

ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE BIOLÓGICA  
DA LECTINA DA FRAÇÃO DAS ALBUMINAS DE SEMENTES DE *Acacia*  
*farnesiana* (L) Willd. (LEGUMINOSAE – MIMOSOIDEAE).

TATIANE SANTI GADELHA

TESE APRESENTADA À COORDENAÇÃO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM BIOQUÍMICA COMO REQUISITO PARCIAL PARA A OBTENÇÃO DO  
TÍTULO DE DOUTOR EM BIOQUÍMICA PELA UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
CEARÁ.

FORTALEZA, 2005.

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

ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE BIOLÓGICA  
DA LECTINA DA FRAÇÃO DAS ALBUMINAS DE SEMENTES DE *Acacia*  
*farnesiana* (LEGUMINOSEAE – MIMOSOIDAE)

Tese apresentada à coordenação do curso  
de Pós-Graduação em Bioquímica como  
requisito parcial para a obtenção do grau  
de Doutor em Bioquímica pela  
Universidade Federal do Ceará

FORTALEZA, 2005

G12i

Gadelha, Tatiane Santi

Isolamento, purificação, caracterização e atividade biológica da lectina da fração das albuminas de sementes de *Acacia farnesiana* (L) Willd. (Leguminosae - Mimosoideae / Tatiane Santi Gadelha. 102 f.: il., color. enc.

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

Orientador: Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada  
Área de concentração: Bioquímica

1. Lectinas – Purificação e atividades biológicas
2. *Acacia farnesiana* I. Cavada, Benildo Sousa II. Universidade Federal do Ceará, Pós-graduação em Bioquímica III.

CDD 574.192  
CDU 678.562

Esta Tese foi apresentada à coordenação do curso de Pós-graduação em Bioquímica como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em bioquímica pela Universidade Federal do Ceará e encontra-se disponível a todos os interessados na Biblioteca Central desta Universidade.

É permitida a transcrição desta Tese, desde que seja feita de acordo com as normas ética científica.

Tatiane Santi Gadelha

Tese aprovada em 24 / 02 / 2005.

Professor Dr. Beníldo Sousa Cavada  
Orientador de Tese  
Presidente

Professor Dr. Jorge Luiz Martins  
UFPEL/Conselheiro

Professor Dr. Marcos Hikari Toyama  
UNESP/Conselheiro

Professora Dra. Cláudia Ferreira Santos  
UECE/Conselheira

Professora Dra. Ana Maria Sampaio Assreuy  
UECE/Conselheira

A DEUS pela dádiva da vida.

Aos meus pais e irmãos por me ensinar a lutar e não  
desistir do que realmente desejamos.

A Carlos Alberto e a minha filha querida Ana  
Carolina, pela imensa paciência e amor.

Dedico

**Que as desilusões não destruam os sonhos,  
Que os obstáculos não impeçam a caminhada,  
Que as barreiras nos impulsionem para a luta,  
Porque, acima de tudo, é preciso acreditar.**

**Não tenhas medo de cair, mas coragem o  
suficiente para levantar e continuar a lutar.**

**As grandes mentes discutem idéias, as medianas  
os acontecimentos e as pequenas as pessoas.**

**Autor desconhecido**

## AGRADECIMENTO

Nesses quatro anos muitos caminhos foram trilhados alguns difíceis outros extremamente gratificantes, porém todos eles proporcionaram uma nova forma de aprender e ver a vida. Nesta nova etapa também encontrei muitas pessoas a quem devo o meu profundo respeito e admiração, por outro lado também encontrei muitas pessoas com espírito anti-científico, anti-ético e anti-qualquer coisa que leve o ser humano a desenvolver sua capacidade de ser um ser HUMANO. Mas a eles também agradeço por desenvolver em mim a capacidade de conviver e principalmente sobreviver às adversidades.

Professor Doutor Benildo Sousa Cavada, é difícil agradecer por que palavras faltam para expressar a imensa gratidão e admiração que tenho. Mas como necessárias são, deixo aqui este breve e resumido agradecimento: pela orientação, pela amizade e por seu incansável e ilimitado entusiasmo com que se dedica aos seus orientandos e principalmente pela oportunidade que tem me dado de crescer profissionalmente.

Aos Professores Dr. Marcos H. Toyama, Jorge Luiz Martins e as Professoras Dra. Ana Maria Assreuy e Dra. Claudia Ferreira Santos, pela valorosa contribuição na correção e sugestões feitas nesta tese.

Ao caríssimo Professor Dr. Marcos H. Toyama, Professora Dra. Daniele Toyama, Professora Dra. Ana Maria Assreuy e ao Professor Dr. Henry Debray pela valiosa contribuição na realização e êxito do trabalho.

Ao Professor Dr. Vicente de Paulo Teixeira Pinto, Celso Shiniti Nagano, Mario Mota, Emmanuel Prata, Rolando Rivas Castellón, Cecília Carvalho de Oliveria e Karoline Sabóia Aragão, meus sinceros agradecimentos, pois sem a contribuição de cada um de vocês este trabalho não seria tão gratificante.

Aos queridos amigos do BioMol-Lab, Taianá Maia de Oliveira, Gustavo Arruda, Victor Carneiro, Lucas Lima, Kyria Santiago Nascimento, Plínio Dellatorre, Bruno Andeson Matias da Rocha, Edson Teixeira, Raquel Benevides, Lia, Batista Cajazeiras, Luciana Mello, Dárcio Ítalo Teixeira, Eudismar, Georg Vasconcelos, Emmanuel Marinho, Rolando Castellón, Emmanuel Prata, Beatriz Tupinambá, Luciano Pinto, Daniel

Bezerra, Frederico Moreno, Nivea Maria Macedo e todos os demais estudantes do BioMol-Lab que contribuíram durante esta caminhada e a quem tenho um imenso carinho.

A Dra. Professora Silvana Saker Sampaio e ao Dr. Alexandre Sampaio pela grande presença de espírito e pela amizade e colaboração na realização deste trabalho.

A Renato Izidro, Ana Maria Izidro *in memoriam* e a pequena Renatinha, por mesmo nas horas mais difícil terem me acolhido em sua casa com imenso carinho. A minha querida e inesquecível Ana Maria que no pouco tempo de convivência foi capaz de deixar grandes e valorosos ensinamentos principalmente pelo seu grande espírito de luta.  
Valeu!

Agradeço de forma especial e particular as pessoas que mais amo, meus pais, por permitir e ajudar sem medir esforços, que foram muitos para que hoje eu pudesse estar aqui vencendo mais esta etapa da vida, a minhas irmãs e irmãos que sempre estarão ao meu lado principalmente nas horas mais difícil.

A você minha adorável irmã Silvane Santi e a D. Maria Inês Maia de Almeida, que estiveram presentes neste momento e deram-me uma grande e valorosa contribuição. Obrigado.

De forma especial agradeço as pessoas que passaram a fazer parte da minha vida e que juntos enfrentamos muitos percursos, tivemos muitas alegrias, algumas tristezas, mas que com grandeza e sabedoria conseguimos superá-las e por isso hoje expresso a felicidade e o grande amor que sinto por tê-los junto a mim, minha filha Ana Carolina Santi Gadelha e a você Carlos Alberto de Almeida Gadelha.

Agradeço a todos os professores e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC, em especial ao grupo BioMol-Lab pela cooperação e incentivo ao longo desse trabalho.

Aos Professores e Funcionários do Departamento de Ciências Fundamentais e Sociais do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba.

A Dona Antonia (Toinha) pela imensa dedicação e pelo apoio nas horas mais difíceis. As colegas de trabalho Sheila Costa de Farias, Elenise Gonçalves de Oliveira, Ludimila da Paz Gomes da Silva, Adriana Evangelista Rodrigues, Patrícia Mendes

Guimarães e Márcia Roseane Targino de Oliveira pelo companheirismo e incentivo constante.

**ESTE TRABALHO FOI REALIZADO COM O APOIO DAS SEGUINTE  
S INSTITUIÇÕES:**

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-PICDT e CAPES), pela bolsa de doutorado concedida à candidata através do convênio com a Universidade Federal da Paraíba e pelos convênios estabelecidos com o Curso de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelos constantes auxílios de pesquisa concedidos ao BioMol-Lab (Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

Fundação Cearense de Amparo à Pesquisa (FUNCAP), pelos constantes auxílios de pesquisa concedidos ao BioMol-Lab.

Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PADCT/CNPq), pelos constantes auxílios de pesquisa concedidos ao BioMol-Lab.

Universidade Federal da Paraíba por ter concedido a minha liberação para cursar o doutorado.

Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, onde grande parte deste trabalho foi realizado.

Laboratório de Química do Departamento de Química da Universidade Federal do Ceará, onde foram realizados os experimentos com os fitonematóides *Meloidogyne incognita*.

Laboratório de Farmacologia dos Canais Iônicos (LAFACI) do Departamento de Fisiologia da Universidade Estadual do Ceará, onde foram realizados os experimentos de atividade anti e pró-inflamatória, nocicepção e contratilidade.

Laboratório do Dr. Professor Marcos H. Toyama da UNESP, onde foram realizados os experimentos com as fitobactérias *Calvibacter michiganensis*,

*michiganensis* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* bem como atividade de agregação plaquetária.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	XVII	
<b>LISTA DE TABELAS</b>	XIX	
<b>ABREVIATURAS</b>	XX	
<b>RESUMO</b>	XXI	
<b>ABSTRACT</b>	XXII	
<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	1
1.1.	Considerações Gerais	1
1.2.	Histórico	2
1.3.	Classificação	4
1.4.	Estrutura das lectinas	10
1.4.1.	Quanto à composição de Aminoácidos (estrutura primária)	10
1.4.2.	Quanto a Massa Molecular	11
1.4.3.	Quanto a Estrutura e Número de Subunidades.	12
1.4.4.	Quanto aos Sítios Funcionais das Lectinas	12
1.4.4.1.	Sítios de Ligação a Metais.	12
1.4.4.2.	Sítios de Ligação a Carboidratos.	13
1.4.4.3	Sítios (Cavidade) Hidrofóbicos	13
1.5.	Ocorrência e Aplicação das Lectinas	15
1.6	Lectinas na Subfamília Mimosoideae	17
<b>2.</b>	<b>ATIVIDADE BIOLÓGICA</b>	20
2.1.	O Processo Inflamatório	20
2.2.	Fisiologia da Nocicepção e da Dor	22
2.3	Agregação Plaquetária	22
2.4.	Pragas Causadoras de Doenças de Plantas	24
2.4.1.	Bactéria Fitopatogênicas <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i> e <i>Clavibacter michiganensis</i> , <i>michiganensis</i> .	24
2.4.2.	Fitonematóide <i>Meloidogyne incognita</i> .	26

3	<b>OBJETIVO GERAL</b>	27
3.1.	Objetivos Específicos	27
4.	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	28
4.1.	Material Vegetal	28
4.2.	Microorganismos	29
4.3.	Animais	29
4.4.	Outros materiais	29
4.5.	Isolamento, Purificação e Caracterização da Lectina da Fração das Albuminas de <i>Acacia farnesiana</i>	30
4.5.1	Preparo da Farinha de Sementes de <i>Acacia farnesiana</i>	30
4.5.2	Extração das Proteínas Presentes na farinha das Sementes de <i>A.farnesiana</i>	30
4.5.3	Dosagem de Proteínas Solúveis nos Extratos das Sementes de <i>A.farnesiana</i>	31
4.5.4.	Fracionamento Protéico do Extrato Total de <i>Acacia farnesiana</i>	31
4.5.5.	Determinação da Atividade Hemaglutinante	32
4.5.6	Ensaio de Inibição da Atividade Hemaglutinante	32
4.5.6.	Cromatografia de Afinidade em Coluna de Quitina (Polímero de N-acetylglucosamina) da Lectina da Fração das albuminas de Sementes de <i>Acacia farnesiana</i> .	33
4.5.7.	Cromatografia de Exclusão Molecular em Coluna de Sílica Gel (TSK-GEL 3000SW 0,8 x 30 cm) Acoplada a um Sistema de Alta Performance (Sistema Akta) da Lectina da Fração das Albuminas de Sementes de <i>Acacia farnesiana</i> .	33
4.5.8.	Cromatografia de Troca iônica em Coluna de Amônio Quaternário (Mono Q HR 5/5) Acoplada a um Sistema de Cromatografia de Alta Performance (Sistema Akta) da Lectina da Fração das Albuminas de Sementes de <i>Acacia farnesiana</i> .	34

4.5.9.	Determinação da Massa Molecular por Espectometria de Massa da Lectina da Fração das Albuminas de Sementes de <i>Acacia farnesiana</i>	34
4.5.10.	Cromatofocalização em Coluna Mono P HR 5/5 Acoplada a um Sistema de Cromatografia de Alta Performance (Akta) da Lectina da Fração das Albuminas de Sementes de <i>Acacia farnesiana</i> .	35
4.5.11.	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com SDS e 2-Mercaptoetanol.	35
4.5.12.	Cromatografia de Exclusão Molecular (Protein Pack 300SW-Glass) Acoplada a um Sistema de Cromatografia de Alta Performance (HPLC) da Lectina de Fração das Albuminas de Sementes de <i>Acacia farnesiana</i>	36
4.5.13.	Cromatografia em Fase Reversa em Coluna C <sub>18</sub> Acoplada a um Sistema de Cromatografia de Alta Performance (HPLC) da Lectina da Fração das Albuminas de Sementes de <i>Acacia farnesiana</i>	36
4.5.14.	Determinação do Peso Molecular e Oligomerização da Lectina da Fração das Albuminas de Sementes de <i>Acacia farnesiana</i> por meio de Cromatografia de Exclusão Molecular	37
4.5.15.	Sequenciamento e Determinação do N-Terminal da Lectina (AFAL) da Fração das Albuminas de Sementes de <i>Acacia farnesiana</i>	37
4.5.16.	Análise de aminoácidos da Fração da Lectina das Albuminas de Sementes de <i>Acacia farnesiana</i>	38
4.6.	Testes de Atividades Biológicas Utilizando a Lectina da Fração das Albuminas de Sementes de <i>Acacia farnesiana</i> (AFAL).	39
4.6.1	Ensaios de Agregação Plaquetária Utilizando a Lectina da Fração das Albuminas de Sementes de <i>Acacia farnesiana</i>	39
4.6.2.	Modelo Experimental para a Avaliação da Atividade Pró-inflamatória	40

4.6.2.1.	Teste da Atividade Pró-inflamatória em Modelo de Edema de Pata Utilizando a Lectina da Fração das Albuminas de Sementes de <i>Acacia farnesiana</i>	40
4.6.3.	Modelo Experimental para Avaliação da Atividade Antiedematógena	41
4.6.3.1.	Teste da Atividade Antiinflamatória em Modelo de Edema de Pata Utilizando a Lectina da Fração das Albuminas de sementes de <i>Acacia farnesiana</i>	41
4.6.4.	Modelo Experimental para Avaliação da Atividade Antinocicpetiva Utilizando a Lectina da Fração das Albuminas de sementes de <i>Acacia farnesiana</i>	41
4.6.4.1.	Teste das Contorções Abdominais Induzida por Ácido Acético	42
4.7.	Atividade Antibacteriana ( <i>Xanthomonas axonopodis pv passiflorae</i> , <i>Clavibacter michiganensis, michiganensis cmm</i> ) e Antinematóide ( <i>Meloidogyne incognita</i> ) da Lectina da Fração das Albuminas de sementes de <i>Acacia farnesiana</i> (AFAL).	42
4.7.1.	Atividade Antibacteriana da Lectina da Fração das Albuminas de Sementes de <i>Acacia farnesiana</i> Contra <i>Xanthomonas axonopodis pv passiflorae</i> , <i>Clavibacter michiganensis, michiganensis cmm</i>	43
4.7.2.	Inibição da Atividade Antibacteriana da Lectina da Fração das Albuminas de Sementes de <i>Acacia farnesiana</i> Sobre Fitobactérias <i>Xanthomonas axonopodis pv passiflorae</i> , <i>Clavibacter michiganensis, michiganensis cmm</i> com Diferentes Açúcares.	43
4.7.3.	Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura da Atividade da Lectina da Fração das Albuminas de Sementes de <i>Acacia farnesiana</i> Sobre Fitobactérias <i>Xanthomonas axonopodis pv passiflorae</i> , <i>Clavibacter michiganensis, michiganensis</i> .	44
4.7.4.	Obtenção e Manutenção de Nematóides do Segundo Estádio (J2) de <i>Meloidogyne incognita</i>	45

4.7.5.	Ensaios <i>in vitro</i> da Lectina da Fração das Albuminas de Sementes de <i>Acacia farnesiana</i> (AFAL) Sobre a Eclosão dos Ovos e Mobilidade de Nematóides da Espécie <i>Meloidogyne incognita</i>	45
4.7.6.	Análise Estatística da Atividade da Lectina da Fração das Albuminas de Sementes de <i>Acacia farnesiana</i> Sobre Fitopatógenos <i>Xanthomonas axonopodis</i> <i>pv passiflorae</i> , <i>Clavibacter michiganensis</i> , <i>michiganensis</i> e <i>Meloidogyne incognita</i>	46
5	<b>RESULTADOS</b>	48
5.1.	Teor de Proteínas Solúveis e Atividade Hemaglutinante nas Frações Protéicas de <i>Acacia farnesiana</i>	48
5.2.	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida 12% em Presença de SDS e $\beta$ -Mercaptoetanol	49
5.3.	Cromatografia de Afinidade em Coluna de Quitina (Polímero de N-acetylglucosamina) da Fração das Albuminas de Sementes de <i>Acacia farnesiana</i>	50
5.4.	Cromatografia de Troca iônica em Coluna de Amônio Quaternário (Mono Q HR 5/5) Acoplada a um Sistema de Cromatografia de Alta Performance (Sistema Akta) da Lectina da Fração das Albuminas de Sementes de <i>Acacia farnesiana</i>	52
5.5.	Ensaio de Inibição da Atividade Hemaglutinante por Açúcares Simples, Complexos e Glicoproteínas da Fração das Albuminas de Sementes de <i>Acacia farnesiana</i> (AFAL).	52
5.6.	Espectro de massa da Lectina da Fração das Albuminas de Sementes de <i>Acacia farnesiana</i> (AFAL).	54
5.7.	Cromatofocalização da AFAL (lectina da fração das albuminas de sementes de <i>Acacia farnesiana</i> ) em Coluna Mono P HR 5/5 Acoplada a um Sistema de Cromatografia de Alta Performance (Sistema Akta).	56
5.8.	Cromatografia de Exclusão Molecular (Protein Pack 300SW-	

	Glass) e Cromatografia em Fase Reversa da AFAL (lectina da fração das Albuminas de Sementes de <i>Acacia farnesiana</i> ) em Coluna C <sub>18</sub> Acoplada a um Sistema de Cromatografia de Alta Performance (HPLC).	58
5.9.	Determinação da Massa Molecular Aparente e da Oligomerização da Lectina da Fração das Albuminas de <i>Acacia farnesiana</i> por Cromatografia de Exclusão Molecular	60
5.10.	Seqüenciamento e Determinação do N-terminal da Lectina da Fração das Albuminas de Sementes de <i>Acacia farnesiana</i>	62
5.11.	Análise de Aminoácidos da Lectina da Fração das Albuminas de Sementes de <i>Acacia farnesiana</i>	64
5.12.	Testes de Atividades Biológicas Utilizando a Lectina da Fração das Albuminas de Sementes de <i>Acacia farnesiana</i> (AFAL).	66
5.12.1.	Ensaios de Agregação Plaquetária Utilizando a Lectina da Fração das Albuminas de Sementes de <i>Acacia farnesiana</i>	66
5.12.2.	Atividade Pró-inflamatória da Lectina de <i>Acacia farnesiana</i> da Fração das Albuminas (AFAL) no Modelo Edema de Pata em Ratos.	68
5.12.3.	Atividade Antiinflamatória da Lectina da Fração das Albuminas de Sementes de <i>Acacia farnesiana</i> (AFAL) no Modelo Edema de Pata em Ratos	68
5.12.4	Atividade Antinociceptiva da Lectina da Fração das Albuminas de <i>Acacia farnesiana</i> (AFAL) - Contorções Abdominais Induzida por Ácido Acético	68
5.12.5.	Atividade Antibacteriana contra <i>Xanthomonas axopodis</i> pv. <i>passiflorae</i> e <i>Clavibacter michiganensis</i> , <i>michiganensis</i> e Microscopia Eletrônica de Varredura.	72
5.12.7	Efeito <i>in vitro</i> da Lectina da Fração das Albuminas de Sementes de <i>Acacia farnesiana</i> Sobre Fitonematóides <i>Meloidogyne incognita</i>	72
5.12.8.	Efeito da Lectina da Fração das Albuminas de Sementes de <i>A.</i>	

<i>farnesiana</i> Sobre a Mobilidade das Larvas Juvenis (J2) de <i>Meloidogyne incognita</i> , após 24 e 48 Horas de Incubação.	75
<b>6. DISCUSSÃO</b>	76
<b>7. CONCLUSÃO</b>	86
<b>8. BIBLIOGRAFIA</b>	87

## **LISTA DE FIGURAS**

1.	Representação de merolectina, hololectina, quimerolectina e superlectina.	6
2	Representação do sitio hidrofóbico (SH), cavidade hidrofóbica (CH), sítio de ligação a metais (SLM), sítio de ligação a carboidratos (SLC).	14
3	Sintomas de mancha bacteriana em folhas de maracujazeiro causada por <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i> .	25
4	Sintomas da doença da planta do tomateiro após a infecção com <i>Clavibacter michiganensis, michiganensis</i> .	25
5	Ramos de <i>Acacia farnesiana</i> com flores e frutos.	28
6	Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% em presença de SDS e β-mercaptopetanol das frações protéicas.	49
7	Cromatografia de afinidade em coluna de quitina, exclusão molecular e PAGE-SDS da fração das albuminas de <i>Acacia farnesiana</i>	51
8	Cromatografia de troca iônica e PAGE-SDS da lectina da fração das albuminas de sementes de <i>Acacia farnesiana</i> .	53
9	Espectro de massa MALDI-ToF/MS da lectina da fração das albuminas de <i>Acacia farnesiana</i> .	55
10	Cromatofocalização da lectina da fração das albuminas de sementes de <i>Acacia farnesiana</i> .	57
11	Cromatografias de exclusão molecular e fase reversa da fração das albuminas de sementes de <i>Acacia farnesiana</i> e suas respectivas PAGE-SDS.	59
12	Cromatografia de exclusão molecular da fração das albuminas de sementes de <i>Acacia farnesiana</i> mostrando a oligomerização.	61

13.	Seqüência do N - terminal da fração das albuminas de sementes de <i>Acacia farnesiana</i> e a sua similaridade com outras seqüências N - terminal de proteínas depositadas em bancos de dados.	63
14	Medidas da agregação plaquetária da trombina e da lectina da fração albumina de <i>Acacia farnesiana</i> .	67
15.	Efeito da lectina da fração albumina de <i>Acacia farnesiana</i> na atividade pró-inflamatória no modelo de edema de pata.	69
16.	Efeito da lectina da fração das albuminas de sementes de <i>Acacia farnesiana</i> na atividade antiinflamatória no modelo de edema de pata tendo como agente flogístico carragenina e dextrana.	70
17.	Atividade antinociceptiva da lectina (AFAL) da fração albumina presente nas sementes de <i>Acacia farnesiana</i> .	71
18.	Controle e atividade inibitória da lectina da fração das albuminas de sementes de <i>Acacia farnesiana</i> sobre a bactéria <i>X. axonopodis</i> pv <i>passiflorae</i> , <i>Clavibacter michiganensis</i> , <i>michiganensis</i> .	70
19.	Efeito da lectina da fração das albuminas de sementes de <i>A. farnesiana</i> sobre a eclosão dos ovos de <i>Meloidogyne incognita</i> em 24, 48 e 72 horas de incubação.	71
20.	Efeito da lectina da fração das albuminas de <i>A. farnesiana</i> sobre a mobilidade das larvas juvenis (J2) de <i>Meloidogyne incógnita</i> , após 24 e 48 horas de incubação.	72

## **LISTA DE TABELAS**

1	Cronograma dos principais eventos envolvendo lectinas	3
2	Teor de Proteínas Solúveis e Atividade Hemaglutinante nas Frações Protéicas de <i>Acacia farnesiana</i> .	48
3	Ensaio de Inibição da Atividade Hemaglutinante por Açúcares Simples, Complexos e Glicoproteínas da Fração das Albuminas de <i>Acacia farnesiana</i> .	54
4	Comparação da Composição de Aminoácido da Lectina da Fração das Albuminas de <i>Acacia farnesiana</i> com as do Gênero Parkia.	65

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
HPLC	Cromatografia líquida de alta pressão
m/v	Relação massa/volume
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
SDS	Dodecil sulfato de sódio
Tris	Tris-hidroxiaminometano
MALDI	“Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization
TOF	“Time of Fligth” (tempo de vôo)
UH	Unidade de Hemaglutinação.
°C	Graus centígrados
mg.Kg <sup>-1</sup>	Miligrama por quilo de peso.
%	percentagem ou por cento.
UH.mgP <sup>-1</sup>	Unidade de Hemaglutinação por miligrama de proteína
mgP.gF <sup>-1</sup>	Miligrama de proteína por grama de farinha.

## RESUMO

O gênero *Acacia*, pertence à subfamília Mimosoideae (Leguminosae), é um dos mais importantes gêneros do ponto de vista ecológico podendo adaptar-se a quase todos os tipos de solo e clima. Dentro deste gênero foram relatadas várias atividades biológicas tais como: inibidora da agregação plaquetária, inibição potente da atividade da ciclooxygenase I, adstringente, analgésica, antibacteriana, entre outras. Diversos estudos sobre lectinas têm sido desenvolvidos na família das Leguminosas, porém na tribo Acacieae somente a lectina de *Acacia constricta* foi investigada. A lectina da fração das albuminas de sementes de *Acacia farnesiana* (AFAL) é capaz de se ligar em coluna de quitina, onde verifica-se que esta apresenta diferentes graus de interação com a quitina provavelmente devido à particularidade desta lectina de sofrer oligomerização decorrente do tempo de dissolução. Esta lectina não é inibida por N-acetilglicosamina nem por 6 a 8 resíduos de N-acetilglicosamina, possui um ponto isoelétrico a pH 4,0, um perfil eletroforético composto por duas bandas de massa molecular aparente de 50 e 29 kDa, confirmados por espectrometria de massa (MALDI-ToF/MS) onde mostra a forma monomérica 24,2 kDa e a dimérica com 50,0 kDa, indicando portanto que a AFAL é um tetrâmero composto de subunidades idênticas. Possui um N-terminal com 87,5% similaridade com *Acacia constricta* e 62,1% de similaridade com aquela das lectinas de *Phaseolus vulgaris*. Os testes de atividade biológica da AFAL mostram que esta lectina apresenta a capacidade de agregar plaquetas, possui atividade pró-inflamatória, atua como agente antinociceptivo. Além disso, os experimentos com fitopatogênicos mostram que ela apresenta capacidade de inibição do crescimento de fitobactérias (*Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* e *Clavibacter michiganensis*, *michiganensis*) e atuação sobre a eclosão e mobilidade de fitonematóides (*Meloidogyne incognita*).

## ABSTRACT

The *Acacia* genus, inserted in the Mimosoideae subfamily, is among the most important genera through the ecological point of view, possessing the ability to adapt to almost all kinds of weather and soil. Within this genus many biological activities were reported, such as: inhibition of platelet aggregation, potent inhibition of cyclooxygenase's activity, besides the astringent, analgesic and antibacterial activities, among others. Several studies about lectins have been developed with Leguminosae family members, however within the Acacieae tribe, only the *Acacia constricta* lectin has been investigated. The lectin of the albumin fraction of *Acacia farnesiana* seeds (AFAL) is capable of binding to a chitin column, where is verified the different interaction degrees presented, probably due to the particularity showed by this lectin in oligomerizing in a time of dissolution dependent way. This lectin cannot be inhibited by N-acetylglucosamine or by a carbohydrate comprising 6 to 8 residues of N-acetylglucosamine; its isoelectric point is at pH 4.0; its electroforetic pattern shows two bands with 50 and 29 kDa of apparent molecular mass, confirmed by its mass spectra (MALDI-ToF/MS), that presented the monomeric form with 24.2 kDa and the dimeric form with 50.0 kDa, fact that points to the possibility of this lectin being a tetramer with identical subunits; its N-terminal sequence has 87% of similarity with *Acacia constricta* lectin and 62.1% with the one from *Phaseolus vulgaris*. The biological activities assays performed with AFAL indicated that this lectin is able to aggregate platelets, has pro-inflammatory activity and acts as antinociceptive agent. Moreover, the experiments with phytopathogens demonstrated that it has the ability to inhibit phytobacteria growth (*Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* and *Clavibacter michiganensis*, *michiganensis*) and to interfere in the phytonematode's (*Meloidogyne incognita*) eclosion and movement.

## 1 - INTRODUÇÃO

### 1.1 - Considerações Gerais

Uma das características de quase todas as proteínas é a capacidade de se ligar específica e reversivelmente a várias substâncias. Lectinas são proteínas capazes de reconhecer e liga-se de forma específica e reversível a açúcares estando eles na forma de mono ou polissacarídeo. Esta característica confere eventualmente as lectinas a capacidade de aglutinarem células e precipitarem polissacarídeos ou glicoproteínas. Algumas lectinas, por serem monovalentes (apresentam um único sítio de ligação a carboidrato), não possuem a habilidade de aglutinar células e outras, ainda, podem também apresentar um ou mais sítios que não ligam carboidratos, mas expressam outra atividade biológica (PEUMANS *et al.*, 2000).

Apesar das lectinas apresentarem a capacidade de aglutinar e precipitar células de uma forma semelhante a dos anticorpos, elas diferem destes por muitas vezes serem encontrados em microorganismos, plantas e vírus, os quais não são capazes de uma resposta imune (CAVADA *et al.*, 2001). Por outro lado, os anticorpos são estruturalmente semelhantes enquanto que as lectinas são estruturalmente diferentes. Geralmente estas proteínas são oligoméricas compostas de subunidades com um ou mais sítios carboidrato ligantes, variam em tamanho, composição de aminoácidos e na sua estrutura tridimensional, sendo que algumas, ainda, requerem metais para exercerem atividade (VAN DAMME *et al.*, 1998).

O estudo das lectinas, principalmente o fato delas ligarem-se a carboidratos, permitiu o refinamento estrutural das mesmas e o desenvolvimento de novas técnicas, em particular a cristalografia de alta resolução por raios-X, permitindo identificar os grupos químicos envolvidos e a forma como os carboidratos interagem com a lectina (ETZLER, 1998).

No futuro, espera-se um uso maior destas proteínas na medicina e na indústria, com a produção em larga escala para as mais diversas aplicações. Além disso, também podemos elucidar a função destas nas plantas, animais e microorganismos.

A definição mais utilizada atualmente propõe que lectinas são proteínas de origem não imune que contêm pelo menos um domínio não catalítico capaz de ligar-se de maneira reversível a mono ou oligossacarídeos específicos, podendo ou não apresentar em sua estrutura domínios catalíticos (PEUMANS & VAN DAMME, 1995a, b).

## 1.2 – Histórico.

Lectinas vegetais foram primeiramente descobertas por Stillmark em 1888, quando ele estudava a toxicidade de *Ricinus communis* em sua tese de doutorado, e verificou que ao misturar eritrócitos com o extrato dessa semente esse causava hemaglutinação. No entanto, esta atividade já havia sido observada por Mitchell, antes de 1860 em seu estudo com veneno de cascavel e provavelmente ele foi o primeiro pesquisador a constatar a atividade de uma lectina. Mais tarde, em 1902, esta atividade foi confirmada por SIMON FLEXNER & H. NOGUCHY, quando escreveram com mais detalhes a aglutinação (KILPATRICK, 2002).

A primeira definição de lectinas foi proposta por BOYD & SHAPLEIGH (1954) na qual lectinas são proteínas que se ligam reversivelmente a carboidratos, aglutinam células e/ou precipitam polissacarídeos e glicoproteínas. Lectinas são proteínas ou glicoproteínas de origem não imune, que se ligam a carboidratos, aglutinam células e/ou precipitam glicoconjungados (GOLDSTEIN *et al.*, 1980).

Segundo a revisão publicada em 1998 por VAN DAMME *et al.*, Elfstrand, introduziu pela primeira vez o termo (hemaglutinina) como um nome comum para todas as proteínas de planta que causavam aglutinação de células. O termo lectina (derivado do latim “*legere*”, que significa escolher, selecionar) surgiu porque algumas dessas proteínas exibiam uma clara preferência por aglutinar eritrócitos de um grupo sanguíneo particular do sistema ABO (RENKONEN, 1948; BOYD & REGUERA, 1949).

A tabela 1 apresenta o cronograma dos principais eventos envolvendo o estudo das lectinas e suas principais aplicações, adaptado por SHARON & LIS (2003).

Tabela 1 – Cronograma dos principais eventos envolvendo lectinas\*.

Ano	Cientistas	Eventos
1860	S. W. Mitchell	Atividade hemaglutinante em veneno de cascavel.
1888	P. H. Stillmark	Atividade hemaglutinante em extratos de <i>Ricinus communis</i> .
1908	K. Landsteiner	Hemaglutininas de plantas espécies específicas
1919	J. B. Summer	Isolamento e cristalização da Concanavalina A (ConA).
1936	J. B. Summer & S. F. Howell	Especificidade por açúcar da ConA.
1948/49	K. O. Renkonen	Especificidade de lectinas de plantas por diferentes grupos sanguíneos
1952	W. M. Watkins & W. T. J. Morgan	Uso de lectinas de plantas para o reconhecimento de açúcares de superfície celular
1954	W. C. Boyd & E. Shapley	Aglutininas específicas para抗ígenos sanguíneos
1960	P. C. Nowell	Atividade mitogênica da Fitohemaglutinina (PHA)
1963	J. C. Aub	Aglutinação de células cancerosas por WGA
1965	I. J. Goldstein	Purificação da ConA por afinidade e utilização para estudos estruturais de carboidratos
1970	J. Porath	Uso de lectinas para purificação de glicoproteínas por afinidade
1972	G. M. Edelman; K. O. Hartman & C. F. Ainsworth	Estrutura primária e 3-D da ConA
1974	G. Ashwell & A. Morell	Função de lectinas animais em endocitose de glicoproteínas
1974	S. Kornfeld; R. C. Hughes; P. Stanley	Mutantes de células resistentes a lectinas
1976	Y. Reisner & N. Sharon	Uso de lectinas para fracionamento de linfócitos
1977	I. Ofek, D. Mirelman & N. Sharon	Funções das lectinas bacterianas nas doenças infecciosas
1981	Y. Reisner & N. Sharon	Uso de lectina de soja no transplante de medula
1983	E.C. Butcher & I. Weissman; S. D. Rosen	Lectinas e migração de linfócitos
1988	K. Drickamer	Identificação dos domínios de reconhecimento de carboidratos em lectinas animais
1989	Vários	Selectina e suas funções nos processos inflamatórios
1997	Assreuy <i>et al.</i> ,	Atividade antiinflamatória de lectinas.

\* Adaptado de SHARON & LIS (2003). LECTINS. Kluwer Academic Publishers, 1-454.

### 1.3 – Classificação.

PEUMANS & VAN DAMME (1995b), fundamentados na estrutura geral dessas proteínas, dividiram-nas em: Merolectinas, Hololectinas, Quimerolectinas e Superlectinas, estas estruturas estão representadas na Figura 1.

**Merolectinas** consistem de um simples domínio de ligação a carboidrato, isto é, são monovalentes e não precipitam glicoconjugados ou aglutinam células;

**Hololectinas** consistem de dois ou mais domínios idênticos ou muito homólogos que se ligam ao mesmo açúcar ou açúcares estruturalmente semelhantes, são por definição di ou multivalentes e aglutinam células e/ou precipitam glicoconjugados;

**Quimerolectinas** são proteínas químéricas consistindo de um ou mais domínios de ligação a carboidrato e de um domínio não relacionado à ligação com carboidratos que possui uma atividade enzimática bem definida ou outra atividade biológica que deve agir independente do domínio de ligação a carboidrato (PEUMANS, *et al.*, 2000);

**Superlectinas** constituídas exclusivamente de dois ou mais domínios de ligação a carboidratos que reconhecem estruturalmente açúcares não relacionados.

Para a classificação proposta por HIRABAYASHI (1997) foram escolhidas poucas famílias representativas de lectinas:

**Galectinas** são famílias de lectinas presente no citosol de células animal que compartilham especificidade por galactose. Participam de vários eventos biológicos como embriogênese, adesão e proliferação celular, apoptose, colonização bacteriana e modulação da resposta imune (HUGHES, 2001; LIU *et al.*, 2002). Possuem uma função chave em vários estágios patológicos, incluindo doenças auto-imunes, reações alérgicas, inflamação, aterosclerose e complicações diabéticas (PERILLO *et al.*, 1998; DANGUY *et al.*, 2002).

**Lectinas tipo-C** são proteínas animais dependentes de cálcio e carboidratos ligantes. A atividade carboidrato ligante destas lectinas é baseada na função do domínio de reconhecimento a carboidrato, estrutura altamente conservada nesta família. O cálcio

não está diretamente envolvido no sítio de ligação a carboidrato, mas é essencial para que a lectina tenha atividade biológica (KILPATRICK, 2002). Fazem parte deste grupo de lectinas as colectinas, selectinas, lectinas endocíticas e lecticans (SHARON & LIS, 2003).

**Selectinas (tipo C)** lectinas animais presentes na membrana, no endotélio vascular e em leucócitos que possuem função específica de adesão de leucócitos a células endoteliais através do reconhecimento sialil-Lewis X (IRJALA *et al.*, 2001).

**Colectinas (tipo C)** têm especificidade por manose e provavelmente estão envolvidas na imunidade inata, são proteínas solúveis e estão predominantemente presentes em animais. Possuem uma única estrutura com um domínio com reconhecimento para carboidrato e outro tipo colágeno. A deficiência destas proteínas predispõe as infecções e outras complicações como doenças auto-imunes (HOLMSKOV *et al.*, 2003).

**Invertebrados** as lectinas estão presentes praticamente em quase todas as classes de invertebrados e encontram-se localizadas principalmente na hemolinfa e órgãos sexuais, provavelmente com função de proteção (KILPATRICK, 2002).

**Anexinas** são um grupo de proteínas que têm mostrado uma certa atividade de ligação a glicosaminoglicanos. São proteínas reguladoras, transporte vesicular, endocitose e exocitose (HIRABAYASHI, 1997).

**Lectinas da família das leguminosas** consistem de um vasto número de representantes, como a ConA. Apesar de, também, frequentemente apresentarem-se dependentes de íon e cátions divalentes, possuem diferentes especificidades a carboidratos quando comparada as lectinas tipo-C.

**Homólogos da lectina “ricina”** que se diferenciam ou na toxicidade ou na especificidade de ligação a açúcares.

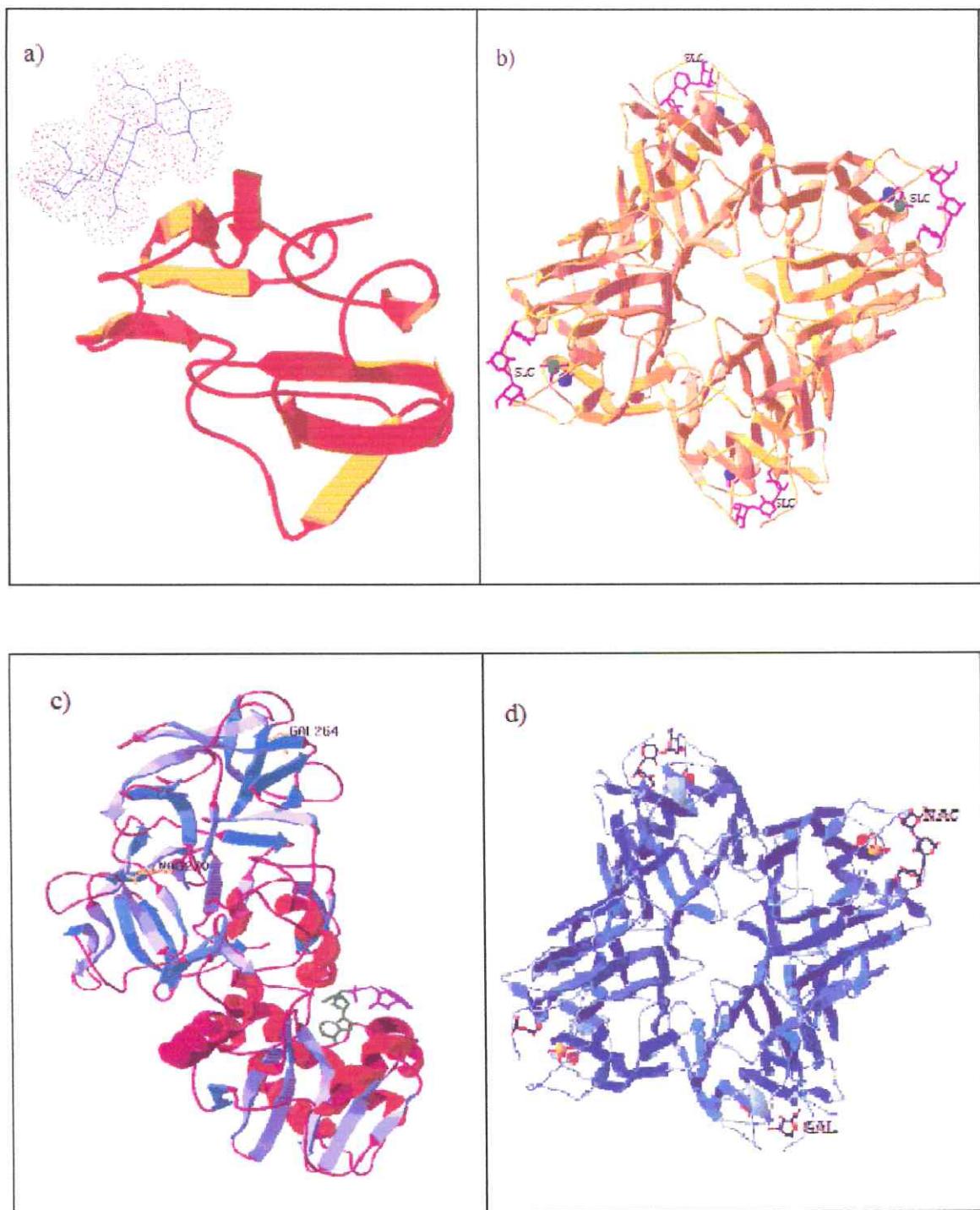


Figura 1. Representação de merolectina (a), hololectina (b), quimolectina (c) e superlectina (d). Figuras obtidas de PDB.

A análise estrutural, permitiu classificar as lectinas de plantas em sete famílias de proteínas, relacionando-as evolutiva e estruturalmente (PEUMANS *et al.*, 2000).

### 1. Família de Lectinas de Amaranthaceae.

As Amaranthaceae são lectinas encontradas em sementes de espécies do gênero *Amaranthus*, específicas por Gal  $\beta(1,3)$  GalNAc, que não necessitam de metais para exercerem a sua atividade, como é o caso da ACA, lectina de *Amaranthus caudatus*. São proteínas homodiméricas consistindo de subunidades não glicosiladas idênticas de aproximadamente 33 kDa. Basicamente, os protômeros consistem de dois domínios homólogos com estruturas em  $\beta$ -folha tripla (chamados C e N) ligados por uma hélice curta, são inibidas por GalNAc mas exibem uma grande afinidade pelo dissacarídeo antígeno T Gal  $\beta(1,3)$  GalNAc (RINDERLE *et al.*, 1989, TRANSUE *et al.*, 1997; SHARON & LIS, 2003).

### 2. Lectinas que se Ligam à Quitina Compostas de Domínios de Heveína.

Proteínas de plantas que possuem pelo menos um domínio de heveína, definido como uma unidade estrutural de cerca de 40 resíduos de aminoácidos, semelhante a sequência da heveína, a proteína isolada do látex da seringueira (*Hevea brasiliensis*) (WALJUNO *et al.*, 1975). Todas as lectinas com domínio de heveína ou heveína-like, consistem de uma cadeia polipeptídica única de aproximadamente 40-45 aminoácidos, rica em glicina e contém oito resíduos de cisteína que formam quatro pontes dissulfeto intracadeia. A maioria das lectinas que se ligam a quitina, são hololectinas compostas de peptídeos contendo 2, 3, 4 ou 7 domínios de heveína arranjados seqüencialmente. A especificidade dessas lectinas confirma que os sítios de ligação a carboidrato têm uma estrutura complexa, mais complementar ao trímero ou ao tetrâmero de GlcNAc, sendo que a maioria dessas lectinas não são inibidas por GlcNAc, mas requerem pelo menos o dímero (ou polímeros maiores) deste açúcar. Algumas lectinas quitina ligantes apresentam sítios de ligação múltiplos não idênticos, como é o caso da WGA, que contém sítios de alta e baixa afinidade pelo açúcar (VAN DAMME *et al.*, 1998).

### 3. Lectinas do Floema de Cucurbitaceae.

Lectinas que se ligam a quitina, encontradas exclusivamente em exudatos de floema de Cucurbitaceae, apresentam-se como proteínas diméricas compostas de subunidades não glicosiladas cerca de 25 kDa, como por exemplo, a lectina de *Cucurbita pepo* (WANG *et al.*, 1994). Todas essas lectinas exibem especificidade para oligômeros de GlcNAc (ANATHARAM *et al.*, 1986).

### 4. Lectinas Relacionadas à Jacalina.

Lectinas de plantas que são relacionadas estruturalmente e evolutivamente a jacalina, lectina de jaca (*Artocarpus integrifolia*), específica por galactose. A família da jacalina compreende um subgrupo de lectinas, específico por galactose e constituídas de 4 protômeros idênticos, cada um deles formado por uma grande cadeia  $\alpha$  e uma pequena cadeia  $\beta$  (jacalina, outras lectinas de sementes de *Artocarpus* e a lectina de sementes de *Machura pomifera*), e outro sub-grupo, específico por manose (YANG & CZAPLA, 1993). A maioria possui duas ou quatro subunidades não glicosiladas de aproximadamente 150 resíduos de aminoácidos. A aglutinina Heltuba de *Helianthus tuberosus* compartilha a topologia em  $\beta$ -prisma e o sítio de ligação a carboidrato da jacalina (BOURNE *et al.*, 1999).

### 5. Lectinas de Monocotiledôneas que se Ligam a Manose.

São lectinas com especificidade restrita por manose, compreendendo espécies das famílias Alliaceae, Amaryllidaceae, Araceae, Bromeliaceae, Iridaceae, Liliaceae e Orchidaceae. Basicamente se distinguem dois sub-grupos: no primeiro sub-grupo se incluem as lectinas consistindo de um, dois ou quatro protômeros de um domínio de 11–14 kDa e no segundo sub-grupo, lectinas consistindo de um, dois ou quatro protômeros de dois domínios de cerca de 30 kDa. Por exemplo, a *Galanthus nivalis* (GNA) (HESTER *et al.*, 1995) é um homotetrâmero com 4 protômeros de 109 resíduos de aminoácidos ligados não covalentemente que consiste de três subdomínios dispostos em seqüência (I, II, e III) cada um forma uma folha $\beta$  de quatro segmentos, possui 12 sítios de ligação a manose.

## 6. RIP tipo 2 e Lectinas Relacionadas.

Constituem uma família de quimolectinas, representada por lectinas das famílias das Euphorbiaceae, Loranthaceae e algumas de Leguminosae (Abrina). A ricina é uma lectina heterodimérica de 60 kDa, constituída de protômeros que possuem um domínio N-terminal na cadeia A, com atividade N-glicosidase e, um domínio C-terminal na cadeia B, com atividade lectínica que estabelece a especificidade de ligação a carboidrato, sendo que os dois domínios se encontram ligados por pontes S-S (BARBIERI, *et al.*, 1993; LORD, *et al.*, 1994; SANDVIG & VAN DEURS, 2000). Essas lectinas são conhecidas pela sua potente atividade citotóxica contra animais superiores, alguns insetos, vírus de plantas e fungos, não possuindo qualquer efeito sobre bactérias (PEUMANS & VAN DAMME, 1995; PEUMANS *et al.*, 2000).

## 7. Lectinas de Leguminosas

As lectinas encontradas nesta família de plantas (Leguminosae), se assemelham em suas propriedades fisiológicas, embora se diferenciem em suas especificidades a carboidratos devido a variações de aminoácidos envolvidos no sítio de ligação a carboidratos (SHARMA & SUROLIA, 1997). Apresentam um variado e amplo grau de especificidades e, além das lectinas que se ligam a manose e das lectinas específicas por manose/maltose, são também encontrados todos os outros grupos de lectinas com especificidades diversas por monossacarídeos. Consistem de 2 ou 4 subunidades (protômeros) idênticas (homodiméricas) ou diferentes (heterodiméricas) com massa molecular aparente de 25-30 kDa com cerca de 250 resíduos de aminoácidos. Seus protômeros podem apresentar-se divididos e não divididos formando lectinas de uma cadeia ou duas cadeias, respectivamente. Freqüentemente são metaloproteínas onde cada subunidade contém um íon de Mn<sup>2+</sup> e um de Ca<sup>2+</sup>, que são essenciais para a formação e manutenção do sítio de ligação a carboidrato da lectina. Algumas lectinas de leguminosas são N-glicosiladas (SHARON & LIS, 1990; IMBERTY *et al.*, 2000). Em adição ao sítio de carboidratos estas lectinas apresentam um sítio hidrofóbico que se liga especificamente a compostos não polares como adenina, ácido indol acético ou porfirinas (SHARON & LIS, 2003). A função mais provável dessas lectinas é a de defesa. Além disto, estas lectinas também estão envolvidas no reconhecimento de bactérias fixadoras

de nitrogênio com o propósito facilitar a formação de cordões de infecção, a subsequente nodulação e o estabelecimento de simbiose entre a planta e o microorganismo (YAMAMOTO, 2001).

#### 1.4. - Estrutura das Lectinas.

As lectinas constituem um grupo de proteínas bastante heterogêneas. Desta forma, são caracterizadas por uma grande diversidade estrutural, podendo diferir em vários aspectos tais como: composição de aminoácidos, massa molecular aparente, estrutura e número de subunidades, estrutura terciária, e ainda, pelo fato de conterem ou não íons metálicos ou cátions bivalentes em sua estrutura.

##### 1.4.1. - Quanto à Composição de Aminoácidos (estrutura primária)

Boa parte do conhecimento da estrutura primária das lectinas de plantas foi acumulado na última década, através de extensos estudos químicos, feito em lectinas isoladas da família Leguminoseae. Os aspectos comparativos, evolucionários e quimiotaxonômicos desses estudos são de particular interesse para o entendimento do significado potencial e funcional das lectinas e suas alterações de genes durante o processo evolutivo (PUSZTAI, 1991).

A comparação das seqüências primárias parciais ou completas das lectinas de origem diversas tem demonstrado uma homologia entre diferentes lectinas. Por exemplo, a seqüência amino terminal da cadeia  $\beta$  de lectinas a duas cadeias de *Vicieae* e a uma cadeia de lectinas de outras tribos de Papilioideae ou de Caesalpinoideae, comparadas com a seqüência apropriada de ConA (resíduos 123-147), são altamente homólogas (STROSBERG *et al.*, 1986). No entanto, a seqüência primária da lectina de *Parkia platycephala*, uma Mimosoideae, assemelha-se a da jacalina (*Artocarpus integrifolia*) (MANN *et al.*, 2001), mas não se assemelha a nenhuma lectina de leguminosa.

De modo geral, as lectinas caracterizam-se por terem aminoácidos ácidos, principalmente aspártico e glutâmico, e hidroxilados como a serina e treonina e são pobres em aminoácidos sulfurados como metionina e cisteína (SHARON & LIS, 1990). Este é o caso, por exemplo, da lectina de *Canavalia grandiflora*, que é rica em aminoácidos serina e ácido aspártico e não possui aminoácidos do tipo metionina e cisteína (CECCATO *et al.*, 2002). Entretanto, exceções são encontradas nas lectinas de gramíneas que possuem um alto teor de glicina (23 %) e cisteína (21 %), sendo que os resíduos de cisteína, em sua maioria, estão na forma de cistina (pontes dissulfeto), estabilizando assim a molécula (KONAMI *et al.*, 1995; SHARON & LIS, 2003). As lectinas de solanáceas são ricas em hidroxiprolina, serina, glicina e cisteína (SHOWALTER, 1993). A lectina de *Parkia platycephala* possui 447 resíduos de aminoácidos, baixo teor de aminoácidos aromáticos, é não glicosilada e apresenta seu N-terminal bloqueado (MANN *et al.*, 2001).

As lectinas de algas marinhas apresentam, geralmente, alto teor de aminoácidos ácidos, baixas concentrações de aminoácidos básicos e ausência de aminoácidos sulfurados (SAMPAIO, 1992; CALVETE *et al.*, 2000).

#### 1.4.2. - Quanto a Massa Molecular

De modo geral, a massa molecular aparente das lectinas varia de 3,5 kDa (lectina de *Crotalaria striata*, SIKDAR *et al.*, 1990) à 480 kDa (lectina de rizoma de *Aegopodium podagraria*, PEUMANS *et al.*, 1985). Outra característica observável, e que reflete diretamente na massa molecular aparente das lectinas, é a presença de carboidratos em sua estrutura sendo, portanto, glicoproteínas e, neste caso, o grau de glicosilação varia dentre as espécies (SHARON & LIS, 1989). Algumas lectinas apresentam um conteúdo de até 50 % de carboidratos em sua estrutura como o caso da lectina de *Solanum tuberosum* (SHARON & LIS, 2003). Outro exemplo de lectinas glicosiladas são as de sementes de *Cassia fistula*, a CSL-1 com galactose na sua estrutura, a CLS-2, com galactose e glicose e a CLS-3, com galactose e manose e que apresentam peso molecular

aparente de 37,2 kDa, 42,0 kDa e 46,2 kDa, demonstrado através de PAGE-SDS, respectivamente (ALI *et al.*, 2004).

#### 1.4.3 - Quanto a Estrutura e Número de Subunidades.

As lectinas podem ser constituídas a partir de associações de uma ou mais subunidades intactas e um ou mais fragmentos. Tais associações podem ocorrer covalentemente via ponte dissulfeto ou não, por ligações não covalentes (OLSNES, 1987).

No entanto, as lectinas podem apresentar diferentes padrões de associações de suas subunidades dependendo da característica de pH onde se encontram. As seqüências de aminoácidos das lectinas de sementes de *Dioclea guianensis* e *Dioclea grandiflora* diferem por somente nove resíduos de aminoácidos. Porém *Dioclea guianensis* apresenta equilíbrio da forma dímero-tetrâmero abaixo de pH 5,5 e *Dioclea grandiflora* exibe exclusivamente a forma tetramérica abaixo do pH 4,5, como mostram suas estruturas cristalográficas (CALVETE *et al.*, 1999, ROSWASKI *et al.*, 1998). A lectina de *Parkia platycephala* apresenta uma única cadeia polipeptídica e em condições não desnaturantes a pH fisiológico comporta-se como uma mistura de 70% de dímeros e 30% de tetrâmeros (CAVADA *et al.*, 1997). As isolectinas de *Acacia constricta* são tetraméricas com subunidades idênticas de massa molecular aparente de 34 kDa (GUZMÁN-PARTIDA *et al.*, 2004).

#### 1.4.4 - Quanto aos Sítios Funcionais das Lectinas

##### 1.4.4.1 - Sítios de Ligação a Metais.

Muitas das lectinas de leguminosas estudadas contêm íons metálicos (Figura 2) como parte essencial de sua estrutura nativa e necessitam da presença de cátions

divalentes ligados ao sítio de ligação a carboidratos, para que possam expressar suas atividades biológicas (WAH *et al.*, 2001). Estes íons interagem em sítios específicos na estrutura protéica, viabilizando a formação do sítio de ligação a carboidratos, conferindo alto grau de estabilidade estrutural e protegendo a molécula contra a inativação (MOREIRA *et al.*, 1996; CAVADA *et al.*, 1996).

#### 1.4.4.2 - Sítios de Ligação a Carboidratos.

Os sítios de ligação a carboidrato estão sendo melhores estudados a partir das técnicas de difração de raios X, pois podem ser analisados, sobretudo co-cristais formados por lectinas e seus prováveis carboidratos ligantes.

Existe uma íntima relação entre os sítios de ligação a carboidratos e o sítio de ligação a metais (Figura 2). Peptídios de 8 a 11 resíduos, obtidos por digestão da proteína intacta e apresentando a capacidade de ligação a carboidratos, foram isolados a partir de hidrolisados das lectinas de *Bauhinia purpurea* (YAMAMOTO *et al.*, 1991), *Lotus tetragonolobus* e *Ulex europeus* (KONANI *et al.*, 1991). A seqüência de aminoácidos encontrada nesses peptídios evidenciou uma alta homologia como uma região da ConA que faz parte do sítio de ligação a metais.

#### 1.4.4.3 - Sítios (Cavidade) Hidrofóbicos.

Um outro sítio de ligação das lectinas, também explorado, é caracterizado por ser constituído principalmente por aminoácidos hidrofóbicos. Como o próprio nome sugere a existência deste sítio diversifica a natureza da substância com as quais as lectinas podem interagir. Segundo LIS & SHARON (1986), trata-se de um tipo de ligação que não é inibida por açúcares específicos, portanto, a interação dos ligantes hidrofóbicos com as lectinas ocorre em sítios de ligação diferentes daqueles que ligam os carboidratos (Figura 2). Os aminoácidos que formam a cavidade hidrofóbica (Figura 2) das lectinas parecem ter sido bastante conservados durante a evolução.



Figura 2 – Representação dos sítios hidrofóbicos (SH), cavidade hidrofóbica (CH), sítios de ligação a metais (SLM), sítios de ligação a carboidratos (SLC).

## 1.5 – Ocorrência e Aplicação das Lectinas.

Apesar de terem sido encontradas originalmente em plantas, as lectinas ocorrem em todas as classes e famílias de seres vivos, desde bactérias e vírus até mamíferos (LIENER *et al.*, 1986; ETZELER, 1998).

A maioria é encontrada em sementes especialmente nas leguminosas, onde podem constituir até 10 % do total das proteínas das sementes, no entanto geralmente se purifica em torno de 0,1-1 %. A localização das lectinas varia conforme a família de plantas (RÜDIGER, 1998).

Lectinas isoladas do micélio de fungos também são relatadas como importantes proteínas que participam de processos patogênicos como *Rhizoctonia solani* (CANDY *et al.*, 2001). As lectinas estão envolvidas no processo de adesão de *Corynebacterium diphtheriae* aos seus hospedeiros (COLOMBO *et al.*, 2001). A planta transgênica *Arabidopsis thaliana*, expressando uma lectina manose ligante (GNA) de *Galanthus nivalis*, está sendo investigada quanto a sua capacidade de resistência ao nematóide *Meloidogyne incognita* (RIPOLL *et al.*, 2003).

Nas gimnospermas foram relatadas a presença de lectinas em sementes de *Araucaria angustifolia* (DATTA *et al.*, 1991) e em folhas de *Cycas revoluta* (CRRL) (YAGI *et al.*, 2002). As lectinas isoladas de *Araucaria angustifolia* (lectina I e lectina II) são glicoproteínas com massa molecular aparente de 200 kDa, específicas para açúcares do tipo glicose, manose e seus oligômeros. A atividade hemaglutinante parece não ser dependente da presença de íons divalentes e aglutinam indistintamente sangue humano do tipo ABO (DATTA *et al.*, 1991). A lectina de *Cycas revoluta* apresenta uma massa molecular aparente de 33 kDa, é monomérica e possui atividade hemaglutinante contra hemácias de coelho tripsinizadas (YAGI *et al.*, 2002).

Muitas proteínas animais, notavelmente certas citocinas como o Fator de Necrose Tumoral (TNF), apresentam atividades lectínicas documentadas (CEBO *et al.*, 2002). As espermadesinas, que são lectinas que estão envolvidas no processo de fertilização animal, têm sido relatadas em diversas espécies de mamíferos (TEIXEIRA *et al.*, 2001, ASSREUY *et al.*, 2002).

Muitas bactérias expressam lectinas, frequentemente de um ou mais tipos com diferentes especificidades. Em bactérias gram negativas frequentemente as lectinas encontram-se nas fimbrias e, em raros casos, apresentam-se intracelularmente.

Graças as suas atividades peculiares, as lectinas têm sido utilizadas em uma série de sistemas. As lectinas têm se mostrado ferramentas poderosas tanto para propósitos analíticos como preparativos em bioquímica, biologia molecular, imunologia e áreas relacionadas. O uso das lectinas em áreas clínicas também tem sido bem explorado.

Assim é que as lectinas têm sido utilizadas como suportes em cromatografias de afinidade não só para o isolamento como para a demonstração da natureza glicoprotéica de receptores de hormônios, fatores de crescimento, neurotransmissores, imunoglobulinas e compostos relacionados. A cromatografia de afinidade em coluna de lectina tem sido utilizada, também, com propósitos preparativos não só de glicoproteínas de membranas como para separar glicoproteínas que diferem pouco na composição e estrutura de carboidratos da porção glicana. As lectinas têm dado uma colaboração sensível ao conhecimento da estrutura química dos determinantes de grupo sanguíneo do sistema ABO. Assim, estudos de inibição por haptenos com as lectinas de *Phaseolus limensis* e *Vicia craca*, específicas para o grupo A e de *Lotus tetragonolobus* e *Anguilla anguilla*, específicas do grupo O, forneceram as primeiras indicações de que N-acetilgalactosamina e L-fucose desempenham um papel importante na especificidade dos grupos A e O, respectivamente (LIS & SHARON, 1986).

Apesar de já terem sido descobertas há mais de um século (1888 por STILLMARK) e até hoje não ter sido estabelecido à função exata destas proteínas dentro das plantas onde são encontradas (CAVADA *et al.*, 2001), as lectinas têm demonstrado uma diversidade enorme de aplicabilidade em várias áreas da ciência, quer seja ciência básica ou aplicada.

Uma das maiores contribuições das lectinas tem sido no esclarecimento da estrutura de membranas celulares e subcelulares. Nestes estudos tem-se feito uso, principalmente, de lectinas marcadas, quer radioativamente, quer com fluoresceina. Assim, as lectinas de bactérias, vírus e animais servem para mediar à interação parasita infecção, comunicação celular, inflamação, desenvolvimento, etc., (CAVADA *et al.*, 2001).

Lectinas têm ainda sido usadas como ferramentas para o estudo de processos inflamatórios (ASSREUY *et al.*, 2003; ALENCAR *et al.*, 2005), as lectinas de sementes de *Dioclea violacea* e de *Dioclea grandiflora* foram capazes de causar apoptose e estimulação de células T (BARBOSA *et al.*, 2001), a lectina de *Erythrina cristagalli* mostrou ser mitogênica para linfócitos humanos (TURTON *et al.*, 2004).

Uma das primeiras lectinas tipo-C encontradas nos venenos de cobra foi a Botrocetina, de veneno de *Botrops jararaca*, que é uma proteína de 31 kDa que promove aglutinação de plaquetas por formar um complexo solúvel com o fator de von Willebrand (vWF) ativando o seu domínio A1, e favorecendo assim a sua interação com o receptor do vWF, a glicoproteína de plaquetas (GP) Ib (BRINKHous *et al.*, 1981, MATSUSHITA *et al.*, 2000). Já a Botrojaracina da mesma cobra, é uma lectina tipo-C de 27 kDa (MONTEIRO & ZINGALI, 2000), possui um efeito anticoagulante resultante de dois mecanismos sinérgicos e distintos. A CqLec, lectina de *Chenopodium quinona* não tem qualquer efeito sobre o processo de agregação plaquetária, porém foi capaz de inibir completamente o crescimento bacteriano sobre culturas de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* (CAMILLO *et al.*, 2003).

A descoberta das diversas propriedades das lectinas serviu de base para a sua utilização na biotecnologia e como modelo na formulação de conceitos básicos na imunologia. Entre as principais aplicações encontradas para as lectinas podemos citar, aplicações em quimiotaxonomia vegetal, tipagem sanguínea, tipagem de microorganismos, estudo de glicoconjungados simples e complexos, produção de mísseis biológicos, aplicações em parasitologia, efeito inseticida de lectinas vegetais, entre outros.

#### 1.6 – Lectinas na Subfamília Mimosoideae.

A subfamília Mimosoideae, pertencente à família das Leguminosae, contém aproximadamente 50 a 60 gêneros amplamente distribuídos nas regiões tropicais, subtropicais, temperadas-quentes e temperadas. Esta subfamília é subdividida em

diferentes tribos, dentro das quais se encontram os gêneros *Acacia*, *Mimosa* e *Inga* (ELIAS, 1974).

O gênero *Acacia* inclui apoxiadamente 1350 espécies que são encontradas em regiões tropicais e subtropicais, sendo que muitas destas são ricas em proteínas, taninos, aminas e alcalóides, glicosídios cianogênicos, ácidos graxos, lipídeos, gomas, aminoácidos não protéicos, flavanóides, terpenos e taninos condensados (SIEGLER, 2003). Este gênero se adapta aos extremos de temperatura e umidade e a solos tropicais.

No Brasil, a espécie *Acacia farnesiana* também é conhecida popularmente como coronha sendo utilizada em várias partes do mundo com antispasmódico, afrodisíaco, antiinflamatória, no combate a diarréia, reumatismo, câncer de estômago entre outros (DUKE, 1983).

Extrato metanólico de *Acacia farnesiana* apresentou cerca de 54,0 % de inibição do edema de pata na primeira fase de experimento e, após três horas, ocorreu uma potencialização desta atividade para 72,8 % (MECHES, 2004). Extratos aquosos de *Acacia nilota* são capazes de inibir a atividade edematógena da carragenina, diminuindo o edema de pata, além de também apresentar efeito antipirético (DAFALLAH & al-MUSTAFA, 1996).

Algumas espécies de *Acacia* fazem simbiose com *Rhizobium* e fungos micorrízicos, aumentando, portanto a fertilidade do solo (ARIAS *et al.*, 2004).

A maioria dos estudos sobre lectinas dentro da família Leguminosae se dá em espécies da tribo Phaseoleae (subfamília Papilionoideae) e somente alguns trabalhos estão sendo realizados com espécies da subfamília Mimosoideae.

Na subfamília Mimosoideae somente as lectinas de sementes de *Mimosa invisa* (CHANDRIKA & SHAILA, 1987), *Parkia speciosa* (SUVACHITTANONT & PEUTPAIBOON, 1992), *Parkia javanica* (UTARABHAND & AKKAYANONT, 1995), *Parkia platycephala* (CAVADA *et al.*, 1997; RAMOS *et al.*, 1999), *Parkia pendula* (LOMBARDI *et al.*, 1998), *Parkia discolor* (CAVADA *et al.*, 2000) e recentemente as lectinas de *Acacia constricta* (GUZMÁN-PARTIDA *et al.*, 2004) e uma segunda lectina de sementes de *Parkia platycephala* (CASTELLÓN, 2004; ROCHA, 2005).

Somente a lectina de *Parkia platycephala* apresenta dados sobre sua estrutura na subfamília das Mimosoideae e, desta forma, a classificação estrutural dessas lectinas

ainda permanece obscura. Faz-se necessário, para tanto, que novas lectinas desta subfamília sejam purificadas e, além disto, para que se possa efetivamente caracterizar estruturalmente este grupo de lectinas é necessário que se realizem estudos tanto de seqüência, como de cristalografia, para ter um número expressivo e representativo de lectinas deste grupo de leguminosas.

As lectinas, particularmente aquelas de sementes de leguminosas, constituem um grupo de proteínas homólogas (40-50 % de identidade na seqüência primária), que se ligam seletivamente a resíduos de carboidratos, em solução ou na superfície de células. Dessa interação decorrem inúmeros efeitos biológicos, tais como o conhecimento de certos tipos celulares, resultando em aglutinação e/ou ativação-inativação das células e macromoléculas, efeitos no sistema imune, na inflamação e ação tóxica sobre diversos organismos, inclusive insetos (GABIUS & GABIUS, 1997). Estudos estruturais visando a caracterização da especificidade de interação das lectinas com os diferentes carboidratos são fundamentais para o entendimento das diferentes propriedades dessas proteínas. Vários dessas lectinas apresentam também efeito inibitório contra enzimas digestivas de mamíferos, além de enzimas que participam da coagulação sanguínea, resultando daí um potencial efetivo de uso terapêutico destas proteínas.

## 2. - ATIVIDADE BIOLÓGICA.

### 2.1 - O processo Inflamatório.

O processo inflamatório é uma seqüência complexa de eventos que ocorre em tecidos vascularizados, em resposta a agressão por agentes lesivos. Esta reação tem como principal objetivo livrar o organismo do agente causador da injúria e também desencadear processos que tendem à reparação do tecido lesado (McGEER & McGEER, 2000). Uma característica importante deste processo é que, independente da natureza do estímulo, a resposta inflamatória segue um padrão característico, podendo ser observadas modificações discretas no padrão de respostas, inerentes ao agente etiológico, ao tecido ou órgão lesado e ao estado patológico do hospedeiro (RANG *et al.*, 2001).

Os fenômenos vasculares observados na resposta inflamatória caracterizam-se pelo aumento do fluxo sanguíneo para a região agredida (eritema), com elevação da temperatura local (calor). A vasodilatação e o aumento da permeabilidade possibilitam que as substâncias do sangue, como células citotóxicas naturais, plaquetas, leucócitos e macrófagos saiam mais facilmente dos vasos e alcancem à área afetada (LINGEN, 2001). O aumento do fluxo sanguíneo além de remover invasores e células mortas (TORTORA & GRABOWSKI, 2002) produz sinais e sintomas característicos da inflamação: calor, rubor, edema e dor no local onde ocorreu a injúria (McGEER & McGEER, 2000). A dor provocada pelo processo inflamatório pode ser resultado da lesão das fibras nervosas, da irritação provocada pelas substâncias químicas ou, ainda, pelo aumento da pressão causada pelo edema (TORTORA & GRABOWSKI, 2002). As plaquetas são células necessárias para que ocorra a coagulação sanguínea, e também estão envolvidas na resposta imune e especialmente na inflamação e reparação tecidual (JR & DANTAS, 2000).

Os mediadores químicos podem originar-se do plasma, das células ou do tecido agredido e podem ser divididos em grupos (CONTRAN *et al.*, 2000):

Aminas vasoativas: histamina e serotonina.

Proteases plasmáticas: Sistemas calicreína, complemento (C3a, C5a, C5b-C9), coagulação fibrinolítico.

Metabólitos do sistema araquidônico: via ciclooxygenase e lipooxygenase.

Constituintes lisossômicos.

Radicais livres derivados de oxigênio e nitrogênio.

Fatores ativadores de plaquetas.

Citocininas.

Fatores de crescimento.

Os mediadores químicos utilizados para causar o processo inflamatório fazem com que à inflamação mantenha características uniformes mesmo sendo produzida por diferentes irritantes. Em modelos experimentais, uma das formas mais convencionais para indução de inflamação é através da inoculação de carragenina ou dextrana (HONMURA *et al.*, 1992).

A carragenina tem sido utilizada como agente inflamatório desde a década de 60, por ser um composto que induz uma reação inflamatória aguda envolvendo uma liberação de mediadores que resultam em mudanças na permeabilidade vascular e formação de edema rico em infiltrado neutrofílico (DI ROSA, 1972). E a dextrana causa um edema osmótico acelular (LO *et al.*, 1982).

Vários são os métodos de avaliação de inflamação: estudos de edema medidos através de hidroplesitimografia, nos quais o volume do edema é calculado pela diferença do volume inicial e final, contagem total e diferencial de células inflamatórias (ALBERTIN, 2001), histopatologicamente, (GREGORINI, 2000), aferição da temperatura, medição do fluxo sangüíneo, entre outros.

Medicamentos provenientes de ervas são muito importantes para habitantes de áreas rurais para resolver seus problemas de saúde. Pesquisas mostram que um vasto número de espécies de plantas está sendo extremamente usado para tratar processos inflamatórios as quais representam uma importante fonte de compostos com propriedades antiinflamatórias (MECKS, 2004).

## 2.2 - Fisiologia da Nocicepção e da Dor.

A dor pode ser o primeiro sinal de doenças por ser uma manifestação utilizada pelo sistema nervoso central para sinalizar processos lesivos ao organismo, isso proporciona ao organismo uma adaptação que visa preservar a integridade do organismo (LEVINE, 1998).

Receptores sensoriais que respondem a estímulos intensos nocivos e causam a sensação de dor são denominados nociceptores (CESARE & McNAUGHTON, 1997; WOOD & PERL, 1999). Os impulsos neurais percebidos pelos nociceptores podem ser percebidos de uma forma rápida ou lenta, dependendo da fibra que as conduzam (TORTORA & GRABOWSKI, 2002).

O teste das contorções abdominais, em ratos ou camundongos, é realizado com a injeção intraperitoneal de substâncias que causam irritação com o ácido acético. Este agente faz com que ocorra a síntese endógena de vários mediadores tais como, prostaglandina E<sub>2</sub>, prostaglandina F<sub>2α</sub>, bradicinina, fator de necrose tumoral α1, interleucina 1β e interleucina 8 (DARAEDT *et al.*, 1980; DUARTE *et al.*, 1988, HEAPY *et al.*, 1993, RIBEIRO *et al.*, 2000; TAKAHASHI & PAZ, 1987). O teste de contorções abdominais induzida por ácido acético é considerado um teste nociceptivo periférico, ele é pouco específico, uma vez que drogas hipotensoras e anti-depressoras do SNC podem inibir essas contorções (PETTIBONE & MULLER, 1989; TAKAHASKI & PAZ, 1987). No entanto, é útil como primeira triagem da avaliação de substâncias antinociceptivas.

## 2.3 - Agregação Plaquetária.

Entre as propriedades das plaquetas está a manutenção da homeostasia, a adesão à superfície endotelial danificada, a agregação em resposta a uma variedade de estímulos e a secreção de fatores de coagulação, vasoconstrictores e fatores de crescimento após a sua ativação (<http://www.lcfamadas.hpg.ig.com.br>).

O processo de formação do trombo plaquetário inicia-se com a lesão endotelial. Quando ocorre um dano vascular, a matriz colágena e as proteínas subendoteliais ficam

expostas. É nesse local que os receptores de membrana das plaquetas se ligam, resultando na adesão plaquetária, a primeira etapa do processo de formação do trombo plaquetário. Múltiplos agonistas são gerados nesse momento. Eles induzem a ativação plaquetária, ocasionando alterações nos receptores da glicoproteína (GP) IIb/IIIa e levando a um estado de receptividade à ligação do fibrinogênio. Nessa fase, as plaquetas se encontram definitivamente ativadas. Em seguida, inicia-se o processo de agregação plaquetária, com a ligação múltipla e cruzada do fibrinogênio aos receptores GP IIb/IIIa. As causas de diminuição da agregação plaquetária podem ser congênitas ou adquiridas ([http://www.diagnosticosdaamerica.com.br/exames/agregacao\\_plaquetaria](http://www.diagnosticosdaamerica.com.br/exames/agregacao_plaquetaria)). Entre as causas congênitas estão a doença de von Willebrand, a trombastenia de Glanzmann e a síndrome de Bernard-Soulier. Todas essas patologias estão relacionadas a defeitos na fase de adesão plaquetária. As plaquetas aderem a superfícies estranhas por meio da ligação das glicoproteínas da sua membrana, tendo como participante indispensável uma proteína plasmática, na verdade um componente do complexo molecular do fator VIII da coagulação chamado fator de von Willebrand (ESMOM, 1995).

O exame é realizado a partir do plasma do paciente em um instrumento fotóptico denominado agregômetro. O plasma enriquecido de plaquetas é colocado em contato com agentes agregantes. Ocorre, então, a formação crescente de grandes agregados plaquetários, acompanhados de diminuição da turbidez da amostra. A mudança na densidade ótica é transmitida pelo instrumento, em porcentagem de agregação. Os agentes agregantes normalmente utilizados no teste são ADP (adenosina difosfato), colágeno, adrenalina, ácido araquidônico e ristocetina. A disfunção plaquetária poderá ser observada em algumas condições clínicas, como insuficiência renal e desordens mieloproliferativas (BAJAR, 2000).

## 2.4 - Pragas Causadoras de Doenças de Plantas.

### 2.4.1 – Bactérias Fitopatogênicas *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* e *Clavibacter michiganensis*, *michiganensis*.

Bactérias fitopatogênicas são agentes causadores de numerosas doenças de plantas, algumas delas de grande significado econômico e social. No Brasil, e em particular no Estado de São Paulo, verifica-se a ocorrência de bactérias de vários importantes gêneros, como é o caso de *Acidovorax*, *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Clavibacter*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* e *Xylella*.

Dentre estes, adquire especial importância algumas espécies do gênero *Xanthomonas*. Por exemplo, cancrose dos citros (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*), o crestamento bacteriano do feijoeiro (*X. axonopodis* pv. *phaseoli*), a podridão negra das crucíferas (*X. campestris* pv. *campestris*), a mancha oleosa do maracujazeiro (*X. campestris* pv. *passiflorae*, Figura 3), a bacteriose dos cereais e gramíneas (*X. translucens*) e a bacteriose da mandioca (*X. axonopodis* pv. *manihotis*), ressaltando que algumas destas culturas são consideradas de subsistência para populações de baixa renda.

Bactérias patogênicas gram-positivas *Cavibacter michiganensis michiganensis* (Figura 4) pertencentes à família Microbacteriaceae, são patógenos que infectam plantas de tomateiro e a sua difusão ocorre através do xilema, causando murcha e cancro, uma das doenças mais importantes do tomateiro do ponto de vista econômico (Bactérias patogênicas gram-positivas *Cavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis* actinomicetos pertencentes à família Microbacteriaceae, são patógenos que infectam plantas de tomateiro e a sua difusão ocorre através do xilema, causando murcha e cancro, uma das doenças mais importantes do tomateiro do ponto de vista econômico (GARTEMANN *et al.*, 2003).



Figura 3 - Sintomas de mancha bacteriana em folhas de maracujazeiro (*Passiflora* spp.) causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* (SOUZA & MELETI, 1997).

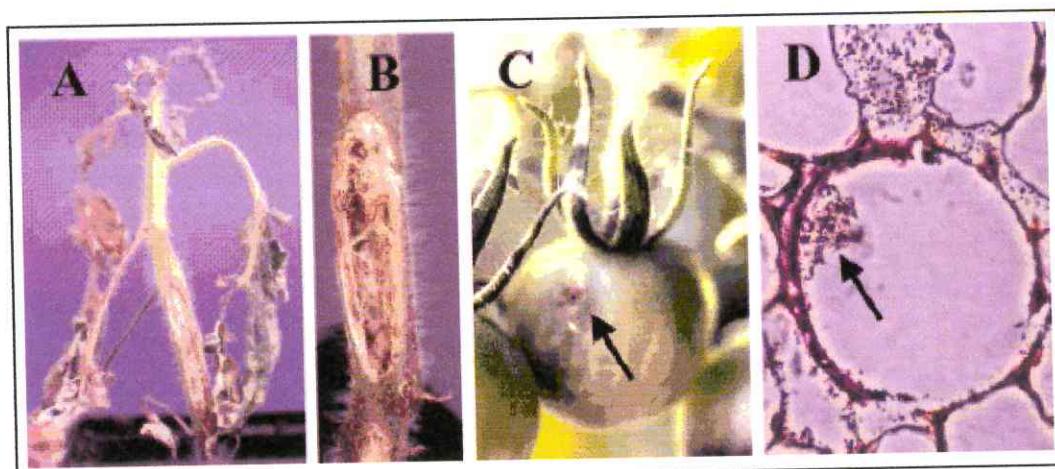


Figura 4. - Sintomas da doença da planta do tomateiro após a infecção com *Clavibacter michiganensis*, *michiganensis*. (A) Murcha bactericida da planta do tomateiro em estádio avançado. (B) Cancro da haste. (C) Mancha (olho de pássaro) no fruto do tomateiro (indicado pela seta). (D) Visão microscópica do xilema infectado com *C.michiganensis*, *michiganensis*. Parede do vaso do xilema já parcialmente destruído pelas enzimas da bactéria (GARTEMANN *et al.*, 2003).

#### 2.4.2 – Fitonematóide *Meloidogyne incognita*.

As perdas causadas na agricultura pelos nematóides formadores de galhas, *Meloidogyne* spp, são tidos como os mais importantes (CAMPOS, 1992), pois têm ampla distribuição geográfica, apresentam enorme gama de hospedeiros e causam grandes danos às culturas. As plantas afetadas por *Meloidogyne* spp. tornam-se mais suscetíveis a outros fitopatógenos (*Rhizoctonia solani*, *Fusarium* spp. e *Macrophomina phaseolina*), ficam menos resistentes a estresses, especialmente hídricos, não respondem satisfatoriamente às práticas de adubação e causam redução na notulação por *Rizobium* (BAKER *et al.*, 1994; STANGARLIN *et al.*, 1999). A infecção por nematóide da espécie *Meloidogyne* spp. causam sérios danos para as plantas tanto na parte aérea como nas raízes. Os principais danos que se pode observar são no tamanho desigual das plantas, deficiências minerais de diversas intensidades, murchamento, desfolhamento, alterações das características varietais, consequentemente tem-se uma redução na produção podendo muitas vezes causar até a morte da planta (CAMPOS, 1999).

A procura de novas alternativas para controle de nematóide, menos agressiva para o meio ambiente, é extremamente importante uma vez que, esta praga cada vez mais tem representado um sério problema para os sistemas de produção agrícola. Uma possível alternativa para este controle consiste na utilização de lectinas uma vez que, estas conseguem reconhecer e ligar-se a carboidratos como N-acetylglucosamina presente na cutícula destes fitonematóides, bem como na membrana que recobre os ovos, podendo assim afetar a mobilidade, eclosão e possivelmente causar a morte dos indivíduos.

### **3 - OBJETIVO GERAL**

O presente trabalho teve como objetivo isolar, purificar, caracterizar e verificar efeitos biológicos de uma lectina de sementes de *Acacia farnesiana* (família: Leguminosae; subfamília: Mimosoideae; tribo: Acacieae).

#### **3.1 - Objetivos Específicos**

- Isolar e purificar a lectina de sementes de *Acacia farnesiana* presente na fração albumina, através de métodos cromatográficos;
- Caracterizar química e físico-quimicamente uma lectina de sementes de *Acacia farnesiana* presente na fração das albuminas;
- Estabelecer a seqüência N-terminal das lectinas de sementes de *Acacia farnesiana* presente na fração das albuminas;
- Verificar a atividade antinociceptiva através do modelo de contorções abdominais em camundongos;
- Verificar as atividades pró e antiinflamatória no modelo de edema de pata em ratos;
- Verificar a ação da lectina sobre a agregação plaquetária;
- Determinar a atividade da lectina sobre as bactérias (*Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*, *Clavibacter michiganensis*, *michiganensis*) e nematóides fitopatogênicos (*Meloidogyne incognita*).

## 4 - MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 - Material Vegetal

No presente estudo foram utilizadas sementes quiescentes de *Acacia farnesiana* (Figura 5) conhecida popularmente como coronha (Família: Leguminosae; Subfamília: Mimosoideae; Tribo: Acacieae) coletadas na Praia do Pacheco, município de Caucaia, Estado do Ceará. O exemplar taxonômico (excicata) encontra-se depositado no Herbário Prisco Bezerra do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará.



Figura 5. - Ramos de *Acacia farnesiana* com flores e frutos.

#### 4.2 – Microorganismos.

Linhagens de bactérias fitopatogênicas gram-negativas, *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* e gram-positivas, *Cavibacter michiganensis*, *michiganensis*, utilizadas neste trabalho foram cultivadas em placa de NA (nutriint agar), enriquecido com peptona e outros nutrientes para o crescimento destas bactérias.

Os nematóides da espécie *Meloidogyne incognita* foram obtidos de plantas infectadas e mantidos no laboratório de Química Orgânica da Universidade Federal do Ceará.

#### 4.3 - Animais

Os experimentos envolvendo animais foram desenvolvidos com camundongos machos, pesando entre 22 e 25 g para testes de atividade antinociceptiva e entre 80 e 150g para os testes de edema de pata. Estes animais foram obtidos do Biotério Central do Campus do Pici da Universidade Federal do Ceará (UFC). Os experimentos foram realizados no Laboratório de Farmacologia dos Canais Iônicos (LAFACI).

Para a realização dos testes de atividade hemaglutinante foram utilizados eritrócitos provenientes de coelhos albinos adultos sadios mantidos no Biotério do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará.

Todos os animais foram mantidos com acesso a ração e água *ad libitum*.

#### 4.4 – Outros materiais

Acrilamida, N,N-metileno bisacrilamida, albumina sérica bovina, Comassie Brilliant Blue G e R, enzimas proteolíticas tripsina, papaína, carragenina, carboidratos simples, complexos e glicoproteínas, proteínas padrões de eletroforese (marcadores) de 12 a 130 kDa foram obtidos da Sigma Chemical Co., St. Louis, USA.

Beta-mercaptopetanol e dodecil sulfato de sódio (SDS), foram obtidas da Merk, Darmstad, Alemanha.

Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

#### 4.5 – Isolamento, Purificação e Caracterização da Lectina da Fração das Albuminas de *Acacia farnesiana*.

##### 4.5.1 - Preparo da Farinha de Sementes de *Acacia farnesiana*.

As sementes quiescentes de *Acacia farnesiana* foram trituradas em moinho elétrico do Tipo Willey, acoplado com peneira de 60 mesh, para a obtenção de uma farinha fina. O material obtido foi delipidado por lavagens sucessivas com n-hexana e seco ao ar livre e em seguida estocado em frascos hermeticamente fechados e mantido à 24 °C no BioMol-Lab até utilização.

##### 4.5.2 - Extração das Proteínas Presentes na Farinha das Sementes de *Acacia farnesiana*.

As proteínas presentes na farinha de sementes de *Acacia farnesiana* foram extraídas com uma solução de NaCl 0,5 M; 1:10 (m/v), sob agitação constante durante 4 horas à temperatura ambiente. A solução foi centrifugada a 9.000 x g por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante (extrato protéico) foi filtrado em papel de filtro, submetido à diálise contra água (20 trocas) para a separação das frações das albuminas e globulinas, sendo que foi armazenada uma aliquote do extrato protéico para a dosagem posterior de proteínas e ensaios da atividade hemaglutinante, junto com as demais frações obtidas. O resíduo da farinha foi submetido a extrações seqüenciais para obtenção das glutelinas ácidas e básicas e das prolaminas, descritas no item 4.5.4. O resíduo final foi descartado.

#### 4.5.3 - Dosagem de Proteínas Solúveis nos Extratos das Sementes de *Acacia farnesiana*.

Para verificar o teor de proteínas solúveis nos extratos e nas diferentes frações utilizou-se o método descrito por BRADFORD (1976). Resumidamente, a cada 100 µL de amostra em diferentes concentrações, foram adicionados 2,5 mL do reagente de Bradford. A mistura foi deixada em repouso por dez minutos, e em seguida, fez-se a leitura da absorbância a 595 nm em um espectrofotômetro VIS LKB Novaspec II (Pharmacia). A concentração de proteínas foi determinada a partir de uma curva padrão obtida usando-se albumina sérica bovina como proteína padrão.

O teor de proteínas solúveis nos eluatos cromatográficos foi analisado em espectrofotômetro UV/VIS Genesys 5 (Spectronic) utilizando uma absorbância a 280 nm, comprimento de onda normalmente utilizado para se estimar teores protéicos relativos.

#### 4.5.4 - Fracionamento Protéico do Extrato Total de *Acacia farnesiana*.

A farinha *Acacia farnesiana* foi submetida à extração, com NaCl 0,5 M sob agitação por três horas. Após a extração o material foi centrifugado 9.000 x g a 4 °C por 20 minutos. Em seguida, a amostra foi filtrada. O sobrenadante foi dialisado exaustivamente contra água e centrifugado, obtendo-se assim, as frações das albuminas (sobrenadante) e globulinas (precipitado). O resíduo da farinha foi submetido a uma nova extração com etanol 70 % (1:5) por uma hora e centrifugado nas mesmas condições para a obtenção da fração das prolaminas (sobrenadante). A seguir, o novo resíduo foi extraído com HCl 0,1 M por uma hora e centrifugado nas condições descritas acima, resultando na fração das glutelinas ácidas (sobrenadante). Finalmente, o último resíduo foi extraído com NaOH 0,1 M por uma hora, seguido de centrifugação nas mesmas condições, obtendo-se assim as glutelinas básicas. Cada extração obtida por centrifugação a 9.000 x g a 4 °C por 20 minutos foi posteriormente dialisada, liofilizada e armazenada em frascos hermeticamente fechados para posteriores determinações. A obtenção destas frações, através da solubilidade em diferentes soluções extratoras, seguiu aproximadamente a metodologia descrita por OSBORNE (1919).

#### 4.5.5 - Determinação da Atividade Hemaglutinante.

A atividade hemaglutinante dos extratos e das diferentes frações protéicas foi realizada de acordo com o método descrito por CAVADA (1980). Sintetizando, as amostras foram submetidas a diluições duplas seriadas (1:2, 1:4, 1:8, ...) com tris - HCl 0,1 M, pH 7,4, conteúdo NaCl 0,15 M e, a 100 µL de cada diluição, foi adicionado igual volume de uma suspensão de eritrócitos a 2 % em NaCl 0,15 M. O material foi então incubado a 37 °C por 30 minutos, e quando necessário, por 12 horas e deixado em repouso à temperatura ambiente por mais 30 minutos, quando, então, os títulos de hemaglutinação foram determinados como sendo o inverso da maior diluição que é capaz de apresentar aglutinação visível a olho nu.

#### 4.5.6 - Ensaio de Inibição da Atividade Hemaglutinante.

Os ensaios de inibição da atividade hemaglutinante por açúcares simples foram feitos segundo metodologia descrita por RAMOS (1998).

Inicialmente foram preparadas diluições seriadas de cada açúcar a partir de soluções estoques de 0,1 M em NaCl 0,15 M. Em seguida, foi adicionada a cada tubo 25 µL de solução de lectina contendo 4 U.H. O material foi incubado em estufa por 30 minutos a 37 °C e deixado em repouso por 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados em todos os tubos, 25 µL de uma suspensão a 2 % de hemácias de coelho sem tratamento. Procedeu-se nova incubação nas mesmas condições anteriores e a determinação dos títulos de hemaglutinação foi feita macroscopicamente e microscopicamente, utilizando-se como padrão a atividade hemaglutinante da mesma solução de lectina na ausência do inibidor. A inibição foi determinada como sendo a menor concentração de açúcar e/ou glicoproteína capaz de inibir uma solução de lectina contendo 4 U.H.

4.5.6 - Cromatografia de Afinidade em Coluna de Quitina (Polímero de N-acetilglicosamina) da Lectina da Fração das Albuminas de Sementes de *Acacia farnesiana*.

Uma alíquota ( $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  de NaCl 0,5 M) da fração das albuminas de sementes *Acacia farnesiana* foi aplicada em coluna de quitina ( $v = 10 \text{ mL}$ ) previamente equilibrada com solução de NaCl 0,5 M. A amostra aplicada foi deixada em contato por 4 horas, a fim de permitir um tempo maior de interação com a coluna. Após remoção do material não retido, o material retido (lectina) foi eluído por gravidade com solução de glicina 0,1 M, pH 9,0; contendo NaCl 0,15 M, com coleta manual de 2 mL por fração e monitorada a 280 nm. Os picos obtidos foram dialisados (20 trocas) contra água, liofilizados e estocados a 5 °C, para serem utilizados posteriormente nas demais determinações.

4.5.7 - Cromatografia de Exclusão Molecular em Coluna de Sílica Gel (TSK-GEL 3000SW 0,8 x 30 cm) Acoplada a um Sistema de Alta Performance (Sistema ÄKTA) da Lectina da Fração das Albuminas de Sementes de *Acacia farnesiana*.

A cromatografia de exclusão molecular foi realizada com 1 mg da lectina da fração das albuminas de *Acacia farnesiana* (AFAL) proveniente do pico não retido (PI) e do pico retido (PII) da coluna de quitina. Uma amostra da AFAL (Pico I e II) na concentração de  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  diluída com solução de NaCl 0,5 M. A amostra foi centrifugada por 5 minutos a 1500 rpm e o sobrenadante foi submetido a cromatografia de exclusão molecular em coluna de sílica gel (TSK-GEL3000SW 0,8 mm x 30 cm) acoplada a um sistema de alta performance (Sistema ÄKTA). A AFAL foi eluida com a solução de equilíbrio da coluna, com fluxo constante de  $0,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  e monitorada a 280 nm.

4.5.8 - Cromatografia de Troca iônica em Coluna de Amônio Quaternário (Mono Q HR 5/5) Acoplada a um Sistema de Cromatografia de Alta Performance (SistemaÄKTA) da Lectina da Fração das Albuminas de Sementes de *Acacia farnesiana*.

A fração das albuminas (1 mg) de sementes de *Acacia farnesiana* foi submetida à cromatografia de troca iônica em coluna de amônio quaternário (Mono Q HR 5/5) acoplada a um sistema de cromatografia de alta performance (Akta System). A amostra foi dissolvida em 1 mL da solução de equilíbrio e aplicada na coluna de troca iônica (1,0 x 1,7 cm) previamente equilibrada com solução de tris-HCl, 0,1 M a pH 7,0. Após remoção do material não retido através de lavagem com o tampão de equilíbrio, o pico retido na coluna e que apresentou atividade hemaglutinante, portanto a lectina, foi eluído com um fluxo de 1 mL·min<sup>-1</sup> com o tampão de equilíbrio contendo NaCl em um gradiente linear de 0-1 M. As absorbâncias foram monitoradas 280 nm e coletadas manualmente. O pico obtido foi dialisado exaustivamente contra água, liofilizado e estocado a 5° C para análises posteriores.

4.5.9 – Determinação da Massa Molecular por Espectrometria de Massa da Lectina da Fração das Albuminas de Sementes de *Acacia farnesiana*.

A massa molecular da proteína nativa da fração das albuminas de sementes de *Acacia farnesiana* foi determinada em espectrômetro de massa MALDI-TOF/MS (Matrix assisted Laser Desorption Time-Of-Flight Mass Spectrometry) PE Biosystems Voyager DE-STR operando a 20 kV em modo linear. A matriz utilizada para a ionização da amostra foi ácido sinapínico.

#### 4.5.10 - Cromatofocalização em Coluna Mono P HR 5/5 Acoplada a um Sistema de Cromatografia de Alta Performance (ÄKTA) da Lectina da Fração das Albuminas de Sementes de *Acacia farnesiana*.

A lectina da fração das albuminas de sementes de *Acacia farnesiana* (AFAL) (1 mg), purificada por troca iônica como descrito anteriormente, foi submetida à cromatofocalização em coluna Mono P HR 5/5 (1,0 x 17cm) acoplada a um sistema de cromatografia de alta performance (ÄKTA System), como tentativa de determinação do ponto isoelétrico. Para tanto, a amostra foi dissolvida em 1 mL da solução de tris - HCl, 25 mM a pH 7,5 e aplicada na coluna, previamente equilibrada com solução de dissolução da amostra. Após remoção do material não retido através de lavagem com o tampão de equilíbrio, a lectina foi eluída com um gradiente linear de pH de 7 a 4 utilizando-se pollybuffer 74, com leitura de absorbância a 280 nm e um fluxo constante de 1 mL.min<sup>-1</sup>.

#### 4.5.11 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com SDS e 2-Mercaptoetanol.

Os experimentos de eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS e 2-mercaptoetanol foram realizados segundo a técnica descrita por LAEMMLI (1971), adaptada para uso de géis de separação em placas. O gel de aplicação (contendo 3,5 % de poliacrilamida) foi montado em tampão tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 e SDS a 1 %. O gel de separação (contendo 12 % de poliacrilamida) foi montado em tampão tris-HCl 3 M, pH 8,8, contendo SDS a 1 %.

As amostras liofilizadas, obtidas das diferentes frações protéicas e das diferentes cromatografias foram submetidas à eletroforese na concentração de 1 mg.mL<sup>-1</sup> dissolvidas em tampão tris - HCl 0,0625 M, pH 8,3, contendo SDS a 1%, 2 – mercaptoetanol 5%, e azul de bromofenol a 0,02% (tampão de amostra) e incubadas a 100° C por 10 minutos. Aplicou-se 10 µL da amostra nos poços previamente feitos no gel de aplicação e realizou-se a corrida eletroforética a uma corrente constante 40 mA com voltagem variável entre 124-150 Volts por um período de 4 horas. Ao final da corrida, o

gel foi corado com Commassie Brilliant Blue R-250 a 0,05%, preparado em uma solução de metanol, ácido acético e água (1 : 3,5 : 8 v/v/v), por um período de 12 horas e o excesso do corante retirado com uma solução de metanol, ácido acético e água (1 : 3,5 : 8 v/v/v), permitindo assim a visualização das bandas protéicas. Proteínas de massas moleculares conhecidas foram utilizadas como padrão para o estabelecimento da massa aparente da proteína em estudo.

**4.5.12 - Cromatografia de Exclusão Molecular (Protein Pack 300SW-Glass) Acoplada a um Sistema de Cromatografia de Alta Performance (HPLC) da Lectina de Fração das Albuminas de Sementes de *Acacia farnesiana*.**

A lectina (AFAL) fração das albuminas da farinha de sementes de *Acacia farnesiana* (1 mg) foi dissolvida em 200 µL de tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,4, contendo CaCl<sub>2</sub> 0,01 mM, centrifugado a 4.500 x g por 5 minutos para obtenção do 15 µL deste sobrenadante foram aplicados na coluna de exclusão molecular (Protein Pack 300SW-Glass, 0.8 x 30 cm) acoplada a um sistema de HPLC, sendo que a coluna foi previamente equilibrada com o mesmo tampão de diluição. A corrida cromatográfica foi feita em um fluxo constante de 0,1 mL·min<sup>-1</sup> e monitorada a 280 nm.

**4.5.13 - Cromatografia de Fase Reversa em Coluna C<sub>18</sub> Acoplada a um Sistema de Cromatografia de Alta Performance (HPLC) da Lectina da Fração das Albuminas de Sementes de *Acacia farnesiana*.**

A lectina purificada proveniente da coluna de exclusão molecular (Protein Pack 300SW-Glass) foi submetida a uma segunda cromatografia usando uma coluna de fase reversa acoplada ao HPLC. A amostra foi dissolvida em 200 µL de TFA 0,1% (tampão A) até a completa dissolução seguida por clarificação usando uma centrifugação de 4500 x g por 3 minutos. O sobrenadante foi então injetado numa coluna de fase reversa (0.3 x 30 cm-µ-Bondapack C<sub>18</sub>) acoplada a um sistema de HPLC. A eluição da proteína foi feita

usando um gradiente de tampão B (66,6% de acetonitrila em TFA 0,1%) em um fluxo constante de  $1,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ . A corrida cromatográfica foi monitorada a 214 nm e a fração obtida foi, em seguida, liofilizada.

#### 4.5.14 - Determinação do Peso Molecular e Oligomerização da Lectina da Fração das Albuminas de Sementes de *Acacia farnesiana* por meio de Cromatografia de Exclusão Molecular

Aproximadamente 1 mg da proteína purificada (lectina), obtida depois das cromatografias de exclusão molecular (Protein Pack 300SW-Glass) e de fase reversa acoplada a HPLC, foi repassada na coluna de exclusão molecular em tempos diferentes, para analisar possível oligomerização tempo dependente da proteína. Para tanto, a amostra foi dissolvida em 200  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,4; 0,01 mM CaCl<sub>2</sub>) até completar a dissolução e em seguida separado por centrifugação a 4.500 x g por 5 minutos. Aproximadamente 75  $\mu\text{L}$  do sobrenadante obtido foi recuperado e incubado a 37°C. Depois deste procedimento, 15  $\mu\text{L}$  da fração foram aplicados em HPLC utilizando uma coluna de exclusão molecular (Protein Pack 300SW-Glass, 0.8x30cm) previamente equilibrada com o mesmo tampão de diluição. A corrida cromatográfica foi feita com fluxo constante de  $0,1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  e monitorada a 280 nm. Este protocolo foi usado em três condições diferentes de incubação da amostra. No primeiro tempo, depois da centrifugação, a amostra foi injetada direto na coluna, seguido das duas outras injeções realizadas 90 e 180 minutos após a centrifugação.

#### 4.5.15 - Sequenciamento e Determinação do N-Terminal da Lectina (AFAL) da Fração das Albuminas de Sementes de *Acacia farnesiana*.

Dois miligramas da lectina purificada da fração das albuminas da farinha de sementes de *Acacia farnesiana* (AFAL) foram dissolvidos em 200  $\mu\text{L}$  de cloridrato de guanidina 6 M (Merck, Darmstadt, Germany) contendo 0,4 M de tris-HCl e 2 mM de

EDTA (pH 8,15). A solução de proteína foi deixada em nitrogênio por 15 minutos, reduzida com 200 µL de DTT 6 M e carboximetilada com ácido iodoacético  $^{14}\text{C}$ -ácido iodoacético gelado. Esta solução foi incubada no escuro a 37° C por uma hora e aplicada a uma coluna de Sephadex G25 (0.7 x 12 cm) eluída com tampão ácido acético 1 M. A lectina reduzida e carboximetilada (RC-Lec) foi liofilizada e estocada a - 80° C. Aproximadamente 2 nmols.mL<sup>-1</sup> da RC-lec foram dissolvidos em 100 µL de solução de acetonitrila (66% de acetonitrila em TFA 0,1%) e a determinação do N-terminal foi conduzida usando um seqüenciador automático (Applied Biosystem). Os aminoácidos foram marcados com feniltiodantoina (PTH) e identificados pela comparação com o tempo de retenção de 20 aminoácidos padrões. Peptídeos contendo  $^{14}\text{C}$ -CM-Cys foram monitorados por detecção usando níveis de radioatividade detectada por um contador de cintilação líquida (Beckman model L-250).

#### 4.5.16. - Análise de aminoácidos da Fração da Lectina das Albuminas de Sementes de *Acacia farnesiana*.

A análise da composição de aminoácidos da fração das albuminas de sementes de *Acacia farnesiana* foi realizada com analisador de aminoácidos Beckman System Gold.

Para tanto, as amostras foram hidrolizadas com HCl 6 M a 110° C por 24 horas e acondicionados em ampolas lacradas. Após a hidrólise, a ampola foi aberta e o HCl e fenol evaporados, sob pressão reduzida, em presença de NaOH. O hidrolisado foi lavado com água grau milli-Q e seco sob pressão reduzida em presença de pentóxido de fósforo. Depois de seca, a amostra foi redissolvida em tampão citrato de sódio pH 2,2, filtrada em membrana de 0,45 µm (Millipore) e submetida ao analisador, previamente padronizado com padrões comerciais dos 20 aminoácidos naturais.

#### 4.6 – Testes de Atividades Biológicas Utilizando a Lectina da Fração das Albuminas de Sementes de *Acacia farnesiana* (AFAL).

A lectina de AFAL foi testada quanto a capacidade de agregar plaquetas, atividade pró e antiinflamatória, na nocicepção. Também foi verificada a atividade sobre fitobactérias (*Xanthomonas axonopods* pv. *passiflorae*) e *Clavibacter michiganensis*, *michiganensis*) e fitonemátoides (*Meloidogyne incognita*).

##### 4.6.1 - Ensaios de Agregação Plaquetária Utilizando a Lectina da Fração das Albuminas de Sementes de *Acacia farnesiana*.

Os ensaios de agregação plaquetária tiveram como finalidade verificar se a AFAL apresenta atividade coagulante. Para verificar esta atividade, amostras de sangue foram coletadas de voluntários sadios que não consumiram nenhum medicamento a pelo menos 14 dias antes da coleta de sangue. O sangue foi coletado em seringas de polipropileno estéreis e transferido imediatamente para tubos de polipropileno estéreis (tipo falcon) contendo citrato trisódico a 0,38% na solução final do tubo. A amostra de sangue foi então centrifugada por 20 minutos a 150 x g para obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP, platelet-rich plasma), que foi usado dentro das três primeiras horas do ensaio. Para a preparação das plaquetas lavadas, o PRP foi recentrifugado em presença de 50 nM de prostaciclina a 800 x g por 10 minutos para obter o “pellet” plaquetário. O sobrenadante foi recolhido e o “pellet” suspenso em tampão fisiológico (150 mM de NaCl; 5 mM de HEPES; 0,55 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 7 mM de NaHCO<sub>3</sub>; 2,7 mM de KCl; 0,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 5,6 mM de glicose; que foi ajustado com solução de fosfato monobásico a pH 7,4) e diluído para uma contagem de plaqueta de  $3 \times 10^8$  plaquetas .mL<sup>-1</sup>. As plaquetas foram então deixadas em repouso afim de recuperar sua capacidade agregante em presença de agentes indutores de agregação plaquetária. A contagem de plaquetas foi feita em um contador Coulter S Plus (Coulter Electronics, Hialeah, FL, USA) ou por microscopia de contraste de fase. A medida da agregação plaquetária foi feita em um agregômetro de plaquetas Chrono-log Lumiaggregometer (Chrono-Log Corp, Haverton, PA, USA)

usando alíquotas de 0,45 mL de plaquetas mantidos a 37ºC sob agitação constante a 1200 rpm com agitador magnético.

#### 4.6.2 - Modelo Experimental para a Avaliação da Atividade Pró-inflamatória.

A atividade pró-inflamatória foi realizada com o intuito de avaliar o efeito da lectina da fração das albuminas de sementes de *Acacia farnesiana* (AFAL) na formação do edema de pata.

##### 4.6.2.1 - Teste da Atividade Pró-inflamatória em Modelo de Edema de Pata Utilizando a Lectina da Fração das Albuminas de Sementes de *Acacia farnesiana*.

O volume da pata direita posterior de cada animal foi medido pleismograficamente antes da injeção da lectina da fração das albuminas de *Acacia farnesiana* (AFAL; 0,01; 0,1 e 1 mg.kg<sup>-1</sup>), sendo a administração desta lectina feita por via subcutânea intraplantar injetada na proporção de 0,1 mL.100<sup>-1</sup> g de peso corporal (solução em salina estéril), recebendo o controle negativo somente salina estéril. Os volumes das patas foram medidos 30 min, 1, 2, 3 e 4 h após a administração da AFAL. O edema foi calculado como a diferença entre o volume de líquido deslocado pelas patas em um determinado tempo após o estímulo e antes do estímulo (tempo zero). O cálculo da área sob a curva (ASC) também foi realizado usando o método do trapézio (LANDUCCI *et al.*, 1995). Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias e comparados àqueles obtidos das patas dos animais que foram injetados somente com salina estéril (controle negativo).

#### 4.6.3 – Modelo Experimental para Avaliação da Atividade Antiedematogênica.

A atividade antiedematogênica foi realizada com a finalidade de avaliar o efeito da lectina da fração das albuminas sobre a formação de edema de pata induzido por carragenina e dextrana.

##### 4.6.3.1 – Teste de Atividade Antiinflamatória em Modelo de Edema de Pata Utilizando a Lectina da Fração das Albuminas de Sementes de *Acacia farnesiana*

Para a avaliação da atividade antiedematogênica da lectina sobre o edema de pata induzido por estímulos inflamatórios clássicos (carragenina e dextrana), a AFAL foi administrada, em solução, nas doses de 0,01; 0,1 e 1 mg.kg<sup>-1</sup> por via endovenosa 30 min antes da injeção subcutânea intraplantar destes agentes flogísticos. O controle positivo de edema foi o grupo administrado com carragenina ou dextrana subcutânea e o controle negativo, foi o grupo de animais tratados com salina endovenosamente e subcutânea.

#### 4.6.4 – Modelo Experimental para Avaliação da Atividade Antinociceptiva Utilizando a Lectina da Fração das Albuminas de Sementes de *Acacia farnesiana*.

O teste da atividade antinociceptiva teve como finalidade avaliar o efeito da lectina da fração das albuminas de sementes de *Acacia farnesiana* (AFAL) sobre as contorções abdominais induzidas com ácido acético.

#### 4.6.4.1 - Teste das Contorções Abdominais Induzidas por Ácido Acético.

O teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético é capaz de determinar a atividade antinociceptiva periférica. Para tanto, a metodologia utilizada seguiu o modelo proposto por VANDER-WENDE & MARGOLIN (1956) para ratos, e modificada por KOSTER *et al.*, 1959, para camundongos. As contorções abdominais foram induzidas por administração intraperitoneal de 0,1 mL de ácido acético 1 % (v/v) para cada 10 g de peso corporal. Em seguida foi feita à contagem do número de contorções durante 20 min, sendo iniciada a contagem 10 min após a injeção do ácido. Meia hora antes da avaliação, os animais do grupo controle receberam salina estéril endovenosamente e os animais do grupo tratado receberam doses diferentes da lectina da fração das albuminas de *Acacia farnesiana* ( $0,1 \text{ mg.Kg}^{-1}$ ;  $1 \text{ mg.Kg}^{-1}$  e  $10 \text{ mg.Kg}^{-1}$ ) endovenosamente.

#### 4.7 –Atividade antibacteriana (*Xanthomonas axonopodis* pv *passiflorae*, *Clavibacter michiganensis*, *michiganensis*) e antinematóide (*Meloidogine incognita*) da Lectina da Fração das Albuminas de Sementes de *Acacia farnesiana* (AFAL).

Estes testes de atividade biológica tiveram como finalidade avaliar o efeito da AFAL sobre as fitobactérias, *Xanthomonas axonopodis* pv *passiflorae*, *Clavibacter michiganensis*, *michiganensis* e fitonematóides, *Meloidogine incognita*, objetivando o posterior uso desta proteína como agente ao combate a estas pragas que causam grandes danos à agricultura.

#### 4.7.1 - Atividade Antibacteriana da Lectina da Fração das Albuminas de Sementes de *Acacia farnesiana* Sobre *Xanthomonas axonopodis pv passiflorae*, *Clavibacter michiganensis*, *michiganensis*.

Para determinar a atividade antibacteriana de *Xanthomonas axonopodis pv passiflorae*, *Clavibacter michiganensis*, *michiganensis* foi utilizado a metodologia descrita por OLIVEIRA *et al.*, (2002). As linhagens de bactérias foram cultivadas em placa de NA (nutriint agar), enriquecido com peptona e demais nutrientes para o crescimento das bactérias e, após o tempo de incubação, amostras das bactérias crescidas em meio NA foram coletadas e suspensas em tampão fosfato 0,01 M, pH 7,4, em presença de peptona a 1%. Aliquotas da suspensão bacteriana foram ajustadas até uma concentração mãe de  $10^3$  UFC.ml<sup>-1</sup>, ajustando a absorbância da solução mãe em A650 nm = 0,3 unidade de absorbância. Observação (1cc em unidade inglesas = 1 mL no sistema internacional). Esta suspensão inicial previamente ajustada foi então diluída a uma concentração bacteriana de  $1 \times 10^{-5}$  UFC.mL<sup>-1</sup> (concentração final) que foi usada para incubação com a lectina na concentração de 150 µg, previamente diluídas em salina 0,15 M, seguido então de incubação de 20 a 30 minutos. Após este período, cerca de 250 µL desta suspensão foi então aplicada sobre placas de Petri em NA e então procedeu-se a uma incubação em estufa a 37 °C durante 48 h, sendo que foram feitas repetições com n variando de 8 a 12. As amostras foram posteriormente analisadas em microscopia de varredura descrita no item 7.4.3.

#### 4.7.2 - Inibição da Atividade Antibacteriana da Lectina da Fração das Albuminas de Sementes de *Acacia farnesiana* Sobre Fitobactérias *Xanthomonas axonopodis pv passiflorae*, *Clavibacter michiganensis*, *michiganensis* com Diferentes Açúcares.

Os testes de inibição da atividade antibacteriana foram feitos com diferentes açúcares (glicose, galactose, manose, N-acetylglucosamina, arabinose, rafinose e frutose) e tiveram como finalidade avaliar a reversão da atividade da AFAL sobre fitobactérias *Xanthomonas axonopodis pv passiflorae*, *Clavibacter michiganensis*, *michiganensis*. Para

isso foi utilizado uma alíquota da suspensão bacteriana diluídas a uma concentração de  $10^{-5}$  CFU.mL<sup>-1</sup> e incubadas com a lectina já tratada com açúcares (100 mM) por 30 minutos. Após o tempo decorrido da incubação, 100 µL de cada tratamento foram espalhados nas placas contendo 20 mL de meio NA. Os experimentos foram realizados com 5 repetições. As placas preparadas foram incubadas em condições de escuro a 28 °C, por 48 a 72 horas e analisadas posteriormente por contagem das colônias de bactérias. As concentrações mínimas foram estimadas como descrito por HULTMARK *et al.*, (1982).

#### 4.7.3 – Análise por Microscopia eletrônica de varredura da Atividade da Lectina da Fração das Albuminas de Sementes de *Acacia farnesiana* Sobre Fitobactérias *Xanthomonas axonopodis* *pv passiflorae*, *Clavibacter michiganensis*, *michiganensis*.

Para verificar a atividade da lectina sobre as bactérias *Xanthomonas axonopodis* *pv passiflorae*, *Clavibacter michiganensis*, *michiganensis*, utilizou-se a microscopia eletrônica de varredura. As amostras foram examinadas após o tempo de incubação das bactérias com ou sem proteínas. Após o tempo de incubação as amostras de bactérias foram fixadas a 4 °C em 0,1 M de tampão cacodilato, pH 7,4, contendo 2,5 % de glutaraldeído por 12 horas para serem preparadas em microscopia eletrônica de varredura. As amostras de bactérias fixadas foram colocadas em filtros de policarbonato (tamanho de poro: 1 µm, Millipore) “lavadas” com tampão de cacodilato 0,1 M e desidratadas com soluções crescentes de etanol. As amostras foram então cobertas com uma fina película de ouro usando um E5200 Autospotter coater. As análises de microscopia eletrônica de varredura foram feitas usando microscópio eletrônico de varredura Cambridge Stereoscan S240.

#### 4.7.4 - Obtenção e Manutenção de Nematóides do Segundo Estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*

Raízes infectadas (com galhas) por *Meloidogyne incognita* foram colhidas, lavadas e colocadas em papel toalha para retirar o excesso de água. As galhas foram seccionadas e delas se extraíram os ovos do nematóide pela técnica de HUSSEY & BARKER (1973). Para facilitar a visualização desses ovos nos testes subseqüentes, estes foram distribuídos em tubos de 50 mL, que foram centrifugados a 420 g (aproximadamente 1400 rpm) por 5 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi eliminado e o precipitado ressuspenso em solução de sacarose 1 M, e posteriormente centrifugado a 420 g por 60 segundos. O novo sobrenadante obtido foi cuidadosamente vertido em peneira de 0,025 mm para a retenção dos ovos. Estes foram quantificados em microscópio de objetiva invertida para utilização nos testes subseqüentes (JENKINS, 1993).

Câmaras de eclosão foram preparadas empregando-se placas de Petri de 4,5 cm de diâmetro, colocando-se nelas peneiras formadas por tecido poliéster com abertura de 0,025 a 0,030 mm fixado em anéis de PVC de 40 mm x 10 mm. Em cada câmara adicionou-se 5 mL da suspensão de ovos. Os nematóides juvenis do estádio 2 (J2) eclodidos que migrarem para a placa foram retirados diariamente. A seguir, as peneiras com os ovos foram novamente colocadas em outra placa de Petri com água recentemente colhida. Os J2, assim obtidos, foram empregados nos testes com as diferentes soluções contendo a lectina da fração albumina de sementes de *Acacia farnesiana* (AFAL).

#### 4.7.5 – Ensaios *in vitro* da Ação da Lectina da Fração das Albuminas de Sementes de *Acacia farnesiana* (AFAL) Sobre a Eclosão dos ovos e Mobilidade de Nematóides da Espécie *Meloidogyne incognita*.

Nestes ensaios foi avaliado o efeito *in vitro* da lectina na eclosão e mobilidade de fitonematóides do segundo estádio juvenil (J2) da espécie *Meloidogyne incognita*. Para tanto, foram realizados ensaios diferenciados para avaliar o efeito da AFAL na eclosão e

mobilidade de *Meloidogyne incognita*. Foram utilizados nematóides no estádio de ovo, e juvenis de segundo estádio (J2). Estes foram incubados com soluções da proteína (em NaCl 0,15 M) na concentração de 100, 200 e 300  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  na avaliação de inibição de mobilidade e para os ensaios de inibição da eclosão foi usada a concentração única de 500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Com relação à eclosão dos ovos, os experimentos foram avaliados de 24 em 24 horas, por meio da quantificação da porcentagem de juvenis do segundo estágio (J2) eclodidos. Conforme o material-teste foi retirado da câmara de eclosão para avaliação dos J2 eclodidos, novo volume do mesmo material foi novamente colocado na câmara de eclosão para a próxima avaliação. Foi calculada a porcentagem de J2 eclodidos cada 24 horas durante 4 dias de incubação da massa de ovos nos diferentes tratamentos em prova.

Já no que se refere à mobilidade dos J2, esta foi avaliada de acordo com a técnica proposta por HUANG *et al.* (1983). Para tanto, foram colocados (em pequenos vidros 1 mL da solução NaCl 0,15 M com nematóides eclodidos nas últimas 24 horas) em contato com cada um dos tratamentos em prova (concentrações da lectina). Transcorridas 24 horas de contato, procedeu-se à contagem, quando se quantificou como imóveis aqueles que permanecessem com o corpo completamente distendido, em proporção ao total de J2 observados. A avaliação da mobilidade foi realizada 24 e 48 horas após a exposição dos J2 aos diferentes tratamentos.

#### 4.7.6 - Análise Estatística da Atividade da Lectina da Fração das Albuminas de Sementes de *Acacia farnesiana* Sobre Fitopatógenos *Xanthomonas axonopodis* *pv passiflorae*, *Clavibacter michiganensis*, *michiganensis* e *Meloidogyne incognita*.

A análise estatística dos testes com as fitobactérias comprova a veracidade dos dados. Todos os resultados dos ensaios com bactérias foram expressos como média e desvio padrão após a análise de todas as repetições ( $n=5$ ), sendo realizadas análises de variância para analisar as diferenças. O teste de Dunnett's foi utilizado para comparar os diferentes grupos, com limite de confiança de 5%.

Os diferentes ensaios com os fitopatógenos *Meloidogyne incognita* foram estabelecidos com um arranjo dos tratamentos dentro de delineamentos inteiramente casualizados com quatro repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, e na comparação das médias de tratamentos foi utilizado o teste de Tukey a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram processadas pelo programa computacional SANEST (ZONTA & MACHADO, 1984).

## 5 - RESULTADOS

### 5.1 - Teor de Proteínas Solúveis e Atividade Hemaglutinante nas Frações Protéicas de *Acacia farnesiana*.

Os resultados da dosagem de proteínas solúveis, atividade hemaglutinante e atividade específica testadas frente eritrócitos de coelho das frações protéicas da farinha de sementes de *Acacia farnesiana* estão apresentados na Tabela 2.

As frações protéicas da farinha das sementes de *Acacia farnesiana* apresentaram atividade hemaglutinante contra hemácias de coelho tratadas ou não com as enzimas proteolíticas, com exceção da fração das glutelinas básicas que não apresentou atividade hemaglutinante com nenhuma destas hemácias. A fração das globulinas apresentou o mais elevado teor de proteínas solúveis ( $\text{mgP.gF}^{-1}$ ) e a fração das prolaminas a maior atividade específica (unidades de hemaglutinação por miligrama de proteína,  $\text{UH.mgP}^{-1}$ ), porém apresentou um baixo teor de proteínas solúveis.

Tabela 2 - Teor de Proteínas Solúveis e Atividade Hemaglutinante nas Frações Protéicas de *Acacia farnesiana*.

Frações	Proteínas ( $\text{mgP.gF}^{-1}$ )	Atividade hemaglutinante ( $\text{UH.gF}^{-1}$ )			$\text{UH.mgP}^{-1}* \text{ }$
		Hemácias normais	Hemácias papainizadas	Hemácias tripsinizadas	
Albuminas	5,5	640	640	640	116,36
Globulinas	5,9	640	640	640	108,47
Glut. ácidas	4,2	640	640	640	152,38
Glut. básicas	0,5	-	-	-	-
Prolaminas	0,5	640	640	640	1280,00

\*Atividade hemaglutinante específica ( $\text{UH.mgP}^{-1}$ )

## 5.2 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida 12% em Presença de SDS e $\beta$ -Mercaptoetanol.

Para analisar o perfil protéico de cada fração e a massa molecular aparente e assim dar início ao processo de purificação da (s) lectina (s), utilizamos a PAGE-SDS.

As frações protéicas de *Acacia farnesiana*, quando submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS e  $\beta$ -mercaptoetanol, mostraram um perfil protéico muito semelhante com uma banda que predomina em todas as frações com massa molecular aparente em torno de 50 kDa (Figura 6). Além disto, a fração das albuminas apresentou mais duas bandas bem evidentes, uma com massa molecular aparente de aproximadamente 35,0 kDa e outra de 29,0 kDa e a fração das prolaminas apresentou outra banda bem definida com massa molecular aparente em torno de 29,0 kDa.

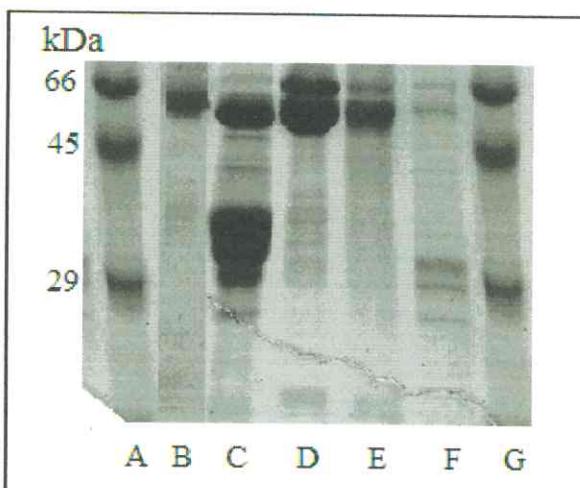


Figura 6 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% em presença de SDS e  $\beta$ -Mercaptoetanol. Poço B: Globulinas; Poço C: Albuminas; Poço D: Glutelinas ácidas; Poço E: Glutelinas básicas; Poço F: Prolaminas; Poço A e G: Marcadores de massas moleculares aparentes: Albumina sérica bovina (66 kDa); Ovoalbumina (45 kDa); Anidrase carbônica (29 kDa).

5.3 - Cromatografia de Afinidade em Coluna de Quitina (Polímero de N-acetilglicosamina) e de Exclusão Molecular em Sílica Gel (TSK-GEL 3000SW 0,8 x 30 cm) da Fração das Albuminas de Sementes de *Acacia farnesiana*.

Na tentativa de isolar a lectina presente na fração das albuminas da farinha de sementes de *Acacia farnesiana* realizou-se a cromatografia de quitina (afinidade) seguida de cromatografia de exclusão molecular e PAGE-SDS.

A fração das albuminas da farinha de sementes de *Acacia farnesiana*, quando cromatografada em coluna de quitina apresentou um pico não retido (PI) e um retido (PII) (Figura 7 - A), ambos com atividade hemaglutinante e o mesmo perfil eletroforético, como mostra a Figura 7 - B. Além disso, ambos os picos, quando submetidos à cromatografia de exclusão molecular em coluna de sílica (TSK-GEL 3000SW 0,8 x 30 cm), apresentaram o mesmo perfil cromatográfico (Figura 7 - C) caracterizado por dois picos com atividade hemaglutinante. Para melhor esclarecer estes resultados e no intuito de purificar a lectina da fração das albuminas da farinha de sementes de *Acacia farnesiana* utilizou-se a cromatografia de troca iônica em coluna de amônio quaternário.

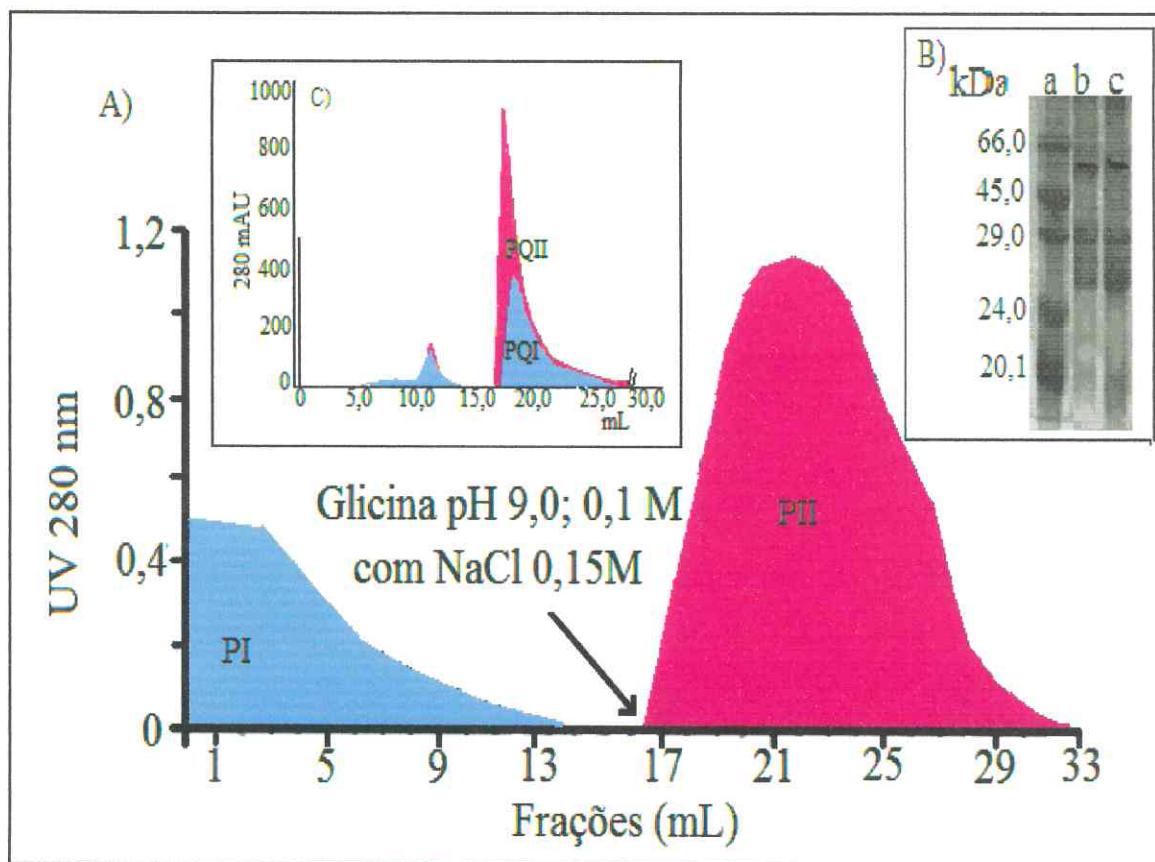


Figura 7 – (A) Cromatografia de afinidade em coluna de quitina (10 mL) da fração das albuminas de *Acacia farnesiana*. Uma alíquota da fração albumina (5 mg/1mL) foi aplicada na coluna equilibrada com NaCl 0,5 M, após 4 horas foi eluída com tampão glicina pH 9,0; 0,1 M com NaCl 0,15 M com coleta manual de 2 mL por fração, apresentou PI (■) e PII (■). (B) Eletroforese em gel de poliacrilamida 12 % em presença de SDS e 2-mercaptopoetanol. Linha a: marcadores de massa molecular (Albumina sérica bovina, 66 kDa; Ovoalbumina, 45 kDa; Anidrase carbônica, 29 kDa; Tripsinogênio, 24 kDa; Tripsina, 20,1 kDa). Linha b: Pico I, linha c: Pico II. A Figura C - Cromatografia de exclusão molecular da lectina da fração das albuminas de sementes de *Acacia farnesiana*. Os PIQ (■), e do PIIQ (■) ( $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) proveniente da cromatografia de quitina foram submetidos à cromatografia de exclusão molecular (TSK-GEL 3000SW). A eluição foi realizada em um fluxo de  $0,5 \text{ mL.min}^{-1}$  com tampão tris- HCl, pH 7,5; 25 mM. A eluição da proteína foi monitorada a 280 nm e coleta manualmente em frações de 1 mL.

5.4 - Cromatografia de Troca iônica em Coluna de Amônio Quaternário (Mono Q HR 5/5; 1 x 1,7 cm) Acoplada a um Sistema de Cromatografia de Alta Performance (Sistema ÄKTA) da Lectina da Fração das Albuminas de Sementes de *Acacia farnesiana*.

Para dar suporte aos resultados descritos no item 5.3 fez-se necessário a utilização da cromatografia de troca iônica.

A fração das albuminas de farinha de sementes de *Acacia farnesiana* foi submetida à cromatografia de troca iônica de amônio quaternário apresentou um pico não retido (PI) sem atividade hemaglutinante e um pico retido (PII) onde encerra toda a atividade hemaglutinante, eluído com uma concentração salina de 42 % de NaCl em um gradiente linear salino de 0-1 M, como mostra a Figura 8 - A. A eluição da amostra foi monitorada espectrofotometricamente através da absorbância a 280 nm. Quando o pico retido foi analisado em PAGE-SDS apresentou duas bandas protéicas de massa molecular aparente em torno de 50 kDa e outra de 29 kDa (Figura 8 - B).

5.5 - Ensaio de Inibição da Atividade Hemaglutinante por Açúcares Simples, Complexos e Glicoproteínas da Fração das Albuminas de Sementes de *Acacia farnesiana* (AFAL).

No intuito de melhor caracterizar esta proteína realizou-se o ensaio de inibição por açúcares.

O ensaio de inibição da atividade hemaglutinante por açúcares da fração das albuminas de *Acacia farnesiana* proveniente da troca iônica de amônio quaternário, apresentado na Tabela 3, mostra que nenhum dos açúcares ou glicoproteínas testadas foram capazes de inibir a atividade hemaglutinante da lectina presente na fração das albuminas. Estes resultados demonstraram que é necessário a utilização de outros açúcares para caracterizar proteína com relação à interação lectina/açúcar. Para poder determinar a massa molecular real da lectina foi utilizada a técnica de espectrometria de massa.

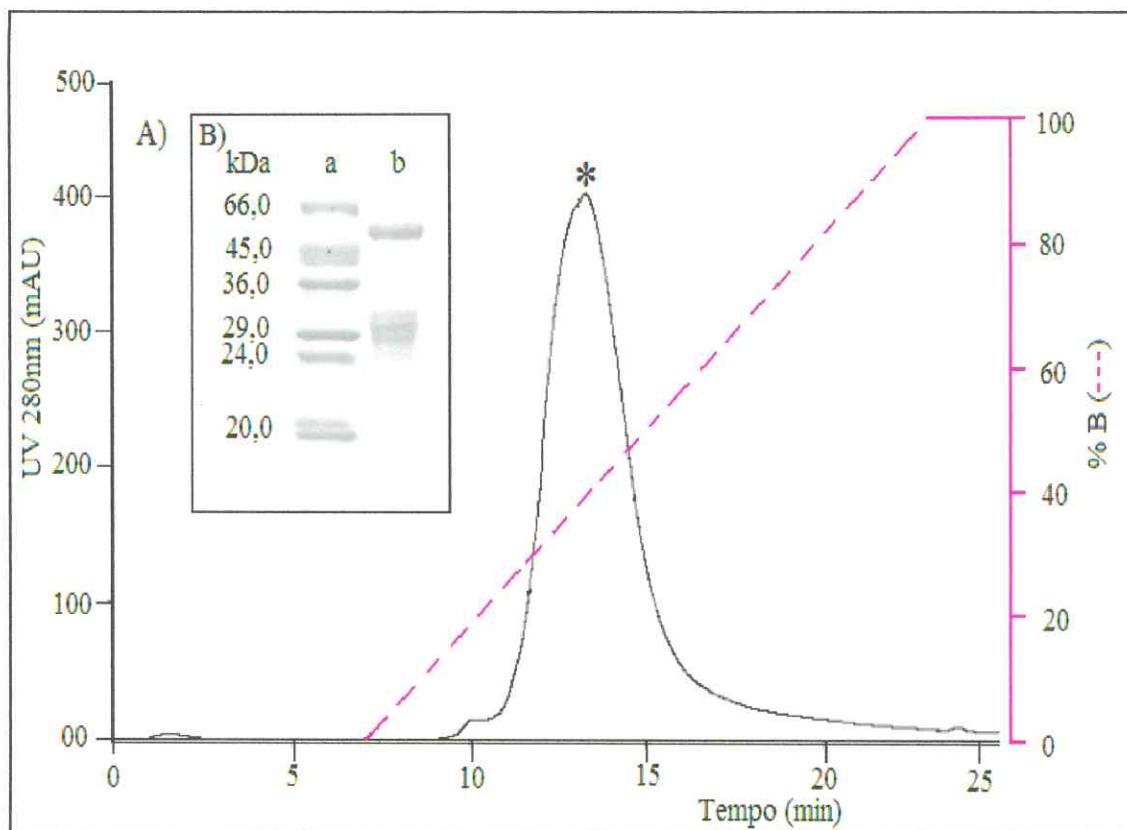


Figure 8 - (A) Cromatografia de troca iônica da lectina da fração das albuminas de sementes de *Acacia farnesiana*. A fração das albuminas ( $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), proveniente da farinha de sementes de *Acacia farnesiana*, foi submetida à cromatografia de troca iônica em coluna de amônio quaternário (Mono-Q HR 5/5). A eluição da proteína foi realizada em um fluxo de  $1.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  com gradiente linear (0-1 M) de NaCl em tampão tris-HCl, pH 7,5; 25 mM e monitorada a 280 nm. \* Indica o pico retido apresentando atividade hemaglutinante. (B) SDS-PAGE da proteína purificada da fração das albuminas da farinha de sementes de *Acacia farnesiana*. Linha a: Marcadores de massa molecular (albumina sérica bovina 66 kDa, ovoalbumina 45 kDa, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase 36 kDa, anidrase carbônica 29 kDa, tripsinogênio pancreático bovino 24 kDa, inibidor de tripsina de soja 20 kDa). Linha b: AFAL (lectina da fração das albuminas de sementes de *Acacia farnesiana*).

Tabela 3 – Ensaio de Inibição da Atividade Hemaglutinante por Açúcares Simples, Complexos e Glicoproteínas da Fração das Albuminas de *Acacia farnesiana*.

Açúcares	Limites de Aglutinação	
	Observação macroscópica	Observação ao microscópio
Glicose	NI	NI
Manose	NI	NI
D-Galactose	NI	NI
D-Nacetilgalatosamina	NI	NI
D-Nacetilglicosamina	NI	NI
Fucose	NI	NI
Lactose	NI	NI
$\alpha$ metilmanosídeo	NI	NI
GLcNAc 2 a 8 resíduos	NI	NI
Ovomucóide	NI	NI

NI = Não inibiu mesmo na concentração de 0,1M

### 5.6 - Espectro de massa MALDI-ToF/MS da Lectina da Fração das Albuminas de *Acacia farnesiana* (AFAL).

Para verificar a massa real de o pico retido da troca iônica, portanto, a lectina da fração das albuminas de *Acacia farnesiana*, foi submetida a espectrometria de massa em Espectrômetro de massa MALDI-ToF/MS, onde obteve-se as massa molecular real da lectina.

O resultado de espectrometria de massa da AFAL mostra que esta lectina apresenta um íon duplamente carregado de 12,1 kDa ( $m + H$ )<sup>+2</sup>, um monômero com massa molecular de 24,2 kDa ( $m + H$ )<sup>+</sup>, e um dímero com massa molecular de 50,0 kDa (2 $m + H$ )<sup>+</sup>, evidenciando que a AFAL possui subunidades com a mesma massa molecular (Figura 9).

Com base nos resultados obtidos e para verificar o comportamento da proteína em um gradiente de pH realizou-se a cromatofocalização.

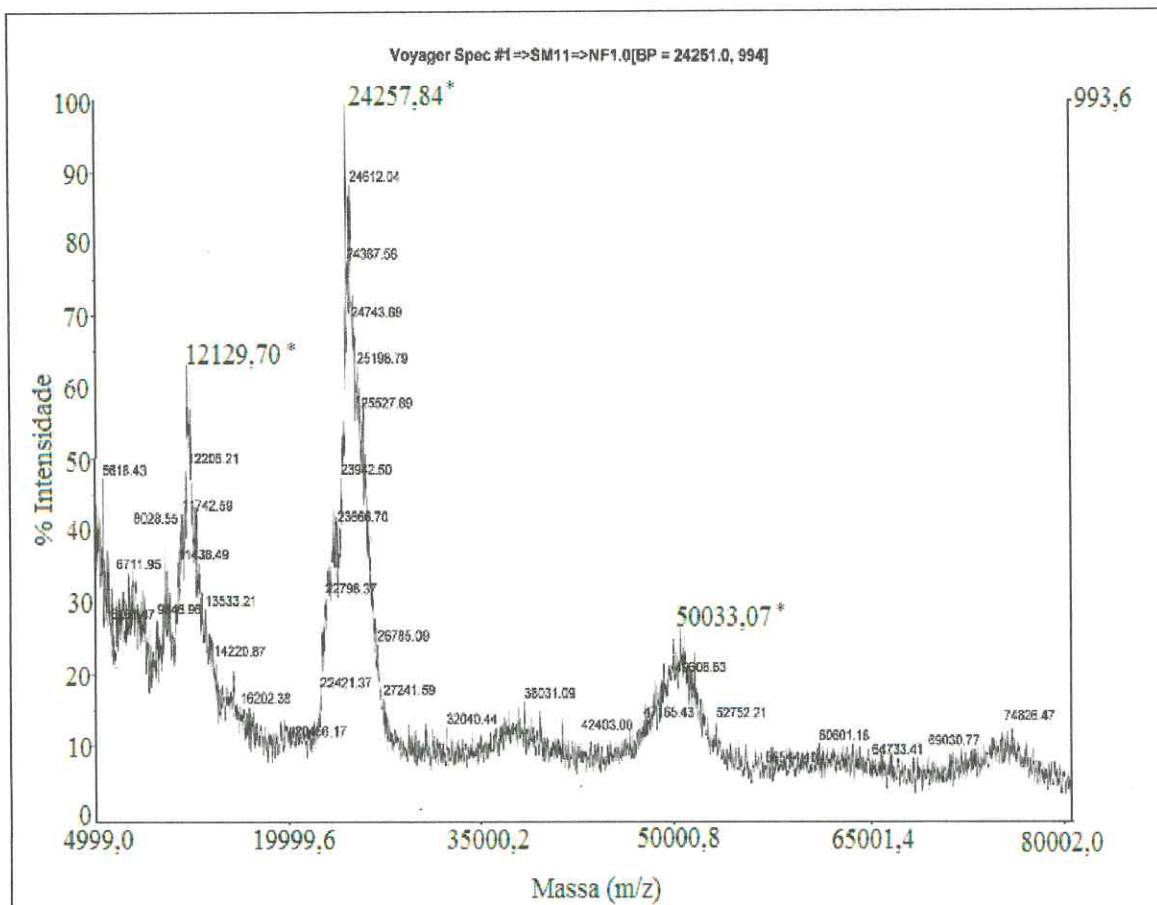


Figura 9. - Espectro de massa MALDI-ToF/MS da lectina da fração das albuminas de *Acacia farnesiana* (pico retido da troca iônica). \* Massa molecular aparente de 12,7 kDa (íon duplamente carregado), 24,2 kDa (monômero) e 50,0 kDa (dímero).

### 5.7 - Cromatofocalização da Lectina da Fração das Albuminas de Sementes de *Acacia farnesiana* (AFAL) em Coluna Mono P HR 5/5 (1,0 x 17 cm) Acoplada a um Sistema de Cromatografia de Alta Performance (Sistema ÄKTA).

Para determinar o comportamento da proteína em um gradiente de pH e determinar em que pH a lectina apresenta carga líquida igual a zero, submeteu-se a lectina a cromatofocalização.

A lectina da fração albumina de sementes de *Acacia farnesiana* (AFAL) (1 mg), purificada por troca iônica foi submetida à chromatofocalização em coluna Mono P HR 5/5 (1,0 x 17 cm) para a determinação do ponto isoelétrico. A AFAL retida na coluna foi eluída com um gradiente linear de pH de 7 a 4, utilizando-se pollybuffer 74, com leitura de absorbância a 280 nm e um fluxo constante de  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ . A análise do cromatograma obtido mostra que a AFAL apresenta um pI (ponto isoelétrico) igual a 4,0 (Figura 10).

A partir dos resultados obtidos e para melhor caracterizar utilizamos a chromatografia de exclusão molecular.

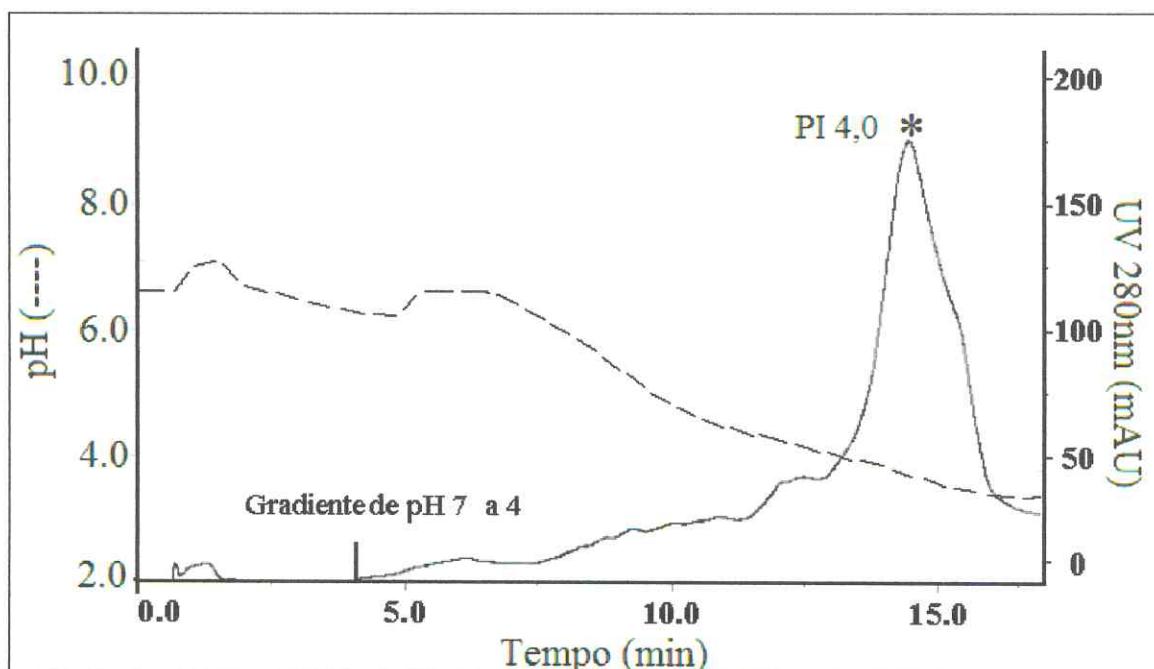
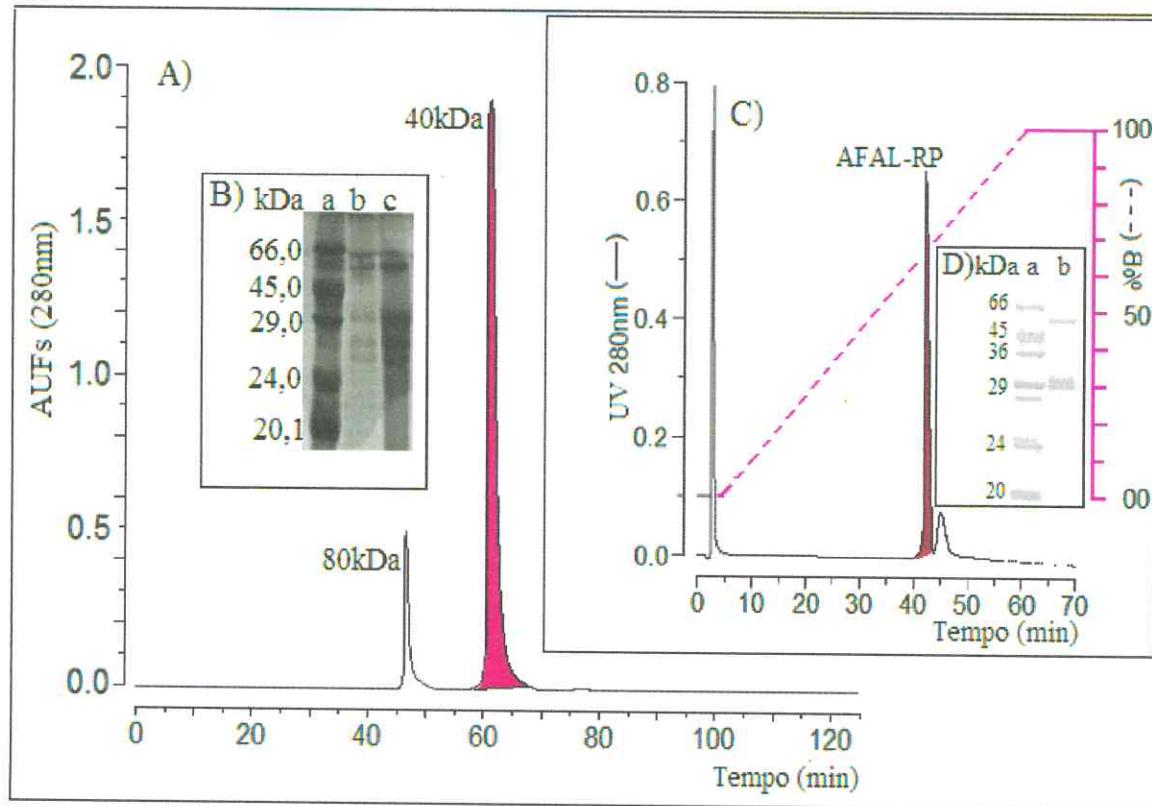


Figura 10 - Cromatofocalização da lectina da fração das albuminas de sementes de *Acacia farnesiana* (AFAL). A lectina da fração albumina de *Acacia farnesiana* ( $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) proveniente do pico retido da cromatografia de troca iônica em coluna de amônio quaternário (Mono-Q HR 5/5) foi submetida à cromatofocalização em coluna Mono-P HR 5/5. A lectina foi eluída com um gradiente linear de pH de 7 a 4 utilizando-se pollybuffer 74, com leitura de absorbância a 280 nm e um fluxo constante de  $1 \text{ mL.min}^{-1}$ . \* Indica o ponto isoelétrico da lectina.

5.8. - Cromatografia de Exclusão Molecular (Protein Pack 300SW-Glass) e Cromatografia em Fase Reversa da Lectina da Fração das Albuminas de Sementes de *Acacia farnesiana* (AFAL) em Coluna C<sub>18</sub> Acoplada a um Sistema de Cromatografia de Alta Performance (HPLC)

Para verificar o comportamento e a massa molecular aparente dessa lectina utilizamos à cromatografia de exclusão molecular.

A lectina da fração das albuminas de sementes de *Acacia farnesiana*, proveniente do pico retido (PII) da cromatografia de troca iônica em coluna de amônio quaternário, foi utilizada para a cromatografia de exclusão molecular (Figura 11 – A). Esta cromatografia, realizada com a lectina diluída e aplicada diretamente na coluna (tempo zero), revelou a presença de dois picos protéicos com massas moleculares aparentes de aproximadamente 40 kDa e outro de 80 kDa. A análise eletroforética por PAGE-SDS (Figura 11 - B) dos picos desta cromatografia mostrou que ambos apresentam o mesmo perfil eletroforético, evidenciando assim o fenômeno de oligomerização da lectina. A cromatografia de fase reversa (Figura 11 - C) foi realizada repassando o pico que apresentou uma massa molecular de aproximadamente 40 kDa proveniente da primeira cromatografia de exclusão molecular, obtendo-se dois picos próximos eluídos entre 40 e 50 minutos a partir de uma concentração de 63 % de acetonitrila. A eletroforese em gel de poliacrilamida (Figura 11 - D) destes picos apresenta duas bandas características desta proteína, com massas moleculares aparentes de 50 kDa e de 29 kDa.



Figuras 11 - Gráfico de exclusão molecular onde foi usada a proteína no tempo zero (A), seguida por uma cromatografia em coluna de fase reversa HPLC em  $\mu$ -Bondapack C<sub>18</sub> (0,3 x 30 cm) (C). (B e D) SDS-PAGE da lectina purificada da fração das albuminas de sementes de *Acacia farnesiana* pico I e pico II (B) da chromatografia de exclusão molecular e pico I (AFAL-RP) (C) da chromatografia de fase reversa HPLC em  $\mu$ -Bondapack C<sub>18</sub> (0,3 x 30 cm). Linha a: Marcadores de massa molecular (albumina sérica bovina 66 kDa, ovoalbumina 45 kDa, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase 36 kDa, anidrase carbônica 29 kDa, tripsinogênio pancreático bovino 24 kDa, inibidor de tripsina de soja 20 kDa). Linha b: AFAL (lectina da fração das albuminas de sementes de *Acacia farnesiana*).

### 5.9 - Determinação da Massa Molecular Aparente e da Oligomerização da Lectina da Fração das Albuminas de *Acacia farnesiana* por Cromatografia de Exclusão Molecular.

Para complementar e dar um maior suporte aos dados obtidos no item 5.8 a lectina foi submetida a cromatografia de exclusão molecular em tempos diferentes de incubação.

Para verificar a oligomerização da proteína purificada (1 mg da lectina AFAL), obtida por exclusão molecular (Protein Pack 300SW-Glass) e fase reversa acoplada a HPLC, a lectina foi repassada na coluna de exclusão molecular em tempos diferentes de incubação a 37 °C. O cromatograma da Figura 12 – A, apresenta o tempo zero de incubação (lectina diluída e aplicada imediatamente na coluna de exclusão molecular) da lectina da fração das albuminas de sementes de *Acacia farnesiana*, onde verifica-se um pico de menor absorbância a 280 nm, que indica uma menor concentração da lectina com massa molecular aparente de 80 kDa, eluído a 45 minutos e um pico de maior absorbância a 280 nm que indica uma maior concentração da lectina com massa molecular aparente de aproximadamente 40 kDa (eluído a 62, 5 minutos). Após 90 minutos de incubação observa-se um aumento do pico eluído a 45 minutos com massa molecular aparente de 80 kDa e uma diminuição do pico eluido a 62,2 minutos com massa molecular aparente de 40 kDa (Figura 12 - B). A Figura 12 - C apresenta a AFAL aplicada na coluna de exclusão molecular após 180 minutos de incubação 37 °C onde observa-se o aparecimento de um novo e principal pico com massa molecular de superior a 120 kDa, eluído a 180 minutos. Os cromatogramas das Figuras 12 - A, 12 - B e 12 - C demonstram claramente que a AFAL sofre oligomerização dependente do tempo de incubação. E para dar maior suporte aos resultados até então demonstrados a lectina foi submetida a seqüenciamento e determinação do N-terminal.

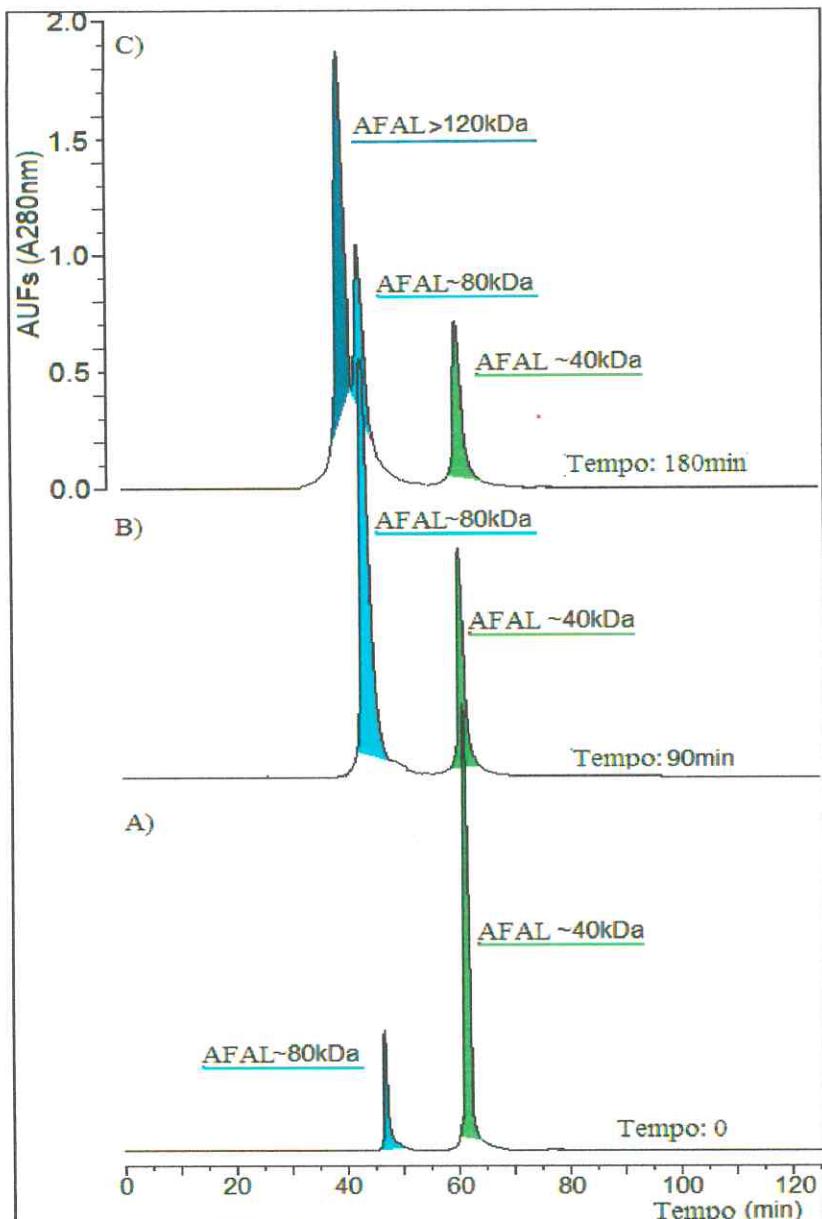


Figura 12. Gráficos da Cromatografia de exclusão molecular da lectina da fração das albuminas de sementes de *Acacia farnesiana* em Coluna (Protein Pack 300SW da Waters), onde se evidencia a oligomerização da lectina AFAL em função do tempo de incubação a 37 °C. No gráfico A verificamos a lectina em tempo zero de incubação (lectina diluída e aplicada), no gráfico B e C a lectina AFAL incubada nos tempos 90 e 180 minutos a 37 °C , respectivamente. A eluição da lectina foi feita com tampão fosfato de sódio, 0,1 M, pH 7,4 em presença de Ca<sup>2+</sup>, fluxo 0,1 mL·min<sup>-1</sup> e leitura de absorbância a 280 nm.

### 5.10 - Seqüenciamento e Determinação do N-terminal da Lectina da Fração das Albuminas de Sementes de *Acacia farnesiana*.

No intuito de determinar a seqüência N-terminal da lectina e assim poder complementar os resultados, esta proteína foi submetida ao sequenciamento.

A determinação da seqüência N-terminal (Figura 13), da lectina AFAL da fração das albuminas de sementes de *Acacia farnesiana* purificada por cromatografia de fase reversa forneceu uma seqüência de aminoácidos que apresentou similaridade (mesmos resíduos nas mesmas posições) com a seqüência N-terminal de outras proteínas depositadas em bancos de dados (BLAST). Desta forma, a AFAL apresentou similaridade de 87,5 %, 62,1 %, 61,9 %, 61,9 %, 59,1 %, 58,2 %, 40,3 % e 40,3 % com as lectinas de sementes de *Acacia constricta*; PHAE-PHAU (*Phaseolus vulgaris*); PHA-L (*Phaseolus vulgaris*); LEC5\_DOLBI (*Dolichos biflorus*); LEC1\_DOLBI (*Dolichos biflorus*); PHAL\_PHAUU (*Phaseolus vulgaris*); LCS2\_ROBPS (*Robinia pseudoacacia*) e LCS1\_ROBPS (*Robinia pseudoacacia*), respectivamente.

Este resultado foi complementado pela análise de aminoácidos.

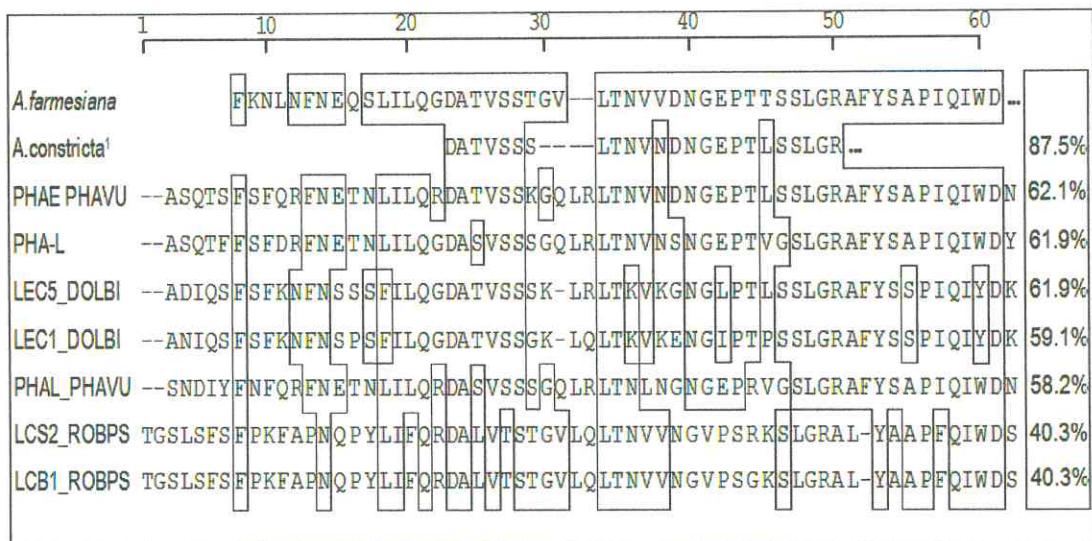


Figura 13 – Seqüência do N-terminal da lectina da fração albumina de *Acacia farnesiana* e a sua similaridade com outras seqüências N-terminal de proteínas depositadas em bancos de dados.

### 5.11 - Análise de aminoácidos da Lectina da Fração das Albuminas de Sementes de *Acacia farnesiana*

Para dar suporte aos resultados até então obtidos a lectina foi submetida a análise de aminoácidos.

A análise de aminoácidos foi realizada com o pico retido da cromatografia de troca iônica coluna de amônio quaternário. Para tanto a amostra foi analisada em analisador de aminoácidos Beckman System Gold. A composição de aminoácidos da proteína AFAL, apresentada na tabela 3, mostra que esta proteína apresenta um maior conteúdo de resíduos de ácido aspártico/asparagina (13,94 %), ácido glutâmico/glutamina (12,19 %) e leucina (11,55 %). Os aminoácidos básicos histidina (1,60 %) e lisina (3,35 %) estão em uma concentração inferior aos demais aminoácidos ácidos nesta espécie. Quando a composição de aminoácidos da lectina isolada da fração albumina de sementes de farinha de *Acacia farnesiana* foi comparada com lectinas das espécies da mesma subfamília *Parkia platycephala* (PPL), *P. discolor* e *P. speciosa*, (Tabela 4) de uma forma geral apresentou valores percentuais para o aminoácido cisteína muito similares (0,51, 0,00, 0,10, 0,50 %, respectivamente). Este conteúdo de cisteína está de acordo com o relatado para a composição de proteínas das sementes de espécies da família leguminosa, que geralmente carecem de aminoácidos sulfurados ou possuem os mesmos em quantidades muito baixas. O aminoácido polar glicina (7,47 %) apresentou-se em menor concentração com valor bem abaixo dos demonstrados para as outras espécies de mesma subfamília Mimosoideae como *Parkia platycephala* (PPL), *P. discolor* e *P. speciosa*.

Com base nos resultados e tendo em vista a necessidade mundial de novos fármacos, que apresentem menos efeitos colaterais e também produtos capazes de serem utilizados no combate a pragas que causam danos a agricultura, elevando assim os custos da produção e muitas vezes agredindo o ambiente, realizou-se as atividades biológicas descritas a seguir na intenção de desvendar uma atividade biológica que pudesse sugerir aplicação terapêutica e/ou biotecnológica para esta lectina.

Tabela 4 - Comparaçao da Composição de Aminoácido da Lectina da Fração das Albuminas de *Acacia farnesiana* com as do Gênero Parkia.

Resíduo de Aminoácido	Lectinas de <i>Acacia</i> <i>farnesiana</i> %	*Lectina de <i>Parkida</i> <i>platycephala</i> %	**Lectina de <i>Parkia</i> <i>discolor</i> %	***Lectina <i>de Parkia</i> <i>speciosa</i> %
Ac. Asp/asparagina	12,19	9,80	9,90	11,30
Ác. Glut/glutamina	13,94	4,70	10,20	5,10
OH- Prolina	Nd	Nd	Nd	Nd
Serina	7,33	9,10	7,90	9,20
Glicina	7,47	15,40	12,80	15,80
Histidina	1,60	2,10	1,70	2,50
Arginina	5,65	1,20	3,30	2,70
Treonina	3,73	6,30	6,00	7,10
Alanina	7,78	6,00	7,30	5,60
Prolina	8,99	13,7	9,10	5,40
Tirosina	2,63	4,30	4,00	4,30
Valina	4,82	4,50	4,40	5,70
Metionina	0,86	0,40	0,50	0,50
Cisteína	0,51	0,00	0,10	0,50
Isoleucina	3,94	7,30	5,90	9,20
Leucina	11,55	3,80	6,20	4,90
Triptofano	Nd	Nd	Nd	Nd
Phenilalanina	3,65	5,70	5,00	6,20
Lisina	3,35	5,60	5,60	4,50

\*FARIAS, 2002\*\*CAVADA *et al.*, 2000\*\*\*SUVACHITTANONT & PEUTPAIBOON, 1992.

Nd: não determinado.

## 5.12 – Testes de Atividades Biológicas Utilizando a Lectina da Fração das Albuminas de Sementes de *Acacia farnesiana* (AFAL).

Para os testes de atividade biológica da AFAL, foi utilizado a lectina em tempo zero (amostra diluída e aplicada), mostram que esta lectina apresenta a capacidade de agregar plaquetas, atua como agente antinociceptivo na nocicepção induzida pelo ácido acético, possui atividade pró-inflamatória e não possui atividade antiinflamatória. Além disso, os experimentos com fitopatógenos mostram que ela apresenta capacidade de inibir o crescimento de fitobactérias (*Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* e *Clavibacter michiganensis*, *michiganensis*) e atuar sobre a eclosão e mobilidade de fitonematóides (*Meloidogyne incognita*).

### 4.12.1 - Ensaios de Agregação Plaquetária Utilizando a Lectina da Fração das Albuminas de Sementes de *Acacia farnesiana*.

Para analisar a atividade da lectina da fração albumina de *Acacia farnesiana* sobre a agregação plaquetária, utilizou-se amostras de sangue, de onde foi retirado o plasma rico em plaquetas que foram tratadas e posteriormente diluídas até uma concentração de  $3 \times 10^8$  plaquetas  $\text{mL}^{-1}$ . As plaquetas foram deixadas em repouso para recuperar a capacidade agregante. A Figura 14 – A, apresenta a medida da agregação plaquetária feita em um agregômetro de plaquetas Chrono-log Lumiaggregometer (Chrono-Log Corp, Haverton, PA, USA). Alíquotas de 0,45 mL de plaquetas de pacientes contendo duas concentrações diferentes 50 e 100 unidades de trombina (controle) que foram colocadas em cubetas de agregômetro mantida a 37 °C sob agitação constante a 1200 rpm com agitador magnético. A Figura 14 – B, mostra a medida da atividade da lectina da fração das albuminas de *Acacia farnesiana* (AFAL, 20 µg) sobre a agregação plaquetária em um tempo de 0-10 minutos. A AFAL atingiu uma percentagem de 85 % de agregação plaquetária em 6 minutos e de 7 a 10 minutos manteve-se com 75 % de agregação.

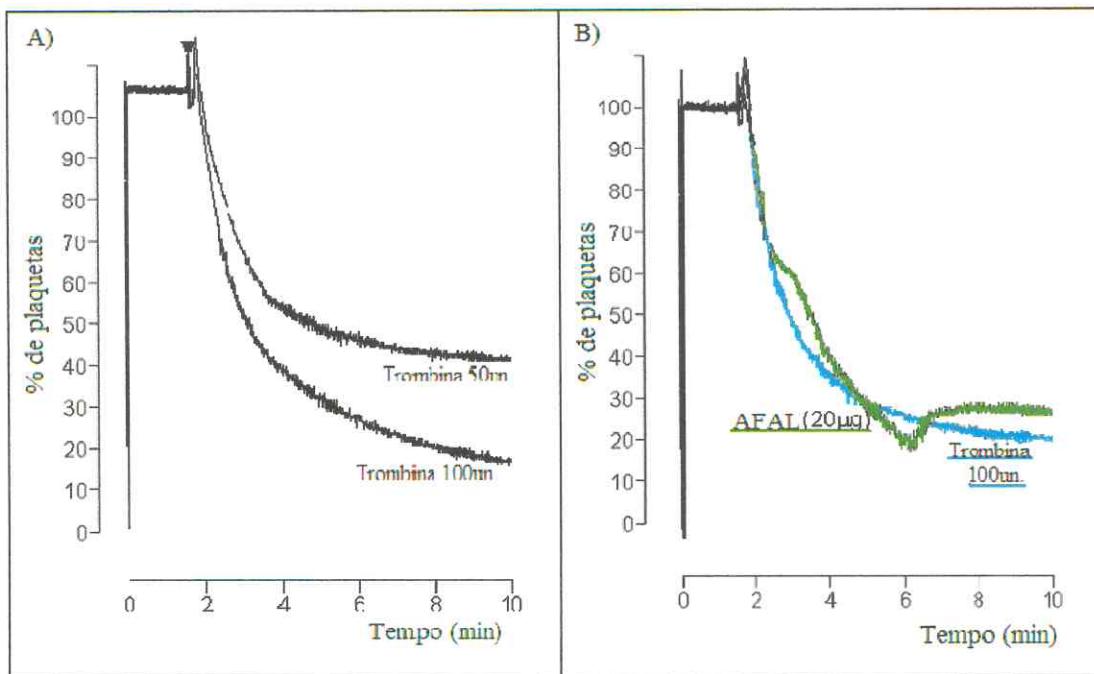


Figura 14. Medidas da agregação plaquetária da trombina e da lectina da fração albumina de *Acacia farnesiana* (AFAL) em um tempo de 0-10 minutos feita em um agregômetro de plaquetas Chrono-log Lumiaggregometer (Chrono-Log Corp, Haverton, PA, USA) usando alíquotas de 0,45 mL de plaquetas de paciente, colocadas em cubetas de agregômetro mantidas a 37° C sob agitação constante a 1200 rpm com agitador magnético. Na Figura A, podemos observar a agregação plaquetária da trombrina, usada como controle positivo de agregação com concentrações de 50 e 100 unidades. Na Figura B, verificamos a agregação plaquetária causada pela trombina usada como controle em 100 unidades (—) e a lectina da fração albumina de *Acacia farnesiana* (AFAL) em uma concentração de 20 µg (---).

#### 5.12.2 - Atividade Pró-inflamatória da Lectina de *Acacia farnesiana* da Fração das Albuminas (AFAL) no Modelo Edema de Pata em Ratos.

Algumas lectinas de planta apresentam efeito pró-inflamatório (BARBOSA *et al.*, 2001). Em função disto, avaliou-se o efeito da AFAL sobre o edema de pata em ratos. A Figura 15 – A, mostra que a AFAL administrada por via subcutânea produziu edema significativamente ( $p<0,05$ ) diferente do grupo salina, em todos os tempos testados, aumentando os volumes das patas.

#### 5.12.3 - Atividade Antiinflamatória da Lectina da Fração das Albuminas de Sementes de *Acacia farnesiana* (AFAL) no Modelo Edema de Pata em Ratos.

A Figura 16 mostra que a AFAL administrada por via endovenosa 30 minutos antes da indução do edema de pata por carragenina ou dextrana e via de administração não foi capaz de reduzir o edema de pata causado estes.

#### 5.12.4 - Atividade Antinociceptiva da Lectina da Fração Albumina de *Acacia farnesiana* (AFAL) - Contorções abdominais induzida por ácido acético

A utilização do modelo clássico das contorções abdominais foi feita, para avaliar o efeito da AFAL sobre outro componente da inflamação, a dor inflamatória. Para isso, utilizou-se ácido acético como indutor das contorções (0,8 %, v/v), administrado por via subcutânea intraplantar. A Figura 17 mostra que o ácido acético, no grupo controle, induziu a nocicepção, com média de 35 contorções. A AFAL nas doses de 0,1, 1 e  $10\text{mg.Kg}^{-1}$  reduziram significativamente ( $p<0,05$ ) o número de contorções em aproximadamente 50, 50 e 74 %, respectivamente.

A AFAL produziu efeito antinociceptivo, embora tenha se mostrado tanto pró-inflamatória no modelo de edema de pata.

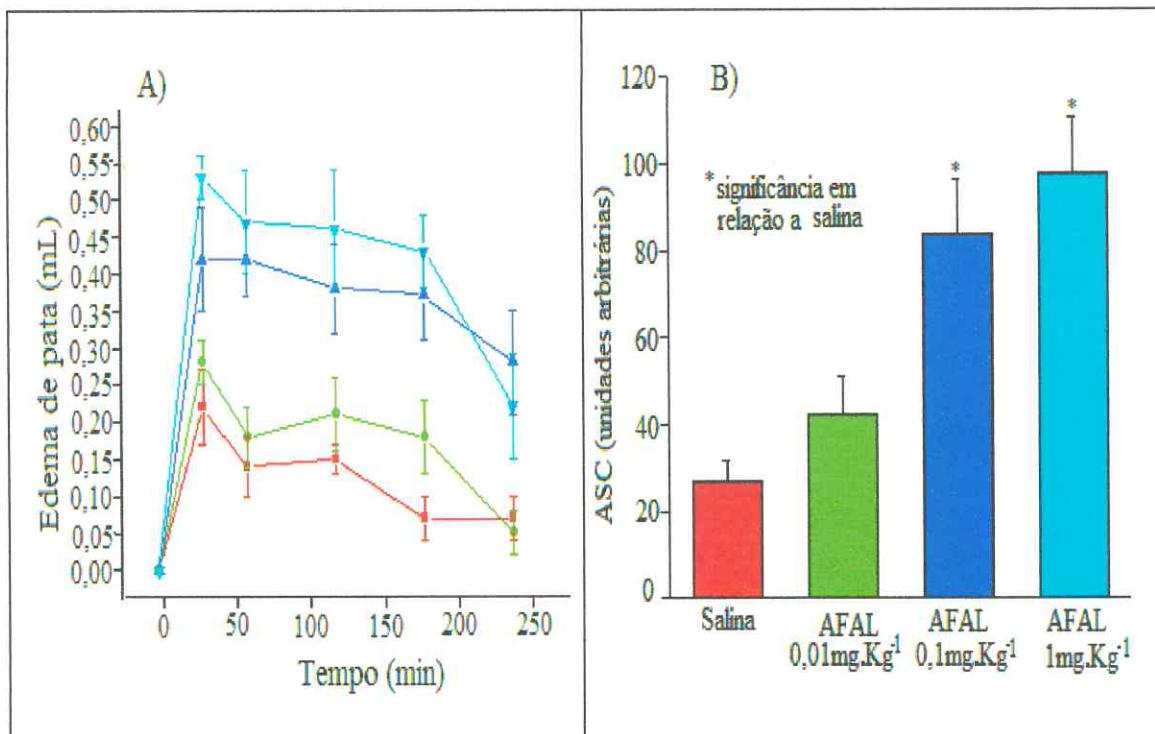


Figura 15. – (A) Efeito da lectina da fração albumina de *Acacia farnesiana* na atividade pró-inflamatória no modelo de edema de pata. O eixo das abscissas representa o tempo (min) decorrido após o início do experimento. O eixo das ordenadas representa a medida dos volumes deslocado pelas patas em mL. A linha indica o grupo controle onde foi injetado somente salina, a linha concentração de 0,01mg de lectina.Kg<sup>-1</sup>, a linha 0,1 mg de lectina.Kg<sup>-1</sup>, e a linha 1 mg de lectina.Kg<sup>-1</sup>. No gráfico B mostra a área sob a curva calculada pela integral e expressa em unidades arbitrárias. O gráfico (B) representa a atividade pró-inflamatória da AFAL em diferentes concentrações (0,01 mg.Kg<sup>-1</sup> , 0,1 mg.Kg<sup>-1</sup> e 1 mg.Kg<sup>-1</sup> ; salina ).

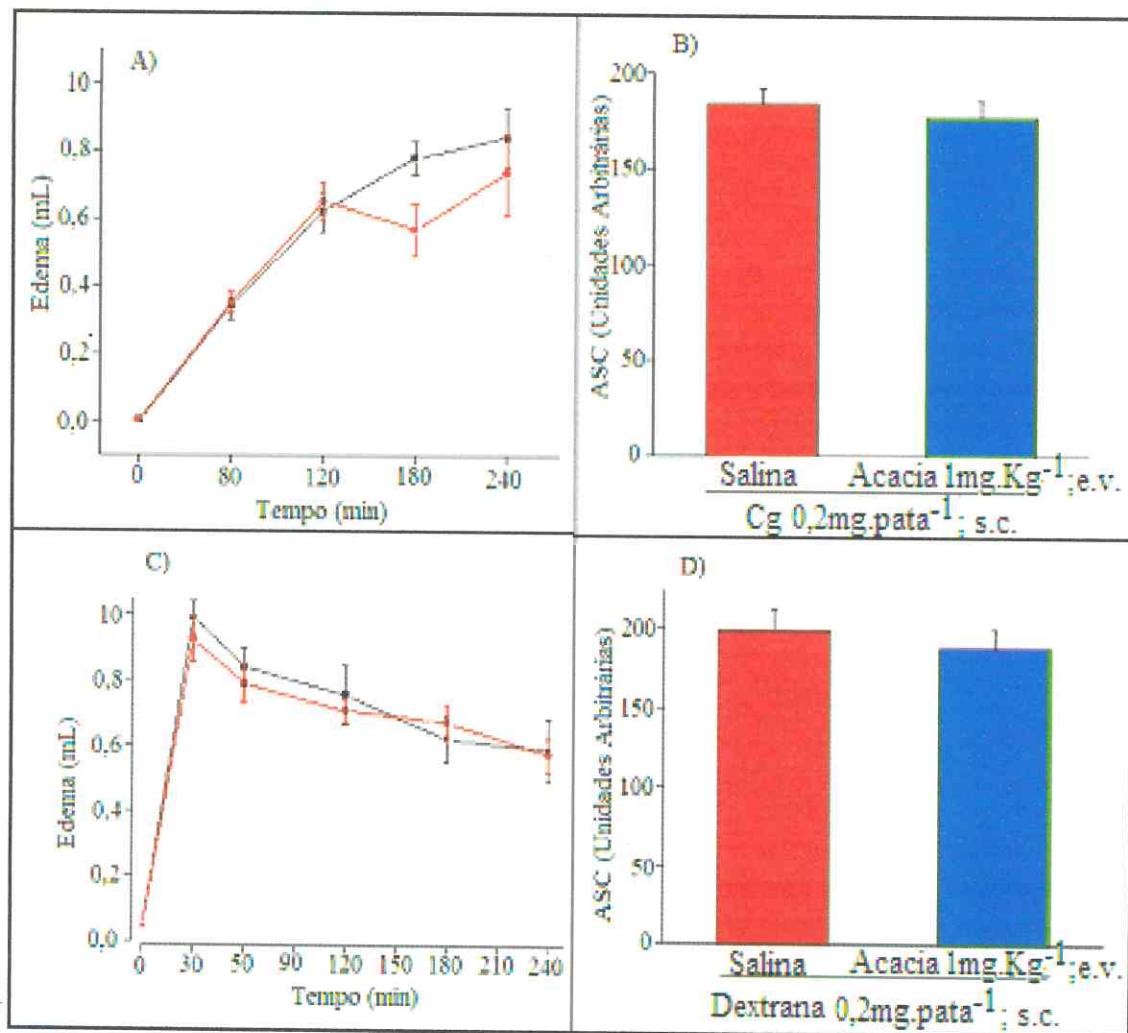


Figura 16. – Efeito da lectina da fração das albuminas de sementes de *Acacia farnesiana* na atividade antiinflamatória no modelo de edema de pata tendo como agente flogístico carragenina (A) e dextrana (C). Em A e C o eixo das abscissas representa o tempo (min) decorrido após o início do experimento. O eixo das ordenadas a medida dos volumes deslocados pelos patas em mL. A linha indica o carragenina (A) e dextrana (D), e a linha 1 mg.Kg<sup>-1</sup> da AFAL. Nos gráficos B e D da área sob a curva calculada pela integral e expressa em unidades arbitrária, pode-se verificar ausência da atividade antiinflamatória da lectina (AFAL) da fração das albuminas presente nas sementes de *Acacia farnesiana* no modelo de edema de pata. Os gráficos da Figuras B e D mostra o grupo controle (salina ) e a ausência da atividade antiinflamatória da AFAL na concentração de 1 mg.Kg<sup>-1</sup> .

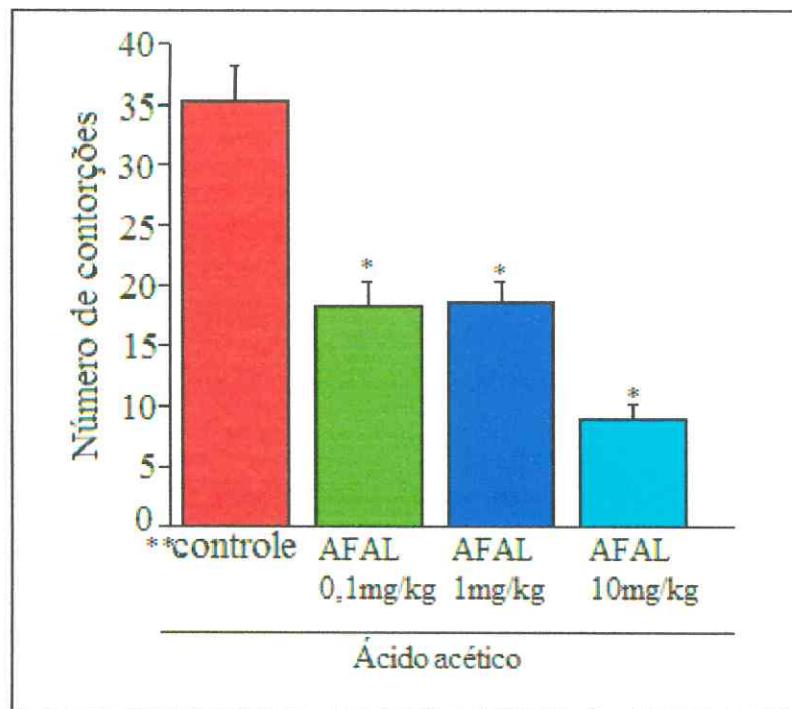


Figura 17. - Atividade antinociceptiva da lectina (AFAL) da fração das albuminas presente nas sementes de *Acacia farnesiana*. O gráfico representa a atividade antinociceptiva da AFAL em diferentes concentrações ( $0,1\text{mg.Kg}^{-1}$  ■), ( $1\text{mg.Kg}^{-1}$  □) e ( $10\text{mg.mL}^{-1}$  ▲), sobre as contorções abdominais causadas pelo ácido acético (controle \*\*■) em camundongos. \* $p < 0,05$  em relação ao controle de ácido acético.

5.12.5 - Atividade Antibacteriana contra *Xanthomonas axopodis* pv. *Passiflorae* e *Clavibacter michiganensis*, *michiganensis* e Microscopia eletrônica de varredura.

A AFAL mostra uma significante atividade antibacteriana. Nestas condições a lectina mostrou-se efetiva contra bactérias gram negativa *Xanthomonas axopodis* pv. *passiflorae* (Figura 20 - A) e gram positiva *Clavibacter michiganensis*, *michiganensis* (Figura 20 - B). Quando lectina foi incubada com as bactérias gram negativas causou uma inibição do crescimento de 78% e de 92% para as gram positivas, esta atividade não foi capaz de ser revertida por açúcares.

A microscopia eletrônica de varredura da Figura 20 - D apresenta o efeito causado pela AFAL sobre a parede bacteriana em *X. axonopodis* pv. *passiflorae*, este efeito pode ser observado pela presença de protuberâncias na membrana externa causada pela ação da lectina, o mesmo não é observado controle positivo da Figura 20 - C, onde mostra que a membrana da parede bacteriana *X. axonopodis* pv. *passiflorae* apresenta-se íntegra.

5.12.7 - Efeito *in vitro* da Lectina da Fração das Albuminas de *Acacia farnesiana* (AFAL) Sobre a Eclosão de Nematóides da espécie *Meloidogyne incognita*.

O gráfico da Figura 21 mostra o efeito da lectina da fração das albuminas de *Acacia farnesiana* (AFAL) sobre a eclosão do nematóide *Meloidogyne incognita* nos períodos de 24, 48 e 72 horas. Pode-se observar que a lectina de AFAL apresentou um leve efeito nas primeiras 24 horas de incubação sobre a eclosão dos ovos de nematóides. No entanto, com o aumento do período de incubação (48 e 72 horas), ocorreu uma potencialização do efeito sobre a eclosão dos ovos de nematóides em relação ao grupo controle.

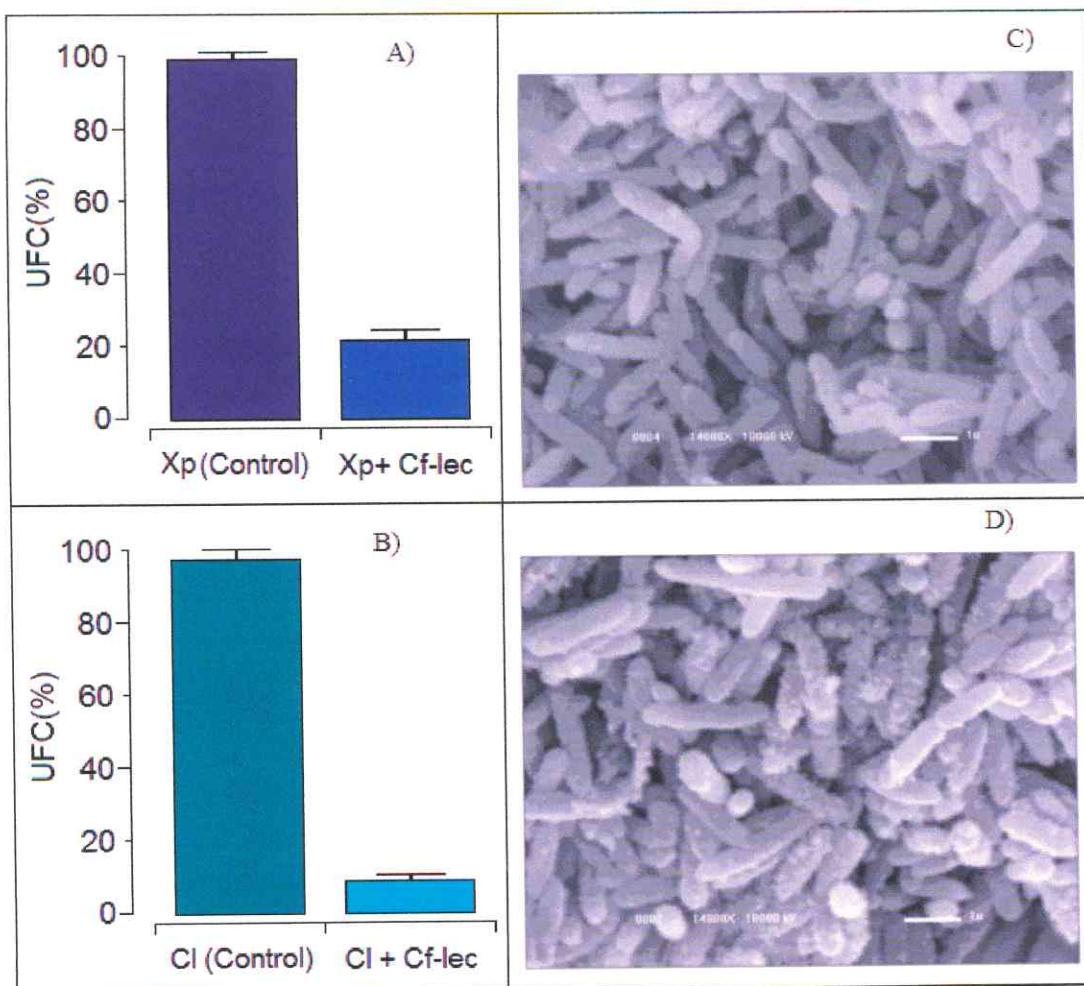


Figura 18. A Figura A apresenta o controle (Xp■) e a atividade inibitória da lectina da fração das albuminas de sementes de *Acacia farnesiana* sobre a bactéria *X. axonopodis* pv *passiflorae* (Xp + Cf-lec■). A Figura B apresenta controle (Cl■) e a atividade inibitória da lectina da fração albumina de *Acacia farnesiana* sobre a bactéria *Clavibacter michiganensis*, *michiganensis* (Cl + Cf-lec■). As Figuras C e D mostram a microscopia eletrônica de varredura (MEV). A Figura C: Controle *X. axonopodis* pv *passiflorae*; D: *X. axonopodis* pv *passiflorae* + lectina de *Acacia farnesiana* (AFAL) após incubação.

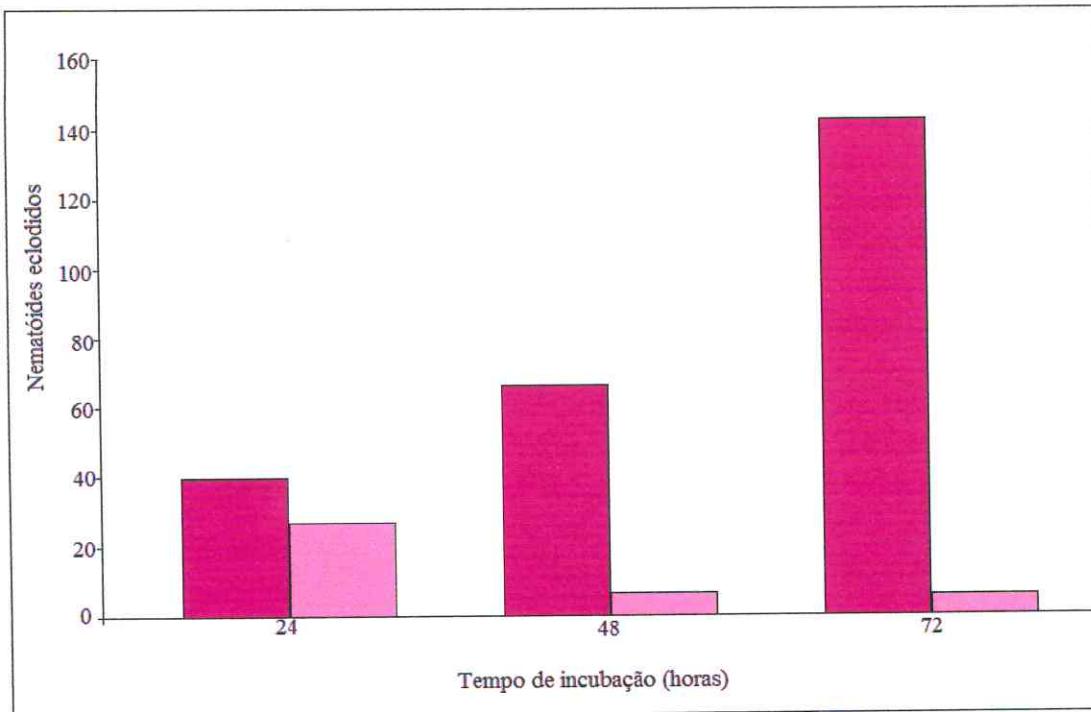


Figura 19. - Efeito da lectina da fração das albuminas de sementes de *Acacia farnesiana* sobre a eclosão dos ovos de *Meloidogyne incognita* em 24, 48 e 72 horas de incubação (■) e o grupo controle (□).

**5.12.8 - Efeito da Lectina da Fração das Albuminas de Sementes de *Acacia farnesiana* Sobre a Mobilidade das Larvas Juvenis (J2) de *Meloidogyne incognita*, Após 24 e 48 Horas de Incubação.**

O resultado do teste sobre a mobilidade das larvas juvenis (J2) de *Meloidogyne incognita* causado pela lectina da fração das albuminas de *Acacia farnesiana* (Figura 22), mostra que nas primeiras 24 horas a AFAL não causou qualquer alteração na mobilidade dos nematóides. No entanto, no período de incubação de 48 horas da AFAL com os J2 verifica-se uma diminuição significativa na mobilidade dos J2, com relação ao grupo controle.

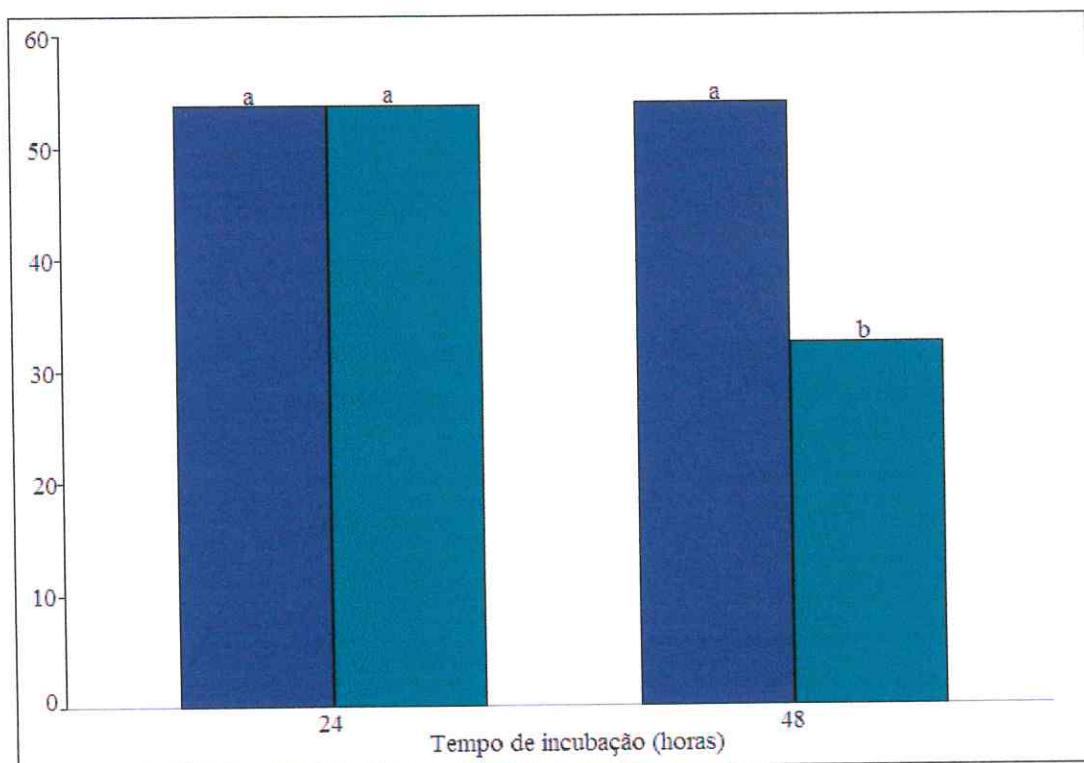


Figura 20. - Efeito da lectina da fração das albuminas de *Acacia farnesiana* sobre a mobilidade das larvas juvenis (J2) de *Meloidogyne incognita*, após 24 e 48 horas de incubação (■) e grupo controle (■). Letras distintas (a e b) indicam diferenças estatísticas do tratamento com a lectina AFAL em relação ao controle segundo teste de Tukey,  $p < 0,05$ .

## 6 - DISCUSSÃO

O gênero *Acacia*, pertencente à subfamília Mimosoideae (Leguminosae), é um dos mais importantes gêneros do ponto de vista ecológico e contém aproximadamente 1350 espécies. Este gênero pode adaptar-se a extremos de temperaturas e de umidade podendo ainda crescer em diferentes tipos de solo. Várias espécies de *Acacia* apresentam a capacidade de fazer simbiose com bactérias do tipo *Rhizobium* e fungos do tipo micorrizas aumentando assim a fertilidade do solo. Várias atividades biológicas foram relatadas em diferentes espécies de *Acacia*, tais como: anti-hiperglicemiante, anti-hipertensiva, inibidora da agregação plaquetária, inibição potente da atividade da ciclooxygenase I, adstringente, analgésica, anti-reumática, antibacteriana, antidiarréica, digestiva, emoliente, estimulante entre outros (ARIAS *et al.*, 2004; ABOUYI *et al.*, 2004). A espécie *Acacia farnesiana* é um arbusto ou árvore de pequeno porte que pode se adaptar a vários tipos de solo e temperaturas (DUKE, 1981). As sementes secas de *Acacia farnesiana* apresentam para cada 100 gramas de sementes em torno de 12,6 g de proteínas, 4,6 g de lipídeos, 72,4 g de carboidratos (DUKE, 1981). Diversos estudos sobre lectinas têm sido desenvolvidos na família das Leguminosas, no entanto, a tribo Parkieae é um dos poucos táxones onde lectinas foram caracterizadas estrutural e bioquimicamente. Na tribo Acacieae, no qual a *Acacia farnesiana* encontra-se classificada, apesar de apresentar vários trabalhos onde relatam a atividade biológicas de espécies de *Acacias* spp., somente um trabalho desenvolvido com *Acacia constricta* relata a caracterização de uma lectina. Com a intenção de se ampliar os conhecimentos bioquímicos sobre esta proteína desenvolveu-se um protocolo para isolar, purificar e caracterizar uma lectina de *Acacia farnesiana*. Devido a relatos de ARIAS *et al.*, (2004) e ABOUYI *et al.*, (2004) sobre várias atividades biológicas apresentadas por diferentes espécies de *Acacia*, investigamos e mostramos neste trabalho que algumas destas atividades biológicas estão relacionadas com a lectina da fração das albuminas da farinha de sementes de *Acacia farnesiana*.

Os resultados apresentados neste trabalho mostram o isolamento, a purificação e a caracterização da lectina da fração das albuminas da farinha de sementes de *Acacia farnesiana*. Os dados referentes à atividades biológicas mostram a atividade de agregação

plaquetária, atividade pró-inflamatória e antinociceptiva, da lectina, bem como atividade biológica contra fitopatógenos como bactérias gram positivas (*Clavibacter michiganensis, michiganensis*), gram negativas (*Xanthomonas axopodis pv. passiflorae*) e nematóides da espécie *Meloidogyne incognita*.

Os resultados mostram que o extrato obtido com a solução de NaCl 0,5M da farinha de sementes de *Acacia farnesiana*, bem como as diferentes frações protéicas das classes das albuminas, globulinas, glutelinas ácidas e prolaminas apresentaram atividade hemaglutinante contra hemácias de coelho tratadas e não tratadas enzimaticamente e que esta atividade difere da apresentada por *Acacia constricta* a qual apresenta atividade hemaglutinante com sangue humano do sistema ABO (GUSMÁM-PARTIDA *et al.*, 2004). A lectina da fração das albuminas de sementes de *Acacia farnesiana* quando passada em coluna de quitina (polímero de N-acetilglicosamina) apresentou dois picos. Um pico não retido ativo retirado com a solução de equilíbrio da coluna que sugere que esta lectina apresenta uma menor afinidade pelo polímero de N-acetilglicosamina, provavelmente devido à particularidade desta lectina de sofrer oligomerização decorrente do tempo de dissolução, sugerindo desta forma uma menor interação da lectina com o polímero quando se encontra na forma de dímero. Uma vez que os experimentos realizados submeteram a proteína a quatro horas de contato com a coluna, não houve tempo suficiente para que a maioria das moléculas da lectina sofresse oligomerização até sua forma tetramérica. Outro fato que vem a sustentar este dado é a característica da lectina em apresentar atividade hemaglutinante somente após doze horas de contato com as hemácias, tempo este suficiente para que as moléculas da lectina em solução se encontrem em sua maioria na forma de tetrâmero, o que foi observado quando a lectina foi cromatografada em coluna de exclusão molecular de sílica gel, após doze horas de diluição (dados não mostrados). Esta cromatografia também apresentou um pico retido, cuja atividade hemaglutinante não é inibida por monossacarídeos de N-acetilglicosamina nem por uma mistura de polissacarídeos com 6 a 8 resíduos de N-acetilglicosamina. Portanto, o reconhecimento e a interação das moléculas da lectina, que provavelmente encontram-se na forma tetramérica, é específico pelo polímero de N-acetilglicosamina. Este reconhecimento deve ser feito por um sitio de ligação a carboidratos estendido, como os descritos para lectinas de Curcubitaceae (ALLEN, 1979; ANATHARAM *et al*,

1986; PEUMANS *et al.*, 2000b). A análise destes picos tanto por PAGE-SDS como por cromatografia de exclusão molecular mostra um mesmo perfil, caracterizado por apresentar atividade hemaglutinante contra hemácias de coelhos tratadas ou não tratadas enzimaticamente, o que leva a conclusão de que apesar de somente um pico apresentar afinidade pela quitina os dois picos contêm a mesma proteína e que esta característica apresentada provavelmente deve-se ao fenômeno de oligomerização (o dímero sem afinidade e o tetrâmero com afinidade pela quitina). Além disto, não se descarta também a possibilidade de a AFAL possa apresentar sítios de ligação a carboidratos com multivalência ou seja sítios com alta e baixa afinidade pela quitina, como já relatado para a WGA (PEUMANS *et al.*, 2000).

Por outro lado, os dados de análise da composição de aminoácidos e da seqüência N-terminal de aminoácidos da AFAL mostram que, apesar desta lectina ligar-se a quitina, ela não apresenta domínio heveíntico, que caracteriza lectinas ricas em cisteína na região N-terminal, (VAN DAMME *et al.*, 1998), além de não apresentar também similaridade com nenhuma classe de quitinases nem com a PPL2, proteína quitina ligante com atividade quitinásica e atividade hemaglutinante recentemente purificada de farinha de sementes de *Parkia platycephala* (CASTELLÓN, 2004; ROCHA, 2005), uma espécie da mesma subfamília Mimosoideae.

A lectina presente na fração das albuminas da farinha sementes de *Acacia farnesiana* foi passada em cromatografia de troca iônica onde apresentou um pico retido eluido com 42% de NaCl com atividade hemaglutinante. Pode-se especular que a lectina interage fortemente com a coluna por conter um número considerável de aminoácidos com radicais carregados negativamente e que estão expostos. Este resultado é sustentado pela análise da composição de aminoácidos onde se verifica que esta proteína apresenta um conteúdo alto de resíduos ASX (ácido aspártico/asparagina, 13,94 %) e de GLX (ácido glutâmico/glutamina, 12,19 %) e pela cromatofocalização que estabeleceu que a AFAL possui um ponto isoeletírico a pH 4,0. O grau de pureza da AFAL eluida da coluna de quitina foi verificado por PAGE-SDS caracterizando um perfil eletroforético composto por duas bandas de massa molecular aparente de 50 e 29 kDa. Estes resultados são confirmados por espectrometria de massa (MALDI-ToF/MS) onde a AFAL apresenta forma monomérica com 24,2 kDa e a forma dimérica com 50,0 kDa. Por cromatografia

de exclusão molecular a AFAL apresenta uma massa molecular aparente de >120kDa similar as reportadas para as lectinas de *Acacia constricta* (VL) e a de *Phaseolus vulgaris* (PHA) que apresentam massa molecular aparente de 133 kDa (GUSMÁN-PARTIDA, 2004; VÁZQUEZ-MORENO, 2000). Estes resultados indicam que a AFAL é um tetrâmero composto de subunidades idênticas com a mesma massa molecular aparente (por cromatografia e PAGE-SDS) e mesma massa real (espectrometria de massa), comportamento semelhante ao apresentado para a VL (lectina de *Acacia constricta*) e para a PHA (lectina de *Phaseolus vulgaris*) que apresentam subunidades com idênticas massas moleculares aparentes.

Os resultados obtidos por cromatografia de exclusão molecular mostram que a AFAL apresenta dois picos com massas moleculares aparentes 40 kDa e de 80 kDa sugerindo que esta lectina apresenta oligomerização, o que é sustentado por PAGE-SDS onde pode-se observar o mesmo perfil para ambos os picos mostrando com isso ser a mesma proteína. Para melhor justificar estes resultados o pico da exclusão molecular que apresentou 40 kDa foi repassado em coluna de fase reversa. Mais uma vez a AFAL apresenta os mesmos dois picos com tempos de eluição muito próximos, portanto com hidrofobicidades muito semelhantes, indicando com isso que além desta lectina sofrer oligomerização ela apresenta uma quantidade relativa de aminoácidos hidrofóbicos expostos e capazes de se ligarem à coluna. Talvez, a presença de dois picos retidos seja justificada pelo fato das formas diméricas apresentarem menor afinidade pela coluna, por obviamente conter menor conteúdo de aminoácidos hidrofóbicos com radicais expostos capazes de ligarem-se a coluna e que a forma mais oligomerizada (dímero, tetrâmero,...) apresenta um maior número de aminoácidos com radicais hidrofóbicos expostos. Estes resultados são corroborados pelo padrão eletroforético do pico I da fase reversa, que também apresenta as duas bandas com massas moleculares aparentes de 29 kDa e 50 kDa assemelhando-se às massas moleculares aparentes dos picos que a lectina apresenta por exclusão molecular. A análise da composição de aminoácidos da AFAL mostra que esta lectina não apresenta os aminoácidos hidrofóbicos prolina e triptofano e apresenta um número elevado de leucina (11,55%), mas a leucina pode não estar influenciando nestas interações hidrofóbicas porque geralmente encontra-se no interior das proteínas assim como a valina e isoleucina.

Para confirmar a questão de oligomerização e dar uma maior ênfase aos resultados apresentados acima a AFAL foi submetida à cromatografia de exclusão molecular utilizando diferentes tempos de incubação após diluição da lectina liofilizada. Mais uma vez, os resultados evidenciaram que esta lectina é capaz de sofrer oligomerização de acordo com o tempo de dissolução, propriedade não relatada para lectinas da subfamília das Mimosoideae. Observa-se que a AFAL primeiramente forma agregados na forma dimérica e trimérica para posteriormente apresentar a forma tetramérica e que para isso é necessário pelo menos 180 minutos. Esta agregação tempo dependente, provavelmente é de grande importância para esta proteína porque alguns, resultados de atividade biológica foram apresentados após 180 minutos ou mais da incubação da lectina. Estes resultados também sugerem que esta agregação é muito importante para que a lectina expresse toda a sua atividade biológica aumentando assim a capacidade de ligação com os polissacarídeos. Esta característica vem mais uma vez justificar o fato desta proteína apresentar dois picos ativos quando a lectina é passada em coluna de quitina, exclusão molecular e fase reversa. Por outro lado esta característica não influência na interação da lectina com a coluna de troca iônica, uma vez que esta interação depende da carga líquida da proteína.

A lectina de *Acacia farnesiana* possui um N-terminal com 87,5% similaridade com *Acacia constricta* espécie da subfamília das Mimosoideae e não apresenta qualquer similaridade de seqüência N-terminal com a lectina de *Parkia platycephala* (PPL e PPL2), espécie pertencente à mesma subfamília Mimosoideae. A AFAL, no entanto, apresenta 62,1% de similiaridade da porção N-terminal com aquela das lectinas de *Phaseolus vulgaris*, espécie pertencente à subfamília Phaseoleae, mas da subfamília Papilionoideae e não Mimosoideae. Tem sido postulado que as isolectinas de *Phaseolus vulgaris* pertencem a um grupo de proteínas com seqüências conservadas e que parte das lectinas de leguminosas possui uma origem evolutiva através de genes ancestrais comuns, provavelmente para assegurar a manter funções fisiológicas importantes (GUZMÁN-PARTIDA, 2004). Nossos resultados, salvo melhor juízo, podem indicar um elo entre as subfamílias das Mimosoideae e Papilionoideae através das lectinas.

O estudo da relação estrutura-atividade de moléculas farmacologicamente ativas tem sido alvo de várias pesquisas no intuito de determinar a potência e a seletividade destas substâncias como possíveis agentes terapêuticos. Como exemplo disto temos as lectina de *Dioclea violacea*, *Cratylia floribunda* e *Dioclea guianensis*, as quais possuem atividades antiinflamatória (ASSREUY *et al.*, 1997), e a lectina de gérmen de trigo (WGA) que consegue ativar plaquetas pela ligação com outras lectinas plaquetárias tais como a molécula de adesão plaquetária endotelial-1 (MAPE-1; OHMORI *et al.*, 2001). A atividade inibitória sobre a agregação plaquetária também pode ser observada em extrato aquoso de *Acacia nilota* (SHAH *et al.*, 1997). Mediante ao exposto na literatura e a crescente necessidade de novos fármacos menos agressivos e também mediante as doenças que impedem ou causam a formação da agregação plaquetária, a lectina de *Acacia farnesiana* fração das albuminas foi testada sobre as plaquetas. A análise dos resultados evidenciou que a lectina (20 $\mu$ g) apresenta uma maior agregação em torno de 6 minutos após a incubação desta com as plaquetas atingindo 85% da agregação após o que, apresentou um declínio chegando a 75% afinal dos 10 minutos.

Quando estes resultados foram comparados com a agregação causada pela trombina, verificamos que a AFAL, após 6 minutos de incubação atingir uma agregação semelhante a dose de 100 unidades de trombina, que agregou em torno de 60% das plaquetas. Sugerimos que a AFAL, pode agir de maneira semelhante à WGA, uma vez que esta também consegue ativar plaquetas (OHMORI *et al.*, 2001). A WGA induz a ativação da fosfolipase C por meio de uma forte fosforilação da tirosina da MAPE-1 o que acarreta uma mobilização de cálcio intracelular. Outra lectina a agretina, extraída do veneno de *Calloselasma rhodostoma* ativa plaqueta por ativação da fosfolipase C, (ocasionando com isso um aumento de cálcio intracelular), ligação aos receptores plaquetários alfa-2-beta-1 e glicoproteína-1b, e (CHUNG *et al.*, 2001). Com base nesses resultados podemos sugerir que a AFAL pode estar agindo de forma semelhante as lectinas supracitadas sobre o mecanismo de ativação da agregação plaquetária ou seja que a AFAL é capaz de se ligar a glicoproteína plaquetária e o fator von Willebrand, ocasionando o início da cascata de ativação.

Drogas antiflogísticas são necessárias para o controle do processo inflamatório, no entanto algumas destas drogas quando utilizadas causam inúmeros

problemas de saúde incluindo diferentes tipos de doenças reumáticas. No teste de edema de pata induzido por carragenina os mediadores químicos liberados na primeira hora da inflamação são a histamina e a serotonina, e na segunda hora ocorre a liberação de prostaglandinas e interleucinas (DI ROSA *et al.*, 1971). Embora muitas plantas apresentem compostos com atividade antiinflamatória e sejam extensivamente estudadas, estas propriedades não são relatadas para lectinas de espécies do gênero *Acacia*. No entanto, esta atividade é mostrada quando extratos metanólicos de *Acacia farnesiana* são utilizados no controle do edema de pata causado por carragenina (MECHES, 2004).

No presente trabalho, quando a AFAL foi utilizada no teste de atividade pró-inflamatório no modelo experimental de edema de pata de forma dose resposta, onde verifica-se que na dose máxima ( $1\text{mg.Kg}^{-1}$ ) esta lectina mostrou uma maior atividade pró-inflamatória.

No entanto, quando a AFAL foi utilizada como agente antiflogístico, não foi capaz de inibir o edema de pata causado pela carragenina ou pela dextrana, mesmo na maior concentração ( $1\text{mg.Kg}^{-1}$ ). O fato da AFAL não apresentar atividade antiedematogênica pode estar relacionado à característica desta lectina em apresentar oligomerização dependente do tempo de dissolução. Este experimento não nos permite apontar se a AFAL está exercendo sua atividade edematogênica nesse modelo de inflamação, no entanto indicam uma perspectiva para estudos posteriores para o aprofundamento acerca do mecanismo de ação da mesma.

O teste de atividade antinociceptiva da AFAL foi realizado utilizando o modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético, em camundongos. A escolha deste modelo deve-se ao fato deste se mostrar eficiente na avaliação de compostos, com efeito antinociceptivo por tratar-se de um modelo pouco específico (RABELO *et al.*, 2003). O ácido acético é capaz de ativar a síntese endógena de prostaglandinas, bem como da bradicinina, fator de necrose tumoral  $\alpha$ , interleucina  $1\beta$ , interleucina 8 (DARAEDT *et al.*, 1980; DUARTE *et al.*, 1988, HEAPY *et al.*, 1993, RIBEIRO *et al.*, 2000; TAKAHASHI & PAZ, 1987) e das aminas liberadas pelo sistema nervoso. A AFAL quando testada neste modelo apresentou efeito antinociceptivo, em camundongos nas doses de 0,1, 1 e 10 mg/Kg com diminuição de 50, 50 e 74%, respectivamente, no número de contorções abdominais em relação ao grupo controle. Entretanto, novas investigações são necessárias

para elucidar este efeito uma vez que esta apresenta efeito pró-inflamatório notável e não apresenta atividade antiinflamatória. Outros testes como da formalina que avalia a fase inflamatória da dor e da placa quente poderiam ser utilizados para melhor esclarecer esta atividade.

Bactérias fitopatogênicas do tipo *Xanthomonas axonopodis* pv *passiflorae* (gram negativa), causadora da mancha oleosa do maracujazeiro, e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (gram positiva), que provoca o cancro e murcha bacteriana do tomateiro, causam perdas significativas na agricultura. Com o intuito de encontrar um composto menos agressivo ao meio ambiente para o combate destas fitobactérias e pelo fato de que as lectinas conseguem reconhecer fimbrias de bactérias por conterem carboidratos a AFAL foi utilizada para testar a sua capacidade de inibir o crescimento destas duas fitobactéria. Quando a AFAL foi incubada por um período de 1 hora com as bactérias gram negativas apresentou uma capacidade de inibição do crescimento de 78% em relação controle, resultado superior ao encontrado por CASTELLÓN (2004) ao estudar a lectina de *Parkia platiphycephala* (PPL2) que apresentou uma inibição do crescimento das colônias em cerca de 60 % para esta espécie. No entanto, quando a AFAL foi testada com a fitobactéria gram positiva o efeito inibitório sobre o crescimento foi de 92% portanto superior ao apresentado para o da gram negativa e também superior ao apresentado pela PPL2 para esta mesma espécie que foi de 74,2% (CASTELLÓN, 2004). Estes resultados evidenciam uma atividade antibacteriana significativa sobre as linhagens dos gêneros *Xanthomonas* e *Clavibacter* testadas. A diferença no grau de inibição da AFAL exibido sobre o crescimento das fitobactéria da espécie *C.michiganensis* subsp. *Michiganensis* (92%) em relação ao de *X.axonopodis* pv. *passifloreae* (78%), pode-se atribuir ao fato de que as bactérias gram negativas apresentarem uma maior complexidade de membrana (consideradas mais resistentes) ou por apresentar um menor no tipo ou no tamanho dos carboidratos capazes de serem reconhecidos por esta lectina em relação às bactérias gram positivas. O fato da AFAL apresentar atividade antibacteriana após o período de incubação com as fitobactéria gram negativas e gram positivas vem a evidenciar mais uma vez a particularidade desta lectina em apresentar dimerização e formação de tetrâmero e que esta agregação é muito importante para a atividade biológica desta proteína.

Na tentativa de reverter o efeito da lectina sobre as fitobactérias foram utilizados diferentes monossacarídeos (glicose, galactose, manose, N-acetilglicosamina, arabinose, rafinose e frutose). No entanto nenhum destes monossacarídeos foi capaz de inibir a atividade da AFAL sobre o crescimento destas fitobactérias. Estes resultados sugerem que a concentração do açúcar utilizado não tenha sido o suficiente ou que esta proteína apresenta um sitio de ligação estendido, portanto necessitando de formas mais complexas de açúcares como é verificado para a VL (lectina de *Acacia constricta*) que não é inibida por formas de mono e dissacarídeos, ou ainda necessita de outro tipo de açúcar para inibir lectina (GUZMÁN-PARTIDA *et al.*, 2004). No intuito de melhor analisar o efeito da AFAL sobre as fitobactérias suas membranas foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura, quando se verificou uma alteração na membrana onde se evidencia descontinuidades e protuberâncias o que leva a supor que a lectina esteja interagindo com a membrana e tornando-a mais susceptível.

Os experimentos da AFAL sobre a eclosão de fitonematóides da espécie *Meloidogyne incognita* mostram que a eclosão dos ovos foi significativamente reduzida a medida que o tempo de incubação da lectina com os ovos aumentou. Podemos verificar que a partir de 48 horas de incubação quase não ocorreu eclosão dos ovos quando comparado com o grupo controle. Esta potencialização do efeito da AFAL sobre a eclosão dos ovos dos fitonematóides decorrente do tempo de incubação pode estar diretamente relacionada com a oligomerização da lectina. Estes dados superam os apresentados pela PPL2 que teve seu máximo atingido após 72 horas de incubação (PPL2 + ovos) e também pelos resultados apresentados por SALGADO (2001) onde observou uma máxima inibição da eclosão de *Meloidogyne exigua* a partir do sexto dia de incubação com extratos vegetais de canela e cravo da índia. O efeito inibitório sobre a eclosão dos ovos de nematóides pode estar relacionado ao fato de que a AFAL esteja interagindo com a membrana que recobre a casca dos ovos, que é composta por quitina ou também por esta conseguir de alguma forma passar através da casca e agir diretamente sobre o fitonematóide uma vez que este ao eclodir não apresenta mobilidade, ou ainda que esta interação desagregue a estrutura de proteção dos ovos com isso prejudica o desenvolvimento normal dos os estágios pré-eclosão, através da exposição destes ao meio externo antes que consigam atingir o desenvolvimento necessário para a eclosão.

Para finalizar podemos dizer que o presente estudo marca o início do estudo de uma proteína hemaglutinante que apresenta atividades biológicas extremamente interessantes além de um comportamento físico-químico (hemaglutinação e oligomerização) tempo dependente que merece estudos mais aprofundados, mas que só serão elucidados quando do estabelecimento da estrutura tridimensional desta lectina, o que esta sendo realizado.

## 7 – CONCLUSÃO

Este trabalho detalha a purificação e caracterização parcial química, físico-química e biológica de uma nova lectina da fração albumínica da farinha de sementes de *Acacia farnesiana* (AFAL) (Leguminosae, Mimosoideae). Esta lectina, que se mostrou tempo dependente quanto à hemaglutinação e à oligomerização, apresentou atividade de agregação plaquetária, atividade pró-inflamatória, antinociceptiva e não apresentou atividade antiedemogênico, porém apresentou atividade biológica contra fitopatógenos como bactérias gram positivas (*Clavibacter michiganensis*, *michiganensis*), gram negativas (*Xanthomonas axopodis* pv. *passiflorae*) e nematóides da espécie *Meloidogyne incognita*.

## 8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOUYI, A.; TOUMI, M.; EL HACHIMI, Y. & JOSSANG, A. (2004). In vitro effects of aqueous seeds extract of *Acacia cyanophylla* on the opsonized zymosan-induced superoxide anions production by rat polymorphonuclear leukocytes. *Journal of Ethnopharmacology*. 91 (1):159-165
- ALLEN, H.J. & JOHNSON, A.Z. (1977). A simple procedure for the isolation of L-fucose-binding lectins from *Ulex europaeus* and *Lotus tetragonolobus*. *Carbohydrate Research* 58(2): 253-265.
- ANANTHARAM, V., PATANJALI, S. R, SWAMY, M.J., SANADI, A.R., GOLDSTEIN, I.J. & SUROLIA, A. (1986) Isolation, macromolecular, and combining site of a chito-oligosaccharide-specific lectin from the exudate of ridge gourd (*Luffa acutangula*). *The journal of Biological Chemistry*, 261(31): 14621-14627.
- ARIAS, M.E.; GOMES, J.D.; CUDMANI,N.M.;VATTUONE, M.A. & ISLA, M.I. (2004). Antibacteril activity of ethanolic and aqueous extracts of *Acacia aroma* Gill. *Ex Hook et Arn.* 75: 191-202.
- ASSREUY, A. M. S., SHIBUYA, M. D., MARTINS, G. J., SOUZA, M. L. P., CAVADA, Benildo de Sousa, MOREIRA, R. A., OLIVEIRA, J. T. A., RIBEIRO, R. A., FLORES, C. A. (1997). Anti-inflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from Brazilian beans. *Mediators of Inflammation*. Inglaterra. 6 201 – 210.

- ASSREUY, A.M.; CALVETE, J.J.; ALENCAR, N.M.N.; CAVADA, B.S.; ROCHA-FILHO, D.R.; MELO, S.C.; CUNHA, F.Q.; RIBEIRO, R.A. (2002). Spermadhesin psp-i/sp-ii heterodimer and its isolated subunits induced neutrophil migration into the peritoneal cavity of rats. *Biology of reproduction* 67, 1796–1803.
- BAJZAR L. (2000). Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor and an Antifibrinolytic Pathway *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20:2511-2518.
- BAKER, E. M.; RODRIGUEZ-KABANA, R.; ESTAÚN, V.; KLOEPER, J. W. ROBERTSON, D. G. & WEAVER, C. F.. (1994). Management of *Meloidogyne incognita* on cotton by use of botanical aromatic compounds. *Journal of Nematology*, Lawrence, 26 (2) 127-137.
- BARBIERI, L., BATELLI, G. B. & STIRPE, F. (1993) Ribosome-inactivating protein of plants. *Biochem. Biophys. Acta.*, 1154: 237-282.
- BARBOSA, T., ARRUDA, S., CAVADA, B., GRANGEIRO, T.B., FREITAS, L.A.R. & BARRAL-NETTO, M.. (2001). *In Vivo* Lymphocyte Activation and Apoptosis by lectins of the Diocleinae Subtribe. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*.
- BENTO, C.A.M., CAVADA, B.S., OLIVEIRA, J.T.A., MOREIRA, R.A. & BARJA-FIDALGO, C. (1993). Rat paw edema and leucocyte immigration induced by plant lectins. *Agents and Actions*, 38: 48-54.
- BOURNE, Y., ZAMBONI, V., BARRE, A., PEUMANS, W. J., VAN DAMME, E. J. M., & ROUGÉ, P. (1999). *Helianthus tuberosus* lectin reveals a widespread scaffold for mannose-binding lectins. *Structure*, 7: 1473-1482.
- BOYD, W. C. AND REGUERA, R. M. 1949. Studies on haemagglutinins present in seeds of some representatives of the family Leguminosae. *J. Immunol.* 62: 333–339.

- BOYD, W.C. & SHAPLEIGH, E. Antigenic relations of blood group antigens as suggested by tests with lectins. In: Plant Lectins (1954). Molecular and biological aspects. Ann. Rev. Plant Physiol, 36: 209-234.
- BRADFORD, M. M. A. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of dye binding. Biochem. 72: 248-254.
- BRINKHOUS, K.M.; BARNES, D.S.; POTTER, J.Y. & READ, M.S. (1981). VonWillebrand syndrome induced by a *Bothrops* venom factor: bioassay for venom coagglutinin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78 (7): 3230-3234.
- CALVETE, J.J., THOLE, H., RAIDA, M., URBANKE, C., ROMERO, A. ROCHA, I.M.A., GUIMARAES, F.N., GRANGEIRO, T.B., RAMOS, M.V. & CAVADA, B.S. (1999). Molecular characterization and crystallization of *Diocleinae* lectins. Biochimica et Biophysica Acta, 1430 (2): 367-375.
- CALVETE, J J; COSTA, F H F; SAKERSAMPAIO, S; MURCIANO, M P M; NAGANO, C S; CAVADA, B S; GRANGEIRO, T B; RAMOS, M V; BLOCH JR, C; SILVEIRA, S B; FREITAS, B T; & SAMPAIO, A H. (2000). The amino acid sequence of the agglutinin isolated from the red marine alga *Bryothamnion triquetrum* defines a novel lectin structure. Cellular Molecular Life Sciences, 57(2): 343 – 350.
- CAMPOS, V.P. (1992). Implicação da sobrevivência dos nematóides em solos e raízes de plantas no controle dos fitopatógenos. Informe Agropecuário 16: 15-16.
- CAMPOS, V.P. Manejo de doenças causadas por fitonematóides. Lavras: UFLA/FAEPE (1999). 106 p. (Curso de pós-graduação “*Latu Sensu*” especialização à distância: manejo de doenças de plantas).

CANDY L., VAN DAMME E.J., PEUMANS W.J., MENU-BOUAOUICHE L., ERARD M. & ROUGE P. (2003). Structural and functional characterization of the GalNAc/Gal-specific lectin from the phytopathogenic ascomycete *Sclerotinia sclerotiorum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 308, 396-402.

CASTELLÓN, R.E.R. Purificação e Caracterização Parcial de uma Nova Proteína de Sementes de *Parkia Platyccephala* Benth com Potencial na Defesa de Plantas. Tese de Doutorado apresentada ao Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal do Ceará, 2004.

CAVADA, B. S., MOREIRA-SILVA, L. I. M., GRANGEIRO, T. B., SANTOS, C. F., PINTO, V. P. T., BARRAL-NETO, M., ROQUE-BARREIRA, M. C., GOMES, J. C., MARTINS, J. L., OLIVEIRA, J. T. A. & MOREIRA, R. A. (1996). Purification and biological properties of a lectin from *Canavalia bonariensis* Lind. Seeds. In: Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry. (Eds. Van Driessche, E., Fisher, J., Jeeckmans, S. & Bog-Hansen, T. C.) Textop, Hellerup-Denmark, 11: 74-80.

CAVADA, B. S., SANTOS, S. F., GRANGEIRO, T. B., SILVA, L. I. M. M., CAMPOS, M. J. O., SOUSA, F. A. M., CALVETE, J. J. (1997). Isolation and Partial Characterizacion of a Lectin from *Parkia platycephala* Benth Seeds. *Physiol. Mol. Biol. Plants*, 3: 109-115.

CAVADA, B. S., MADEIRA, S. V. F., CALVETE, J. J., SOUSA, L. A. G., BOMFIM, L. R., DANTAS, A. R., LOPES, M. C., GRANGEIRO, T. B., FREITAS, B. T., PINTO, V. P. T., LEITE, K. B. & RAMOS, M. V. (2000). Purification, chemical, and immunochemical properties of a new lectin from Mimosoideae (*Parkia discolor*). *Prep. Biochem. & Biotechnol.*, 30 (4): 271-280.

CAVADA, BENILDO SOUSA; BARBOSA, T; ARRUDA, S; GRANGEIRO, T B; BARRAL NETTO, M. (2001). Revisiting proteus: do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins. *Current Protein And Peptide Sciences, USA*. 2 (2): 123-135.

CEBO C.; VERGOTEN, G. & ZANETTA, J.P. (2002). Lectin activities of cytokines: functions and putative carbohydrate-recognition domains. *Biochim Biophys Acta.* 19;1572(2-3):422-34

CECCATTO, V M; CAVADA, B. S.; NUNES, E. P.; NOGUEIRA, N A P; GRANGEIRO, M B; MORENO, F B M B; TEIXEIRA, E H; SAMPAIO, A H; ALVES, M A O; RAMOS, M V; CALVETE, J J; & GRANGEIRO, T B. (2002). Purification and partial characterization of a lectin from *Canavalia grandiflora* Benth. seed. *Protein and Peptide Letters, Holanda.* 9 (1): 67-73.

CESARE, P. & McNAUGHTON, P. A. (1997). Peripheral pain mechanism. *Current Opinion in Neurobiology.* 7: 493-499.

CHANDRIKA, R. & SHAILA, M.S. (1987). Isolation and properties of a lectin from the seeds of *Mimosa invisa* L. *J. Biosci.* 12 (4): 383-391

COLOMBO AV, HIRATA R JR, DE SOUZA CM, MONTEIRO-LEAL LH, PREVIATO JO, FORMIGA LC, ANDRADE AF & MATTOS-GUARALDI AL. (2001). *Corynebacterium diphtheriae* surface proteins as adhesins to human erythrocytes. *FEMS Microbiol Lett* 13;197(2):235-9.

CONTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. (2000). Robbins patologia estrutural e funcional. 6.ed. Guanabara-Koogan.

DALFLLAH, A. A. & AL-MUSTAFA, Z. (1996). Investigation of the anti-inflammatory activity of *Acacia nilotica* and *Hibiscus sabdariffa*. *American Jornal of Chinesi Medicine.* 24, 263-269.

DANGUY, A.; CAMBY, I. & KISS, R. (2002). Galectins and Cancer. *Biochim Biophys Acta.* 1572: 285-293.

- DATTA, P.K., FIGUEROA. M.O.D.C.R. & LAJOLO, F.M. (1991). Purification and characterization of two major lectins from *Araucaria brasiliensis* syn. *Araucaria angustifolia* seeds (pinhão). *Plant Physiol.*, 97: 856-862.
- DERAEDT, R.; JOUQUEY, S; DELEVALLE, & FLAHAUT, M. (1980). Release of prostaglandins E and F in an algogenic reaction and its inhibition. *European Journal of Pharmacology*, 61: 17-24.
- DI ROSA, M.; GIROUD, J.P.; & WILLOUGHBY, D.A. (1971). Studies of the mediator of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *J Path.* 104: 15-29.
- DUARTE, I. D.; NAKAMURA, M. & FERREIRA, S.H. (1998). Participation of the sympathetic system in acetic acid-induced writhing in mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 21: 341-343.
- DUKE, J.A. (1981). *Handbook of legumes of world economic importance*. Plenum Press. New York.
- DUKE, J.A. (1983). *Acacia farnesiana* (L.)Wiild. *Handbook of Energy Crops*.1-2.
- ELIAS, T. S. (1974) The genera of Mimosoideae (Leguminosae) in the Southeastern United States. *J. Arn. Arbor.*, 55 (1): 67-118.
- ESMON CT. (1995). Thrombomodulin as a model of molecular mechanisms that modulate protease specificity and function at the vessel surface. *FASEB J.* 9: 946 -955.
- ETZLER, M.E. (1998). From structure to activity: New insights into the functions of legume lectins. *Glycoscience and glycotechnology*. 10 (53): 247-255.
- FLEXNER, S.; NOGUCHI, H. (1902). Snake venom in relation to haemolysis, bacteriolysis, and toxicity. *J. Exp. Med.* 6: 277-301.

GABIUS H.-J., & GABIUS S., EDS (1997) Glycoscience Status and Perspectives.  
Chapman & Hall, Weinheim, Germany.

GOLDSTEIN, I. J., HUGHES, R. C., MONSIGNY, M., OSAWA, T., AND SHARON, N. 1980. What should be called a lectin? *Nature* **285**: 66.

GOMES, J C; FERREIRA, R R; CAVADA, BENILDO SOUSA; MOREIRA, R A; & OLIVEIRA, J T A. (1994). Histamine release induced by glucose (mannose)-specific lectins isolated from brazilian beans. Comparison with Concanavalin A. *Agents and Actions*, USA. **41**: 132-135.

GUZMAN-PARTIDA AM, ROBLES-BURGUENO MR, ORTEGA-NIEBLAS M. & VAZQUEZ-MORENO. (2004). Purification and characterization of complex carbohydrate specific isolectins from wild legume seeds: *Acacia constricta* is (vinorama) highly homologous to *Phaseolus vulgaris* lectins. *Biochimie*. **86** (4-5):335-42.

HAMELRYCK, T.W.; LORIS, R.; BOUCKAERT, J. & WYNNS, L. (1998). Structural freatures of the legume lectins. *Glycoscience and Glycotechnology*. **10** (55): 349-360.

HANDY RL, MOORE PK. (1998). Effects of selective inhibitors of neuronal nitric oxide synthase on carrageenan-induced mechanical and thermal hyperalgesia. *Neuropharmacology*. **37**(1):37-43.

HAO, Q.; VAN DAMME, E.J.M.; HAUSE, B.; BARRE, A.; CHEN, Y.; ROUGÉ, P. & PEUMANS, W. J. (2001). Iris Bulbs Express Type 1 and Type 2 Ribosome-Inactivating Proteins with Unusual Properties. *Plant Physiol*. **125**: 866-876.

HEAPY, C.G.; SHAW, J.S. & FARMER, S.C. (1993).Differential sensitivity of antinociceptiva assays to the bradykinin antagonist Hoe 140. *Bristish Journal of Pharmacological*, **180**: 209-213.

HESTER, G., KAKU, H., GOLDSTEIN, I.J. & WRIGHT, C.S. (1995). Structure of mannose-specific snowdrop (*Galanthus nivalis*) lectin is representative of a new plant lectin family. *Nature Struct. Biol.* 2, 472-479.

HIRABAYASHI, J. Introduction to "Lectin" (1997) Japan: GlyccoWord index, 2002. Disponível em< <http://D:\LectinsThorkild\Glycoword-Lectin-0.htm>> Acesso em: dezembro 2004.

IMBERTY, A., GAUTIER, C., LESCAR, J., PERÉZ, S., WYNS, L. & LORIS, M. (2000). An Unusual Carbohydrate Binding Site Revealed by the Structures of Two *Maackia amurensis* Lectins Complexed with Sialic Acid-containing Oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* 275: 17541–17548.

IRJALA, H., JOHANSSON, E. L., GRENMAN, R., ALANEN, K., SALMI, M. & JALKANEN, S. (2001). Mannose receptor is a novel ligand for Lselectin and mediates lymphocyte binding to lymphatic endothelium. *J. Exp. Med.* 194: 1033–1042.

JR., J.F.S. & DANTAS, C.J.S. (2000). Mecanismos celulares e moleculares da inflamação. Rio de Janeiro: MDSI.

JENKINS, W.R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Disease Reporter*, Washington, v.48, n.9, p.692, Sept. 1964.

KILPATRICK, D.C. (2002). Animal lectins: a historical introduction and overview. *Biochimica et Biophysica*, 1572: 187-197.

KLEHA JF, DEVESLY P, JOHNS A. (1991). The effects of lectins on the release of EDRF from rabbit aorta. *Br J Pharmacol.* 104 (2):287-8.

KONAMI, Y., YAMAMOTO, K. & OSAWA, T. (1991). Purification and characterization of two types of *Cystisus sessilifolius* Anti-H (O) lectins by affinity chromatography. *Biol. Chem.*, 372: 103-111.

LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature*, 227: 680-685.

LEVINE, J. D. (1998). New directions in pain research: molecules to maladies. *Neuron*, 20: 649-654.

LIMA RF, CRIDDLE DN, SOUZA EP, SAMPAIO AH, NASCIMENTO KS, CAVADA BS, ASSREUY AM. Red marine alga *Bryothamnion triquetrum* lectin induces endothelium-dependent relaxation of the rat aorta via release of nitric oxide. (2004). *J Pharm Pharmacol.* 56(11):1415-21.

LINGEN, M. W. (2001). Role of leukocytes and endothelial cells in the development of angiogenesis in inflammation and wound healing. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 125: 67-71.

LIS, H. & SHARON, N. (1986). Application of lectins. In: LIENER, I.E., SHARON.N. & GOLDSTEIN, I.J. THE LECTINS: PROPERTIES, FUNCTIONS, AND APPLICATIONS IN BIOLOGY AND MEDICINE. Academic Press Inc., New York.

LIU, F.T, PATTERSON, R.J & WANG J.L.(2002). Intracellular functions of galectins, *Biochim Biophys Acta*. 1572: 263-273.

LOMBARDI, F.R.; FONTES, M.R.M.; SOUZA, G.M.O.; COELHO, L.C.B.B.; ARNI, R.K. & DE AZEVEDO, JR. WF.(1998). Crystallization and Preliminary X-ray Analysis of *Parkia pendula* Lectin. *Protein and Peptide Letters*. 5 (2): 117-120.

MANN, K; FARIAS, C. M. S. A, GALLEGOS DEL SOL, F., SANTOS, C. F., GRANGEIRO, T. B., NAGANO, C. S., CAVADA, B. S. & CALVETE, J. J. (2001). The amino acid sequence of the glucose/mannose-specific lectin isolated from *Parkia platycephala* seeds reveals three tandemly arranged jacalin-related domains. *Eur. J. Biochem.*, 268 (16): 4414-4422.

- MATSUSHITA, T.; MEYER, D. & SADLER, J.E. (2000). Localisation of von Willebrand Factor-binding sites for platelet glycoprotein Ib and Botrocetin by charged-to-alanine scanning Mutagenesis. *J. Biol. Chem.*, 275:11044-11049.
- MATTIOLI, M. A. P., SILVA, J.A., CAMILLO J.V. & MARANGONI, S. (2003). Estudo estrutural de CQL, lectina isolada das sementes de *Chenopodium quinoa*. XI congresso interno de iniciação científica da unicap
- McGEER, P.L. & McGEER, E. G. Autotoxicity and Alzheimer Disease. *Archives of Neurology*, 57: 789-790.
- MECKS, M.; DAVID-RIVERA, A.D.; NAVA-AGUILAR, V. & JIMENEZ, A. (2004). Activity of some Mexican medicinal plant extracts on carrageenan-inducel rat paw edema. *Phytomedicine*. 11: 446-451.
- MONTEIRO, R.O. & ZINGALI, R.B. (2000). Inhibition of protrombin activation by Bothrojaracin, a C-Type Lectin from *Bothrops jararaca* venom. *Arch. Biochem. Biophys.*, 382: 123-128.
- MOORE PK, BABEDGE RC, WALLACE P, GAFFEN ZA, HART SL.(1993). 7-Nitro indazole, an inhibitor of nitric oxide synthase, exhibits anti-nociceptive activity in the mouse without increasing blood pressure. *Br J Pharmacol.* 108(2):296-7.
- MOREIRA, R A; CORDEIRO, E F; GRANGEIRO, T B; RAMOS, M V; MARTINS, J L; CAVADA, B. S. & OLIVEIRA, J T A. (1996). Isolation and partial characterization of a lectin from *Dioclea violacea* Benth seeds. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, Brasil*, 8 (1): 23-29.
- NASEEM, K. M. & BRUCKDORFER, K. R. (1995) *Biochem. J.* 310: 149–153.
- OHMORI T, YATOMI Y, WU Y, OSADA M, SATOH K, OZAKI Y. (2001). Wheat germ agglutinin-induced platelet activation via platelet endothelial cell

- adhesion molecule-1: involvement of rapid phospholipase C gamma 2 activation by Src family kinases. *Biochemistry*.40(43):12992-3001.
- OLSNES, S. (1987). Closing in on ricin action. *Nature*, 328: 774-775.
- PEUMANS, W. J. & VAN DAMME, E.J.M. (1995a). Lectins as plant defense proteins. *P. Physiol. Belgium*, 109: 347-352.
- PEUMANS, W. J. & VAN DAMME, E.J.M. (1995b). The role of lectins in plant defense. *Histochem. J.*, 27: 253-352.
- PEUMANS, W. J., BARRE, A., HAO, Q., ROUGÉ, P. & VAN DAMME, E. J. M. (2000). Higher plants developed structurally different motifs to recognize foreign glycans. *Trends in Glycoscience and Glycotech.*, 12 (64): 83-101.
- PEUMANS, W. J., NSIMBA-LUBAKI, M., PEETERS, B. & BROEKAERT, W. F. (1985). Isolation and partial characterization of a lectin from ground elder (*Aegopodium podagraria*) rhizoms. *Planta*, 164: 75-82.
- PIRILLO, N.L.; MARCUS ME, BAUM LG. (1998). Galectins: versatile modulators of cell adhesion, cell proliferation, and cell death. *J Mol Med*76(6):402-412.
- PITTIBONE, D.J. & MULLER, G.P. (1989). Alpha adrenergic stimulation by clodine increases plasma concentration of immunoreactive beta-endorphin in rats. *Endocrinology*. 109: 789-802.
- PUSZTAI, A. (1991). PLANT LECTINS. Cambridge University Press. Cambridge, England. 263 pp.
- RAMOS, M V; CAVADA, B. S.; CALVETE, J J; SAMPAIO, A H; MAZARD, A M; GRANGEIRO, T B; FREITAS, B T; LEITE, K B; & ROUGÉ, P. (1999). Specificity of the *Vatairea Macrocarpa* Lectin Towards Glycans Exhibiting Exposed Gal or Galnac Residues. *Protein and Peptides Letters*, 6 (3): 163-172.

RANG, H.P.; DALE, M.M. & RITTER, J.M. (2001). Pharmacology. New York.  
pp.203-13.

RENKONEN, K. O. 1948. Studies on hemagglutinins present in seeds of some representatives of Leguminosae. *Ann. Med. Exp. Biol. Fenn.* **26**: 66–72.

RIBEIRO, R.A.; VALE, M.L.; THOMAZZI, S.M.; PASCHOALATO, A.B.; POOLE, S.; FERREIRA, S.H.; & CUNHA, F.Q. (1978). Involvement of resident macrophages and mast cells in the writing nociceptive response induced by zimosan and acetic acid in mice. European Journal of Pharmacology. 387: 111-118.

RINDERLE, S.J., GOLDSTEIN, I.J., MATTA, K.L., & RATCLIFFE, R.M. (1989). Isolation and characterization of amaranthin, a lectin present in the seeds of Amaranthus caudatus, that recognizes the T- (or cryptic T) -antigen, The J. of Biol. Chem., 264 (27): 16123-16131.

RIPOLL C, FAVERY B, LECOMTE P, VAN DAMME E, PEUMANS W, ABAD P, JOUANIN L (2003) Evaluation of the ability of lectin from snowdrop (*Galanthus nivalis*) to protect plants against root-knot nematodes. Plant Sci 164, 517-523

ROCHA, B.A.M. (2005). Caracterização estrutural por cristalografia de raios x e sequenciamento de aminoácidos de uma nova proteína quitina ligante de sementes de *Parkia platycephala* Benth (PPL2). Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, 2004.

ROZWARSKI, D.A.; SWAMI, B. M., BREWER, C. F. & SACCHETTINI J. C. (1998). Crystal Structure of the Lectin from *Dioctria grandiflora* Complexed with Core Trimannoside of Asparagine-linked Carbohydrates. J Biol Chem, 273 (49): 32818 – 32825.

RÜDIGER, H. (1998). Plant lectins- more than just tools for glycoscientists: Occurrence, structure, and possible functions of plant lectins. *Acta Anat.* 161 : 30-152.

SAMIRA O. M. EL TASSA & DUARTE, V. (2002). Ocorrência de mancha bacteriana causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*, em maracujazeiro no estado de mato grosso. *Fitopatol. Brás.* 27 (6):

SAMPAIO, A.H. Hemaglutininas de algas marinhas do nordeste brasileiro e isolamento da hemaglutinina de *Hypnea musciformis* (WULFEN) LAMOUROX. (1992). Dissertação de Mestrado Apresentada ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, 74 pp, Fortaleza.

SEIGLER D.S.(2003). Phytochemistry of Acacia-sensu lato. *Biochemical Systematics and Ecology*. 31 (8): 845-873.

SHARMA, V., & SUROLIA, A. (1997). Analysis of carbohydrate recognition by legume lectins: size of the combining site loops and their primary specificity. *J. Mol. Biol.*, 267: 433-445.

SHARON, N. & LIS, H. (1989). *LECTINS*. 126 pp., Chapman and Hall; London.

SHARON, N. & LIS, H. (1990). Legume lectins - a large family of homologous proteins. *FASEB J.*, 4: 3198-3208.

SHARON, N. & LIS, H. *Lectins*. (2003). Second Edition. Dordresh/Netherlands. Kluwer Academic Publishers.

SOUZA, G.M.O. (1989) Estudos cromatográficos de preparações da lectina de *Parkia pendula* L. (visgueiro). Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco. 109 pp., Recife-Pe.

SOUZA, J. S. I. & MELETI, L. M. M. (1997). Maracujá: espécies, variedades, cultivo. Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 179 p.

STANGARLIN, J. R. SCHWAN-ESRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S.; & NOZAKI, M. H. Plantas medicinais. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, Uberlândia, 9- 11.

STILLMARK, H.; Über Ricin ein giftiges Ferment aus den Samen von *Ricinus communis* L. und einigen anderen Euphorbiaceen. Inaugural Dissertation Dorpat. Tese de Doutorado. Universidade de Dorpat , Estônia, 1888.

SUVACHITTANONT, W. & PEUTPAIBOON, A. (1992). Lectin from *Parkia speciosa* seeds. *Phytochem.*, 31: 4065-4070.

TAKAHASHI, R.N. & PAZ, M.M. (1987). Influence of naloxone on analgesic effects of antidepressants in mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 20: 607-610

TEIXEIRA, D I A; CAVADA, B. S.; SAMPAIO, A H; HAVT, A; BLOCH JR, C; PRATES, M V; MORENO, F B M B; SANTOS, E A; GADELHA, C A A; GADELHA, T S; CRISÓSTOMO, F S M. & FREITAS, V J F. (2002). Isolation and partial characterization of a protein from buck seminal plasma (*Capra hircus*) homologous to spermadhesins). *Protein and Peptide Letters, Holanda*, 9 (4): 331-335.

YAGI, F.; IWAYA; HARAGUCHI, T. & GOLDSTEIN, I.J. (2002). The lectin from leaves of Japanese cycad, *Cycas revoluta* Thunb. (gymnosperm) is a member of the jacalin-related family. *Eur. J. Biochem.* 269, 4335-4341

TORTORA & GRABOWSKI (2002). Pathology Illustrated. 8th Edition. 487

- TRANSUE, T. R., SMITH, A. K., MO, H., GOLDSTEIN, I. J. & SAPER, M. A. (1997) *Amaranthus* lectin structure at 2.2 Å reveals T-antigen disaccharide bound to β-trefoil domains. *Nat. Struct. Biol.*, 10: 779-783.
- TURTON, K., R.; N., NATESH; THIYAGARAJAN, CHADDOCK, J.A. & K. R., ACHARYA. (2004). Crystal structures of *Erythrina cristagalli* lectin with bound N-linked oligosaccharide and lactose. *Glycobiology*. 14 (10): 923-929;
- UTARABHAND, P. & AKKAYANONT, P. (1995). Purification of a lectin from *P. javanica* beans. *Phytochemistry*, 38(2): 281-285.
- VAN DAMME, E. J. M., PEUMANS, W. J., BARRE, A. & ROUGÉ, P. (1998) Plant Lectins: A composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. *Critical Reviews in Plant Science*, 17(6): 575-692.
- VARGAS, J. R., RADOMSKI, M. & MONCADA, S.(1983) Prostaglandins, 23: 929 – 945.
- VÁZQUEZ-MORENO, L.; ORTEGA-NIEBLAS, M.; ROBLES-BURGUEÑO, M.R. & RAMOS-CLAMONT, G. (2000). Purification of complex carbohydrate specific lectins from *Olneya tesota* seeds using tandem affinity chromatography, I.J.B.C. 1–8.
- WAH, D A; ROMERO, A; SOL, F G. Del; CAVADA, B. S.; RAMOS, M V; GRANGEIRO, T B; SAMPAIO, A H. & CALVETE, J J. (2001). Crystal structure of native and Cd/Cd-substituted Dioclea guianensis seed lectin. A novel manganese binding site and structural basis of dimer-tetramer association. *Journal of Molecular Biology*, USA, 310 (4): 885-894.
- WALJUNO, K.; SCHOLMA, R. A.; BIENTEMA, J.; MARIONO, A. & HAHN, A. M. Amino acid sequense of heveine. *Proc. Int. Rubber Conf. Kuala Lumpur*, 2: 518-531, 1975.

WOOD, J.N. & PERL, E.R. (1999). Current opinion in genetics & development. 9:328-332.

[www.librys.com/aminoacidos](http://www.librys.com/aminoacidos)

YAMAMOTO, K., KONAMI, Y., KUSUI, K. & OSAWA, T. (1991). Purification and characterization of a carbohydrate-binding peptide from *Bauhinia purpura* lectin. FEBS Letters, 281 (12): 258-262.

YANG, H. & CZAPLA, T. H. (1993). Isolation and characterization of cDNA clones encoding jacalin isolectins, J. Biol. Chem., 268 (8): 5905-5910.