEN, A. G. J. Structural characterisation of xyloglucan and xylans present in olive fruit (*Olea europaea* cv koroneiki), **Carbohydrate Polymers** **51**, 135-148, 2001.

VINCKEN, J-P.; WIJSMAN, A. J. M.; BELDMAN, G.; NIESSEN, W. M. A.; VORAGEN, A. G. J. Potato xyloglucan is built from XXGGtype subunits. **Carbohydrate Research**, **288**, 219-232, 1996.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

WANG, Q.; ELLIS, P. R.; ROSS-MORPHY, S. B.; REID, J. S. G. A new polysaccharide from a traditional Nigerian plant food: *Detarium senegalense* gmelin, **Carbohydrate Research** **284**, 229-239, 1996.

WANG, Q.; ELLIS, P. R.; ROSS-MURPHY, S. B.; BURCHARD, W. Solution characteristics of the xyloglucan extracted from *Detarium senegalense* melin. **Carbohydrate Polymer**, **33**, 115-124, 1997.

WATT, D. K.; BRASCH, D. J.; LARSEN, D. S.; MELTON, L. D. Isolation, characterisation, and NMR study of xyloglucan from enzymatically depectinised and non-depectinised apple pomace. **Carbohydrate Polymers** **39**, (2), 165-180, 1999.

WENZEL, M.; RUDIGER, H. Interaction of pea (*Pisum sativum*) lectin with pea storage proteins. **Journal of Plant Physiology** **145**, 191-194, 1995.

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

WILLATS, W. G. T., MCCARTNEY, L., KNOX, J. P. In-situ analysis of pectic polysaccharides in seed mucilage and at the root surface of *Arabidopsis thaliana*. **Planta**, **213** (1), 37-44, 2001.

WYATT, P. J. Light scattering and the absolute characterization of macromolecules. **Analytica Chimica Acta**, **272**, 1-40, 1993.

YOKOYAMA, R.; NISHITANI, K. Genomic basis for cell-wall diversity in plants. A comparative approach to gene families in rice and *Arabidopsis*. **Plant and Cell Physiology** **45** (9), 1111-1121, 2004.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

YORK, W. S., KOLLI, V. S. K., ORLANDO, R., ALBERSHEIM, P., & DARVILL, A. G. The structures of arabinoxyloglucans produced by solanaceous plants. **Carbohydrate Research**, **285**, 99–128, 1996.

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