



**UFAM**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA  
PPGBIOTEC

Tese

**Caracterização bioquímica e avaliação da atividade  
antifúngica de lectinas de sementes de Fabaceae da Amazônia**

**ORIENTADA:** M.Sc. ANDREIA VARMES FERNANDES

**ORIENTADOR:** D.Sc. JOSÉ ODAIR PEREIRA

**CO-ORIENTADOR:** D.Sc. MARCIO VIANA RAMOS

Tese submetida ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia – UFAM, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor(a) em Biotecnologia.

Fontes Financiadoras:

CAPES-PROCAD Amazônia N° 01/ 2006 (projeto 007/2006)

CNPq-BIONORTE N° 554307/2010-3

CNPq-UNIVERSAL N° 480233/2011-0

Manaus  
Outubro / 2012

*A DEUS por me conceder a VIDA.*

*E ao maior amor da minha vida: minha filha, Maria Rita Varmes de Carvalho.*

## **DEDICO**

*“Este momento especial da minha vida é uma dádiva de Deus, pela intercessão da Virgem Maria e de Santa Rita, que me concederam um pouco de sabedoria, força e saúde para conclusão de mais esta etapa da minha formação profissional”.*

*“tudo o que quereis que os homens vos façam, fazei-o vós a eles” (Mt 7,12).*

## AGRADECIMENTOS

Ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia – PPGBIOTEC / UFAM pela confiança e pela oportunidade.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA / MCTI, pela liberação por meio do PDIRH, para que eu pudesse dedicar-me totalmente a este trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq / MCTI, pela concessão da bolsa de doutorado.

Ao meu orientador Dr. José Odair Pereira / UFAM pela disponibilidade de me orientar no PPGBIOTEC e apoio em todo o processo.

Ao meu co-orientador Dr. Marcio Viana Ramos / UFC, por aceitar participar deste trabalho acadêmico, mesmo à distância, de forma totalmente dedicada, incansável, competente e atenciosa, respondendo no exato momento a TODOS os meus e-mails, sempre carregados de dúvidas, em todas as etapas deste trabalho.

Ao meu muito amado esposo e companheiro de trabalho, Dr. José Francisco de Carvalho Gonçalves pela paciência, dedicação e contribuições intelectuais desde sempre. Às vezes brinco com você e o chamo de “*oráculo da sabedoria*”, saiba que toda brincadeira tem um fundo de verdade.

A minha melhor amiga, minha querida Mãe Vandecy, sem sua força em minha vida, jamais eu conseguiria realizar e concluir mais esta etapa da minha formação profissional.

Ao meu pai José Fernandes (em memória) presença constante no meu coração.

Ao meu irmão Wagner Varmes Fernandes e aos meus sobrinhos Thales e Ana Isabel pelo carinho, mesmo vocês estando, geograficamente, tão distantes.

Ao pesquisador Dr. Luiz Augusto Gomes de Souza / INPA pela concessão de grande parte das sementes e pelo auxílio nas identificações botânicas das espécies.

A Sra. Rizonilce, ao Plínio, a Cíntia, a Maíra e aos demais técnicos do Biotério Central do INPA pela coleta do sangue dos animais.

As colegas de trabalho Larissa e Paulo que estiveram presentes em muitos momentos de trabalho na bancada do laboratório.

A toda equipe do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Vegetal / INPA: Aurora, Marciel, Luciedi, Rafaela, Ulysses, João Victor, Sabrina, Carlos e Ana Maria pelo apoio e pela convivência. Em especial, ao Glaudecy por ter comprado o coelho usado para a coleta de sangue ao longo de todo este trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Plantas Laticíferas / UFC: Diego, Maiara e Thiago e a todos que me auxiliaram fortemente neste trabalho nos dias que estive por lá.

Aos Drs. Frederico Bruno Mendes Batista Moreno, Ana Cristina de Oliveira Monteiro Moreira e Renato de Azevedo Moreira da UNIFOR / CE pelas análises realizadas nos seus laboratórios.

Ao Dr. Cleverson Diniz Teixeira de Freitas / UFPI por ser tão receptivo aos meus telefonemas, sem nem mesmo me conhecer pessoalmente.

A Dra. Leonor Alves de Oliveira da Silva / UFAM pelo auxílio nas cromatografias iniciais, a fim de fracionar os extratos e por permitir, o meu livre acesso no Laboratório de Microbiologia / UFAM.

A Dra. Liliane Coelho da Rocha Néri / INPA, pelo apoio nas análises em eletroforese bidimensional.

Agradeço também e, especialmente, a todos os professores que participaram da minha formação, aos avaliadores desta tese que contribuíram muito para aperfeiçoar o meu conhecimento na área de bioquímica.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho e até mesmo aqueles que não foram nominalmente citados nesta tese, por suas simples participações, recebam a minha gratidão.

## SUMÁRIO

<b>Lista de Tabelas</b>	viii
<b>Lista de Figuras</b>	ix
<b>Resumo</b>	xv
<b>Abstract</b>	xvi
<b>1 - Introdução Geral</b>	17
<b>2 - Objetivo Geral</b>	35
<b>Capítulo I - Sementes de Fabaceae da Amazônia como fontes de novas lectinas</b>	36
<b>1-Introdução</b>	36
<b>2-Material e Métodos</b>	41
2.1-Material botânico	41
2.2-Extração protéica	41
2.3-Ensaio de hemaglutinação	41
2.3.1-Preparo dos eritrócitos	41
2.3.2-Determinação da atividade hemaglutinante (AHE)	41
2.4-Determinação da inibição da AHE	42
2.5-Purificação das lectinas	42
2.5.1-Cromatografia de troca iônica	42
2.5.2-Cromatografia de afinidade	43
2.6-Eletroforese em gel de poliacrilamida	43
2.6.1- Eletroforese em gel de poliacrilamida 2D	44
2.7-Digestão das proteínas nos pontos protéicos na análise em 2D e espectrometria de massas ESI-QToF (“Electrospray Ionization”)	44
<b>3-Resultados e Discussão</b>	45
<b>4-Conclusões</b>	62
 Anexo I	 63
 <b>Capítulo II - Purificação e Caracterização de uma lectina da semente de <i>Swartzia laevicarpa</i></b>	 64
<b>1-Introdução</b>	64
<b>2-Material e Métodos</b>	67
2.1-Material Botânico	67
2.2-Extração Protéica	67

2.3-Purificação da lectina	67
2.4-Eletroforese em SDS-PAGE	68
2.5-Detecção de carboidratos ligados covalentemente a SLL	68
2.5.1- Detecção do teor carboidratos da SLL	
2.6-Estudos de hemaglutinação, termo-estabilidade e inibição da atividade da SLL	69
2.7-Espectrometria de Massas	69
2.8-Seqüenciamento da região N-terminal da SLL	70
2.9-Ensaio antifúngicos	70
2.9.1-Ensaio de inibição da germinação dos esporos	71
2.9.2-Ensaio de inibição do crescimento vegetativo	71
<b>3-Resultados e Discussão</b>	72
<b>4-Conclusões</b>	85
Anexo II	86
<b>5- Referências Bibliográficas</b>	87

## LISTA DE TABELAS

Tabela	Título	Página
TABELA 1	Espécies da família Fabaceae distribuídas em várias tribos ou subtribos, mostrando a especificidade de suas lectinas em relação a diferentes monossacarídeos.	19

TABELA 2	Especificidade de ligação a carboidrato por lectinas de plantas.	21
TABELA 3	Exemplos da organização estrutural das subunidades das lectinas de plantas. As subunidades idênticas ou diferentes são representadas por figuras geométricas. O símbolo ● representa o sítio de ligação a carboidratos.	24
TABELA 4	Relação das 50 espécies da família Fabaceae nativas da Amazônia, coletadas de diferentes regiões e selecionadas para se pesquisar quanto à presença de lectinas, incluindo a classificação por subfamília e por tribo.	40
TABELA 5	Peptídeos identificados no banco de dados Mascot <sup>®</sup> no gel 2D nos pontos protéicos das frações do <b>PIII</b> 0,3 M NaCl de <i>Swartzia ingifolia</i> , seqüenciados por espectrometria de massas (ESI-QTOF).	54
TABELA 6	Inibição da AHE dos extratos protéicos das sementes de Fabaceae da Amazônia.	57
TABELA 7	Análise comparativa da seqüência de aminoácidos do peptídeo interno da lectina da semente de <i>Dioclea bicolor</i> com as lectinas da semente de <i>Vatairea macrocarpa</i> , da casca de <i>Styphnolobium japonicum</i> , da semente de <i>Phaseolus leptostachyus</i> , da semente <i>Phaseolus acutifolius</i> , da semente de <i>Styphnolobium japonicum</i> , da semente de <i>Phaseolus vulgaris</i> . Os aminoácidos sublinhados estão presentes, na mesma posição, nas seis seqüências comparadas.	61
TABELA 8	A SLL compartilha atividade de ligação, estrutura e MM com as lectinas das sementes de <i>Luetzelburgia auriculata</i> , <i>Sophora japonica</i> e <i>Vatairea macrocarpa</i> ( <b>A</b> ). Relação filogenética entre algumas tribos da subfamília Faboideae ( <b>B</b> ).	79
TABELA 9	Análise comparativa da seqüência de aminoácidos da região amino terminal (N-terminal) da lectina da semente de <i>Swartzia laevicarpa</i> (SLL) com as lectinas da semente de <i>Sophora japonica</i> (SJ1), da casca de <i>Sophora japonica</i> (SJ2), da semente de <i>Vatairea macrocarpa</i> (VML), da semente de <i>Gline Max</i> (GML) e da semente de <i>Luetzelburgia auriculata</i> (LAL).	80

---

### LISTA DE FIGURAS

---

Figura	Título	Página
FIGURA 1	Representação esquemática das diferentes estruturas moleculares de lectinas de Fabaceae.	23

- FIGURA 2 Organização oligomérica de diferentes lectinas que ligam a manose. As estrelas indicam sítios de ligação a carboidratos. **1-** Dímero: lectina de *Lathyrus ochrus* (Man/Glc); **2-** Tetrâmero: ConA (Man/Glc); **3-** Tetrâmero: lectina de *Galanthus nivalis* (Man); **4-** Octâmero: lectina de *Helianthus tuberosus* (Oligomanosídeos) e **5-** Tetrâmero: jacalina (Man). 25
- FIGURA 3 Visão geral da interação entre lectinologia, pesquisa e biotecnologia. 28
- FIGURA 4 Um típico método para a produção de um dispositivo para a detecção óptica baseada em lectina, incluindo **A-** extração da lectina, **B-** imobilização da lectina em uma superfície sólida e **C-** biosensoriamento do glicano marcado por fluorescência. 32
- FIGURA 5 Representação esquemática da rede de eritrócitos promovida pela ligação da lectina aos carboidratos da superfície das células: **A-** HEMAGLUTINAÇÃO. **B-** INIBIÇÃO da atividade hemaglutinante pela ligação da lectina aos carboidratos livres. 39
- FIGURA 6 Eletroforese em SDS-PAGE 12,5% p/v, em condições redutoras, dos extratos protéicos das sementes de Fabaceae da Amazônia. As proteínas foram visualizadas por meio da coloração com Coomassie Brilliant Blue R-250. **1 e 6:** Marcador de Massa Molecular (PROMEGA). **2, 3, 4 e 5** são quantidades iguais dos extratos protéicos totais de: *Dimorphandra caudata*; *Anadenanthera peregrina*; *Ormosia lignivalvis*; *Swartzia laevicarpa*, (PII – DEAE Sepharose), respectivamente. 46
- FIGURA 7 Cromatograma de troca aniônica do extrato de *Swartzia laevicarpa* em uma coluna de DEAE Sepharose Fast Flow e determinação da AHE dos **PI**, **PII** e **PIII**. **A-** Para a análise, 20 mL (2,5 mg / mL) da amostra foi aplicado a uma coluna de DEAE (20 mL) pré-equilibrada com 50 mM de Tris-HCl, pH 8,0. O Pico I (**PI**) foi eluído com o mesmo tampão, enquanto **PII** e **PIII** foram eluídos por gradiente salino de NaCl (0,1, 0,5 e 1,0 M, respectivamente), tal como indicado pelas setas. As frações (2 mL) foram coletadas a uma taxa de fluxo de 0,5 mL / min e monitoradas espectrofotometricamente a 280 nm. **B-** Ensaio de hemaglutinação usando eritrócitos de coelho 2% v/v das frações protéicas eluídas da coluna DEAE Sepharose: **PI** são as proteínas que não interagiram com a coluna; **PII** presença da AHE nas frações protéicas que interagiram com a resina e eluídas com 0,1 M de NaCl e atividade hemolítica nas frações do **PIII** do extrato de *Swartzia laevicarpa* que foram separados por cromatografia de troca aniônica. As amostras foram aplicadas em diluição seriada. 47

- FIGURA 8 Eletroforese em SDS-PAGE 12,5% p/v, em condições redutoras, das frações protéicas do extrato de *Swartzia laevicarpa*. As proteínas foram visualizadas por meio da coloração do gel com Coomassie Brilliant Blue R-250. **1 e 6**: Marcador de Massa Molecular (PROMEGA). **2**- Extrato protéico total de *Swartzia laevicarpa*; **3**- DEAE-**PI** (- AHE); **4**- DEAE-**PII** (+ AHE); **5**- DEAE-**PIII** (hemólise). 48
- FIGURA 9 Eletroforese em SDS-PAGE 12,5% p/v, em condições redutoras, dos extratos protéicos das espécies do gênero *Swartzia*. **1 e 9**: Marcador de Massa Molecular (PROMEGA). **2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8** são os perfis protéicos dos extratos totais de *Swartzia*: *S. argentea*; *S. ingifolia*; *S. laevicarpa*; *S. longistipitata*; *S. pendula*; *S. polyphylla*; *S. sericea*, respectivamente. As proteínas foram visualizadas por meio da coloração do gel com Coomassie Brilliant Blue R-250. 49
- FIGURA 10 Cromatograma de troca aniônica do extrato de *Swartzia ingifolia* em uma coluna de DEAE Sepharose Fast Flow e determinação da AHE do **PIII** – 0,3 M NaCl. **A**- Para a análise, 20 mL (2,5 mg / mL) da amostra foi aplicado a uma coluna de DEAE (20 mL) pré-equilibrada com 50 mM de Tris-HCl, pH 8,0. O pico não retido (**PI**) foi eluído com o mesmo tampão; enquanto **PII**, **PIII**, **PIV** e **PV** foram eluídos por gradiente salino de NaCl (0,1, 0,3, 0,6 e 1,0 M), tal como indicado pelas setas. As frações (4 mL) foram coletadas a uma taxa de fluxo de 0,5 mL / min e monitoradas espectrofotometricamente a 280 nm. **B**- Hemaglutinação do **PIII** 0,3 M NaCl do extrato de *Swartzia ingifolia* foi separado por cromatografia de troca iônica e determinada usando eritrócitos de coelho 2% v/v. **C**<sup>-</sup> - controle negativo (ausência de amostra); **C**<sup>+</sup> - controle positivo extrato protéico de *Parkia Platycephala* (reconhecidamente aglutinar eritrócitos de coelho 2% v/v). As amostras foram aplicadas em diluição seriada. 50
- FIGURA 11 Cromatograma de troca aniônica do extrato de *Swartzia longistipitata* em uma coluna de DEAE Sepharose Fast Flow e determinação da AHE do **PI** 0,1 M NaCl. **A**- Para a análise, 20 mL (2,5 mg / mL) da amostra foi aplicado a uma coluna de DEAE (20 mL) pré-equilibrada com 50 mM de Tris-HCl, pH 8,0. O pico não retido foi eluído com o mesmo tampão; enquanto **PI** e **PII** foram eluídos com NaCl 0,1 e 0,3 M, respectivamente, como indicado pelas setas. As frações (4 mL) foram coletadas a uma taxa de fluxo de 0,5 mL / min e monitoradas espectrofotometricamente a 280 nm. **B**- Hemaglutinação do **PI** 0,1 M NaCl do extrato de *Swartzia longistipitata*, usando eritrócitos de coelho 2% v/v. **C**<sup>-</sup> - controle negativo (ausência de amostra). As amostras foram aplicadas em diluição 51

seriada.

- FIGURA 12 Eletroforese em SDS-PAGE 12,5% p/v, em condições redutoras, do extrato de *Swartzia ingifolia* e das frações protéicas **PIII** 0,3 M NaCl. As proteínas foram visualizadas por meio da coloração do gel com Coomassie Brilliant Blue R-250. **1-** Extrato protéico de *Swartzia ingifolia* (10 µg); **2-** **PIII** 0,3 M NaCl (+ AHE) de *Swartzia ingifolia* em DEAE Sepharose Fast Flow. 53
- FIGURA 13 Eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% p/v 2D das frações do **PIII** 0,3 M NaCl de *Swartzia ingifolia*. As proteínas foram visualizadas por meio da coloração com 0,1% p/v de Coomassie Brilliant Blue R-250. 30 µg da amostra foi aplicada na fita para ser focalizada. Os pontos protéicos nos quais os peptídeos foram seqüenciados e analisados e que apresentaram homologia com lectinas de espécies da família Fabaceae são indicados. 54
- FIGURA 14 Eletroforese em SDS-PAGE 12,5% p/v, em condições redutoras, das frações protéicas do extrato de *Swartzia longistipitata*. As proteínas foram visualizadas por meio da coloração do gel com Coomassie Brilliant Blue R-250. **1-** Extrato protéico de *Swartzia longistipitata* (10 µg); **2-** Marcador de Massa Molecular (PROMEGA); **3 e 4-** **PI** 0,1 M NaCl (+ AHE) e **5-** **PII** 0,3 M NaCl (- AHE) de *Swartzia longistipitata* em DEAE Sepharose Fast Flow. 55
- FIGURA 15 Cromatogramas de exclusão molecular em “PD-10 Desalting” dos extratos protéicos de seis espécies pertencentes ao gênero *Swartzia*. Para a análise, 2 mL (4,5 mg / mL) da amostra foi aplicado em uma coluna de “PD-10 Desalting” (8,3 mL) pré-equilibrada com 50 mM de Tris-HCl, pH 8,0 e as frações protéicas (1,0 mL) eluídas no mesmo tampão. A eluição foi monitorada espectrofotometricamente a 280 nm. 56
- FIGURA 16 Sementes das espécies de Fabaceae nativas da Amazônia: *Ormosia lignivalvis*, *Dimorphandra caudata* e *Anadenanthera peregrina*. 57
- FIGURA 17 **A-** Sementes da espécie de Fabaceae nativa da Amazônia: *Dioclea bicolor*. **B-** Hemaglutinação do extrato protéico de *Dioclea bicolor* usando eritrócitos de coelho 2% v/v: **1.** Controle negativo (ausência de amostra - AHE); **C<sup>-</sup>.** Controle positivo (+ AHE); **C<sup>+</sup>.** As amostras foram aplicadas em diluição seriada. 58

- FIGURA 18 Cromatograma de afinidade do extrato protéico das sementes de *Dioclea bicolor* em uma coluna  $\alpha$  – Lactose – Agarose. Para a análise, 80 mL (2,5 mg / mL) da amostra foi aplicado a uma coluna (20 mL) pré-equilibrada com 0,1 M Tris-HCl, pH 7,6, mais 0,15 M de NaCl e 5 mM CaCl<sub>2</sub> e MnCl<sub>2</sub>. O pico I (**PI**) foi eluído com o mesmo tampão, enquanto **PII** (+AHE) foi eluído após a adição de 0,1 M glicina pH 2,6 adicionado de NaCl 0,15 M; como indicado pela seta. As frações (2 mL para **PI** e 4 mL para **PII**) foram recolhidas a uma taxa de fluxo de 20 mL / h e, monitoradas espectrofotometricamente a 280 nm. 59
- FIGURA 19 Eletroforese em SDS-PAGE 12,5% p/v, em condições redutoras, do extrato protéico da espécie *Dioclea bicolor*. **1-** Proteína retida em  $\alpha$  – Lactose – Agarose (**PII**), **2-** Extrato protéico total de *Dioclea bicolor* (10  $\mu$ g) e **3-** Marcador de Massa Molecular (PROMEGA). As proteínas foram visualizadas por meio da coloração do gel com Coomassie Brilliant Blue R-250. 60
- FIGURA 20 **A-** Fruto inteiro de *Swartzia laevicarpa*; **B-** Semente com arilo branco e bastante grande, cobrindo a semente; **C-** Pericarpo e casca do fruto (Retirado de Jesus, 2003); **D-** Semente madura de *Swartzia laevicarpa*. (Foto: Paulo Abraão Cavalcante Maranhão). 65
- FIGURA 21 Inibição da AHE das frações reunidas do **PII**, do extrato de *Swartzia laevicarpa*, obtido de DEAE Sepharose como apresentado na **Figura 7**. Açúcares testados: D - arabinose (**1**),  $\alpha$  - lactose (**2**), D - frutose (**3**), D - manose (**4**), **D - galactose** (**5**), D - glicose (**6**), D - maltose (**7**) e N - acetil - D- glicosamina (**8**). As setas indicam os números correspondentes aos açúcares que inibiram a AHE das frações do **PII**. 72
- FIGURA 22 Cromatografia de afinidade do extrato protéico de *Swartzia laevicarpa* em uma coluna de  $\alpha$  - Lactose – Agarose e determinação da massa molecular relativa do **PII**. **A-** Para a análise, 20 mL (10 mg / mL) da amostra foi aplicado a uma coluna (25 mL) pré-equilibrada com 0,1 M Tris-HCl, pH 7,6, mais 0,15 M de NaCl e 5 mM CaCl<sub>2</sub> e de MnCl<sub>2</sub>. O pico I (**PI**) foi eluído com o mesmo tampão, enquanto **PII** foi eluído após a adição de 0,1 M de glicina pH 2,6, como indicado pela seta. As frações (2 mL para **PI** e 4 mL de **PII**) foram recolhidas a um fluxo de 20 mL / h, e monitoradas espectrofotometricamente a 280 nm. **B-** Eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% p/v em condições desnaturantes das proteínas retidas (**PII**), das proteínas não retidas (**PI**) e do extrato protéico das sementes de *Swartzia laevicarpa* (**2**) e marcador de massa molecular PROMEGA (**1**). As proteínas foram visualizadas por meio da coloração do gel com Coomassie Brilliant Blue R-250. 73

- FIGURA 23 Eletroforese em SDS-PAGE 12,5% p/v da SLL em duas condições: REDUTORAS (na presença de  $\beta$ -mercaptoetanol) e NÃO REDUTORAS (na ausência de  $\beta$ -mercaptoetanol). As proteínas foram visualizadas por meio da coloração do gel com Coomassie Brilliant Blue R-250. 75
- FIGURA 24 Espectro de massas “*eleto*spray” deconvoluído da SLL nativa. Inserido SDS-PAGE 12,5% p/v da SLL (10  $\mu$ g), MM marcador de massa molecular da PROMEGA (Broad Range Protein Molecular Weight Markers). 76
- FIGURA 25 Eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% p/v em duas dimensões da SLL. As proteínas foram visualizadas por meio da coloração com 0,1% p/v de Coomassie Brilliant Blue R-250. Amostra de 30  $\mu$ g de proteína foi aplicada na fita para ser focalizada. Os pIs dos pontos protéicos foram estimados em 7,8 e 9,8, respectivamente. 77
- FIGURA 26 **Esquerda:** Eletroforese em SDS-PAGE 12,5% p/v em condições desnaturantes, as proteínas foram visualizadas por meio da coloração do gel com Coomassie Brilliant Blue R-250. **Direita:** Detecção de glicoproteínas em eletroforese revelada pelo reagente de Schiff. As amostras foram colocadas nos dois géis: SLL 50 $\mu$ g (1); lectina não glicosilada ConA 20 $\mu$ g (2); glicoproteína ribonuclease B 20 $\mu$ g (SIGMA) (3). As setas indicam as zonas de reação positivas, evidenciando a presença de carboidrato no gel revelado pelo reagente de Schiff. 78
- FIGURA 27 Espectros de massa (MS/MS) obtidos no espectrômetro Synapt HDMS para peptídeos internos da SLL. **A-** Espectro de massas dos peptídeos gerados pela digestão da SLL por tripsina. **B-** Espectro de massas e seqüência para o peptídeo observado na relação m/z 999,3301. **C-** Pesquisa de seqüência obtida pela ferramenta Mascot MS/MS Ion Search no banco de dados NCBI. A amostra foi misturada com 3,5-dimethoxy-4-hydroxicinamico (matriz) dissolvida em 0,1% v/v de ácido trifloroacético. Um total de nove peptídeos foi obtido exibindo superposição com aquele indicado em C. 81
- FIGURA 28 Tempo de curso do crescimento dos fungos: Os fungos *F. solani*, *R. solani* e *C. lindemuthianum* foram crescidos na presença da SLL (1 mg / mL) ou de peróxido de hidrogênio ou do tampão acetato de sódio pH 5,0 (*F. solani*) como controles. Imagens: germinação dos esporos de *F. solani*. Os ensaios foram realizados a 27 °C durante 48 horas e 70% de umidade. A germinação dos esporos foi observada através de uma lente de microscópio BX 60 Olympus. 82

FIGURA 29 Tempo de curso do crescimento dos fungos: **A-** Os fungos *Colletotrichum glorosporioides* e *Neurospora sp* foram crescidos na presença da SLL (1 mg / mL) ou de peróxido de hidrogênio ou do tampão acetato de sódio pH 5,0, como controles. **B-** Imagens: germinação dos esporos de *Colletotrichum glorosporioides* e *Neurospora sp*. Os ensaios foram realizados a 27 °C durante 48 horas e 70% de umidade. A germinação dos esporos foi observada através de uma lente de microscópio BX 60 Olympus.

---

## RESUMO

Sementes de 50 espécies de Fabaceae da Amazônia com indivíduos das subfamílias Caesalpinioideae, Mimosoideae e Faboideae, foram analisadas quanto à presença de novas lectinas. Os extratos totais foram ensaiados para a atividade hemaglutinante (AHE). Os extratos protéicos de *Anadenanthera peregrina*, *Dimorphandra caudata*, *Ormosia lignivalvis*, *Dioclea*

*bicolor* e frações protéicas de *Swartzia laeviscarpa*, *Swartzia ingifolia* e *Swartzia longistipitata* exibiram AHE com eritrócitos de coelho e, esta atividade foi inibida por galactose ou por lactose, mas não por glicose ou por manose. O extrato total de *Swartzia laeviscarpa* exibiu AHE somente após ser submetido a uma cromatografia de troca iônica e sua lectina foi purificada por cromatografia de afinidade com lactose imobilizada. Mesmo com o grande número de lectinas que tem sido relatado em plantas leguminosas, esta é a primeira descrição de lectinas nos gêneros *Anadenanthera*, *Dimorphandra* e *Ormosia*. O estudo de lectinas desses gêneros e do gênero *Swartzia* poderá contribuir para o entendimento das relações evolucionárias de lectinas de leguminosas, em termos das propriedades de suas estruturas e do processamento protéico. As lectinas das espécies da subtribo Diocleinae são conhecidas serem específicas a glicose e a manose, porém o extrato protéico da semente da espécie *Dioclea bicolor* exibiu AHE com eritrócitos de coelho e essa atividade foi inibida por galactose e lactose. Em seguida, a lectina da semente de *Dioclea bicolor* (DBL) foi purificada em uma resina de afinidade com lactose imobilizada. O seqüenciamento de peptídeos internos da DBL revelou homologia com lectinas de leguminosas pertencendo aos grupos Dalbergieae, Phaseoleae e Sophoreae. A lectina da semente de *Swartzia laeviscarpa* (SLL) aglutinou eritrócitos de coelho, mas não eritrócitos de rato. A atividade da lectina persistiu após aquecimento a 100 °C durante 15 minutos e foi mais fortemente inibida por N – acetil – D - galactosamina,  $\alpha$  - lactose e D - galactose. A SLL exibiu um padrão eletroforético constituído por banda protéica única, correspondendo a uma massa molecular aparente de 29 kDa, a qual foi confirmada por análise de espectrometria de massas e ainda a SLL reagiu positivamente com reagente de Schiff. A seqüência de aminoácidos (39 aminoácidos) da região N-terminal e a seqüência de peptídeos internos foram determinadas por degradação de Edman e por MS/MS, respectivamente. O seqüenciamento revelou homologia completa da SLL com lectinas de leguminosas pertencendo aos grupos mais primitivos (Dalbergieae e Sophoreae). A SLL (1mg / mL) não exibiu atividade antifúngica contra cinco fitopatógenos testados.

**Palavras-chave:** Purificação, proteínas e carboidratos.

## ABSTRACT

Seeds of 50 Amazonian species of Fabaceae with individuals of the subfamilies Caesalpinioideae, Mimosoideae and Faboideae were analyzed for the presence of new lectins. The total extracts were tested for hemagglutinating activity (AHE). The protein

extracts of *Anadenanthera peregrina*, *Dimorphandra caudata*, *Ormosia lignivalvis*, *Dioclea bicolor* and the protein fractions of *Swartzia laevicarpa* exhibited AHE with rabbit erythrocytes, and this activity was inhibited by galactose or lactose, but not by glucose or mannose. The total extract of *Swartzia laevicarpa* exhibited AHE only after submitted to an ion exchange chromatography and their lectin were purified by affinity chromatography with immobilized lactose. Even with the large number of lectins reported in leguminous plants, this is the first description of lectins in the genera *Anadenanthera*, *Dimorphandra* and *Ormosia*. The study of lectins from these genera and from *Swartzia* gender may contribute to the understanding of the evolutionary relationships of legume lectins, in terms of their structure properties and their proteic processing. The lectins from species of the subtribe Diocleinae are known to be specific to glucose and mannose, but the protein extract from the seed of the species *Dioclea bicolor* exhibited AHE with rabbit erythrocytes and this activity was inhibited by galactose and lactose. After the *Dioclea bicolor* seed lectin (DBL) was purified on an affinity resin with immobilized lactose. The sequencing of internal peptides of DBL showed homology with leguminous lectins belonging to groups Dalbergieae, Phaseoleae, Sophoreae. The *Swartzia laevicarpa* seed lectin (SLL) agglutinated rabbit erythrocytes, but did not for mouse erythrocytes. The lectin activity remained after heating at 100 °C for 15 minutes and was strongly inhibited by N - acetyl - D - galactosamine,  $\alpha$  - lactose and D - galactose. The SLL exhibited an electrophoretic pattern constituted by a single proteic band corresponding to an apparent molecular mass of 29 kDa, which was confirmed by spectrometric mass analysis and still the SLL reacted positively with Schiff reagent. The amino acid sequence (39 amino acids) from N-terminal region and the internal peptides sequence was determined by Edman degradation and MS/MS, respectively. The SLL sequencing showed complete homology with the legume lectins belonging to the most primitive groups (Dalbergieae and Sophoreae). The SLL (1 mg / mL) did not exhibited antifungal activity against the five phytopathogens tested.

**Keywords:** Purification, proteins and carbohydrates

## 1-INTRODUÇÃO GERAL

As características químicas, físicas e bioquímicas de determinadas moléculas no reconhecimento de outras moléculas, por exemplo, entre proteínas e carboidratos é de importância primordial em vários processos biológicos, como infecções virais; bacterianas e fúngicas; segmentação de células; fertilização; crescimento e diferenciação celular (Loris *et al.*, 1998). Os carboidratos que estão ligados às proteínas ou aos lipídios na superfície celular podem ser considerados moléculas vitais para a interação proteína – carboidrato (Loris, 2002). Originalmente, proteínas presentes em extratos de plantas e que se ligam especificamente a tais carboidratos foram isoladas. Desde então, essas proteínas têm sido denominadas “fitoaglutininas”, “hemaglutininas” ou “lectinas” por causa de sua capacidade em aglutinar eritrócitos ou outros tipos de células animais ou humanas (Van Damme *et al.*, 2004). Em 1952, no trabalho de Watkins e Morgan foi demonstrado que a propriedade de hemaglutinação estava baseada na ligação de uma dada lectina a carboidratos (Van Damme *et al.*, 1998<sup>a</sup>). O termo lectina vem do latim “*legere*” que significa escolher, selecionar. Esse termo somente foi proposto após a visualização macroscópica da hemaglutinação seletiva de diferentes células animais (Boyd e Shapleigh, 1954). A primeira aglutinação de eritrócitos por extratos de plantas foi obtida no início de 1888, quando Hermann Stillmark descobriu um fator aglutinador protéico em sementes de mamoma (*Ricinus communis* L.) (Olsnes e Kozlov, 2001). Tão logo ao reconhecimento das lectinas como moléculas ligantes a carboidratos, elas puderam ser distinguidas de outras proteínas com base em critérios funcionais bem definidos (Zanetti, 2007).

O Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica (IUPAC) adotou em 1981 a definição para as lectinas, proposta por Goldstein e colaboradores em 1980, como sendo toda proteína de origem não imune, ligantes a carboidratos ou a glicoproteínas, capazes de aglutinarem células e/ou precipitarem glicoconjugados (Van Damme *et al.*, 1998<sup>b</sup>). Nos anos seguintes, as definições para lectinas foram sendo modificadas, pois algumas características dessas moléculas foram sendo esclarecidas, como: a ligação reversível aos carboidratos ou a glicoconjugados, a não modificação a esses carboidratos o que não ocorre com as enzimas glicosidades, glucanases e quitinases e a origem não imune das lectinas, características essas que as diferenciam dos anticorpos que tem carboidratos como antígenos (Loris, 2002; Singh *et al.*, 1999). Ademais, as lectinas não são exclusivas de animais, mas estão presentes em outros

organismos que não possuem sistema imune, como plantas e bactérias (Moreira *et al.*, 1991).

As lectinas estão presentes em todas as classes de famílias e organismos; essas proteínas são encontradas em vegetais superiores, algas, fungos, animais (vertebrados e invertebrados), bactérias e em vírus. Em vegetais, elas são detectadas em centenas de espécies de plantas (Loris, 2002; Sharon e Lis, 2004; Alencar *et al.*, 2005). No reino vegetal, as sementes de leguminosas constituem a principal fonte de lectinas, sendo estimado o teor de lectinas nas sementes de até 15% de todo o conteúdo de proteínas presentes nesse tecido. Porém, elas também estão presentes em outros tecidos vegetais, como: raiz, folha, talo, vagem, frutas, flores e casca (Coelho e Da Silva, 2000; Wu *et al.*, 2000). As lectinas das sementes de leguminosas são o grupo mais bem estudado de lectinas e centenas dessas proteínas tem sido isoladas e extensivamente investigadas em relação as suas propriedades químicas, físico-químicas, estruturais e biológicas (Sun *et al.*, 2011).

Desde a descoberta, lectinas de plantas têm se destacado na história científica das proteínas de plantas (Van Damme *et al.*, 2004). Atualmente, para qualificar uma (glico) proteína como uma lectina, três critérios distintos devem ser atendidos (Kocourek e Horejsi, 1983; Gabius, 1997): **1-** uma lectina é uma (glico)proteína que se liga a carboidrato – por esta parte da definição, taninos, certos lipídios, substâncias catiônicas que aglutinam células são excluídos; **2-** lectinas não são imunoglobulinas – originalmente lectinas foram consideradas substâncias “like” anticorpos (Boyd e Shapleigh, 1954), esse termo refere-se a especificidade aparente de ligação, mas não foi significativo para refletir a similaridade estrutural. De fato, o termo lectina foi mais tarde delimitado das imunoglobulinas (Ig), pois esses anticorpos precisam de um estímulo antigênico para ser sintetizados. As lectinas de plantas também podem ser induzidas por um estímulo externo, diferente de uma mudança antigênica, a expressão das lectinas de plantas pode aumentar como uma consequência do estresse causado por infecção viral (Scheggia *et al.*, 1988), seca (Singh *et al.*, 1999) ou alta concentração de sal (Shakirova *et al.*, 1993; Singh *et al.*, 1999); **3-** lectinas não modificam a estrutura covalente dos carboidratos aos quais elas se ligam – esta parte da definição exclui glicosiltransferases, glicosidases e enzimas que introduzem grupos substituintes, como grupos sulfatos e fosfatos nos carboidratos.

Como ocorreu para as aglutininas ricina (isolada da semente de *Ricinus communis*) e para a concanavalina A – ConA primeira aglutinina a ser isolada em 1919 – (da semente

de *Canavalia ensiformis*), a fonte mais rica para a maioria das lectinas são as sementes ou, mais geralmente os tecidos de estocagem das plantas, mesmo que raízes (*Urtica*, *Phytolacca*, *Sambucus*, *Trichosanthes*, *Calystegia*), tubérculos ou bulbos (*Solanum*, *Galanthus*, *Scilla*, *Allium*, *Cropus*, *Tulipa*, *Iris*), casca (*Sambucus*, *Sophora*, *Robinia*, *Maackia*, *Laburnum*, *Cytisus*, *Cladrastis*, *Hevea*, *Abies*) ou em folhas (*Aloe*, *Lactuca*, *Vicia unijuga*, *Viscum álbum*) também podem ser fontes de lectinas (Rüdiger e Gabius, 2001).

A família Fabaceae é a principal fonte de todas as lectinas isoladas e caracterizadas, inclusive com estruturas tridimensionais descritas (Van Damme *et al.*, 1998<sup>a</sup>; Mourey *et al.*, 1998), alguns exemplos são apresentados na **Tabela 1**.

**Tabela 1:** Espécies da família Fabaceae distribuídas em várias tribos ou subtribos, mostrando a especificidade de suas lectinas em relação a diferentes monossacarídeos.

<b>Tribo ou Subtribo</b>	<b>Espécies</b>	<b>Especificidade</b>
Bauhinieae	<i>Griffonia simplicifolia</i>	GalNAc
	<i>Bauhinia purpúrea</i>	GalNAc
Dalbergieae	<i>Vatairea macrocarpa</i>	Gal
Diocleinae	<i>Canavalia ensiformis</i>	Man/Glc
	<i>Canavalia brasiliensis</i>	Man/Glc
	<i>Dioclea grandiflora</i>	Man/Glc
	<i>Cratylia floridunda</i>	Man/Glc
Erythrineae	<i>Erythrina velutina</i>	Gal
	<i>Erythrina fusca</i>	GalNAc
Genisteae	<i>Crotalaria striata</i>	GalNAc
	<i>Ulex europaeus I</i>	L-Fucose
	<i>Ulex europaeus II</i>	GlcNAc
Glycininae	<i>Glycine max</i>	GalNAc
Hedysareae	<i>Onobrychis vicifolia</i>	Glc/Man
Parkieae	<i>Parkia platycephala</i>	Man/Glc
	<i>Parkia discolor</i>	Man/Glc
	<i>Parkia pendula</i>	Man/Glc

Phaseoleae	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Complexo
	<i>Dolichos biflorus</i>	GalNAc
	<i>Arachis hypogaea</i>	Gal
Sophoreae	<i>Shophora japonica</i>	GalNAc
Trifolieae	<i>Medicago sativa</i>	Gal
	<i>Medicago truncatulata</i>	Man/Glc
	<i>Trifolium repens</i>	Gal
Vicieae	<i>Pisum sativum</i>	Man/Glc
	<i>Vicia faba</i>	Man/Glc
	<i>Lathyrus ochrus</i>	Man/Glc

Fonte: Modificado de Ramos *et al.*, 2000<sup>3</sup>. Carbohydrate/Glycan-Binding Specificity of Legume Lectins in Respect to Their Proposed Biological Functions. Brazilian Archives of Biology and Technology, 43, 4.

As lectinas se distinguem das outras proteínas de plantas pela sua capacidade de se ligarem a açúcares simples ou a carboidratos complexos. Várias descrições sobre a especificidade da ligação das lectinas foram apresentadas (Peumans e Van Damme, 1998); primeiro: as lectinas de plantas apresentam uma ampla especificidade; segundo: a maioria das lectinas tem uma afinidade muito maior por oligossacarídeos que para açúcares simples; terceiro: as lectinas que se diferem estruturalmente podem reconhecer o mesmo açúcar e quarto: a especificidade da maioria das lectinas é direcionada para carboidratos que não são do mesmo organismo do qual a lectina foi isolada (Peumans e Van Damme, 1998; Goldstein e Poretz, 1986). Por exemplo, todas as lectinas que se ligam a quitina reconhecem um polissacarídeo que não ocorre em plantas, porém é comum em fungos e em insetos; as lectinas específicas ao ácido siálico ligam a um açúcar que não é encontrado em plantas, mas é abundante em glicoconjugados animais.

As lectinas de plantas podem então, serem subdivididas de acordo com sua preferência de ligação a açúcares simples (especificidade de grupo) (**Tabela 2**). Há cerca de uma década, somente lectina que se ligava a manose/glicose, galactose/N-acetil-D-galactosamina, (N-acetil-D-glicosamina/N-acetil-D-glicosamina)<sub>n</sub>, fucose e ácido siálico eram conhecidas (Goldstein e Poretz, 1986). Um novo grupo de especificidade foi acrescentado às descobertas; as lectinas que se ligavam exclusivamente a manose descritas em plantas monocotiledôneas (Van Damme *et al.*, 1988<sup>a</sup>). Além disso, a existência de outro grupo de especificidade foi revelada pela descoberta de uma lectina que se liga a manose/maltose de *Calystegia sepium* (Peumans *et al.*, 1997). Entretanto, muitas lectinas não se encaixam em algum desses grupos de

especificidade, pois elas não se ligam a mono ou a oligossacarídeos, mas requerem glicanos complexos para uma eficiente inibição de sua atividade hemaglutinante. Dessa forma, elas são geralmente classificadas com uma especificidade “complexa”, sem qualquer outra especificação. A especificidade nominal das lectinas é usualmente determinada pelo ensaio de inibição da hemaglutinação de células ou pela precipitação de glicoproteínas. Embora uma grande quantidade de lectinas vegetais conhecidas possa ser inibida por mono ou dissacarídeos, a concentração requerida para a inibição é relativamente alta, especialmente quando comparadas às concentrações inibitórias por oligossacarídeos mais complexos (Rüdiger e Gabius, 2001). Por exemplo, a aglutinina do gérmen de trigo (WGA) é aproximadamente 4.500 vezes mais específica para  $(\text{GlcNAc})_4$  que para GlcNAc (Goldstein e Poretz, 1986). A maior afinidade pelos oligossacarídeos é devida ao fato que, o sítio de ligação a carboidrato das lectinas é mais complementar a esses carboidratos e assim, tem uma afinidade muito maior para os glicanos mais complexos, então os ligantes naturais para as lectinas são mais provavelmente os glicanos complexos que os açúcares simples, pois mono e dissacarídeos são somente fracamente ligados às lectinas (Peumans e Van Damme, 1998).

**Tabela 2:** Especificidade de ligação a carboidrato por lectinas de plantas.

<b>Especificidade</b>	<b>Exemplo</b>
<b>Grupo-Fucose</b>	
Fucose	Lectina I de <i>Ulex europaeus</i> Lectina de <i>Lotus tetragonolobus</i>
<b>Grupo Galactose/N-acetilgalactosamina</b>	
Galactose>>GalNAc	Lectina de <i>Artocarpus integrifolia</i>
Gal=GalNAc	Lectina de <i>Clerodendron trichotomum</i>
Gal<<GalNAc	Lectina da soja ( <i>Glycine Max</i> )
<b>Grupo N-acetilglicosamina</b>	
GlcNAc	Lectina do gérmen de trigo ( <i>Triticum aestivum</i> )
$(\text{GlcNAc})_n$	Lectina de <i>Urtica dióica</i>
<b>Grupo Manose</b>	
Manose	Lectina de <i>Galanthus nivalis</i>
Manose/glicose	Lectina de <i>Canavalia ensiformis</i> (ConA)
Manose/maltose	Lectina de <i>Calystegia sepium</i>
<b>Grupo Ácido siálico</b>	
Ácido siálico	Lectina do gérmen de trigo ( <i>Triticum aestivum</i> )
Neu5Ac $\alpha$ (2,6) Gal/GalNAc	Lectina I de <i>Sambucus nigra</i>

Neu5Ac $\alpha$ (2,3) Gal/GalNAc	Lectina de <i>Maackia amurensis</i>
<b>Grupo Glicano complexo</b>	
Glicano complexo conhecido	Lectina de <i>Phaseolus vulgaris</i> (PHA)
Glicano complexo não conhecido	Lectina de <i>Euonymus europaeus</i>

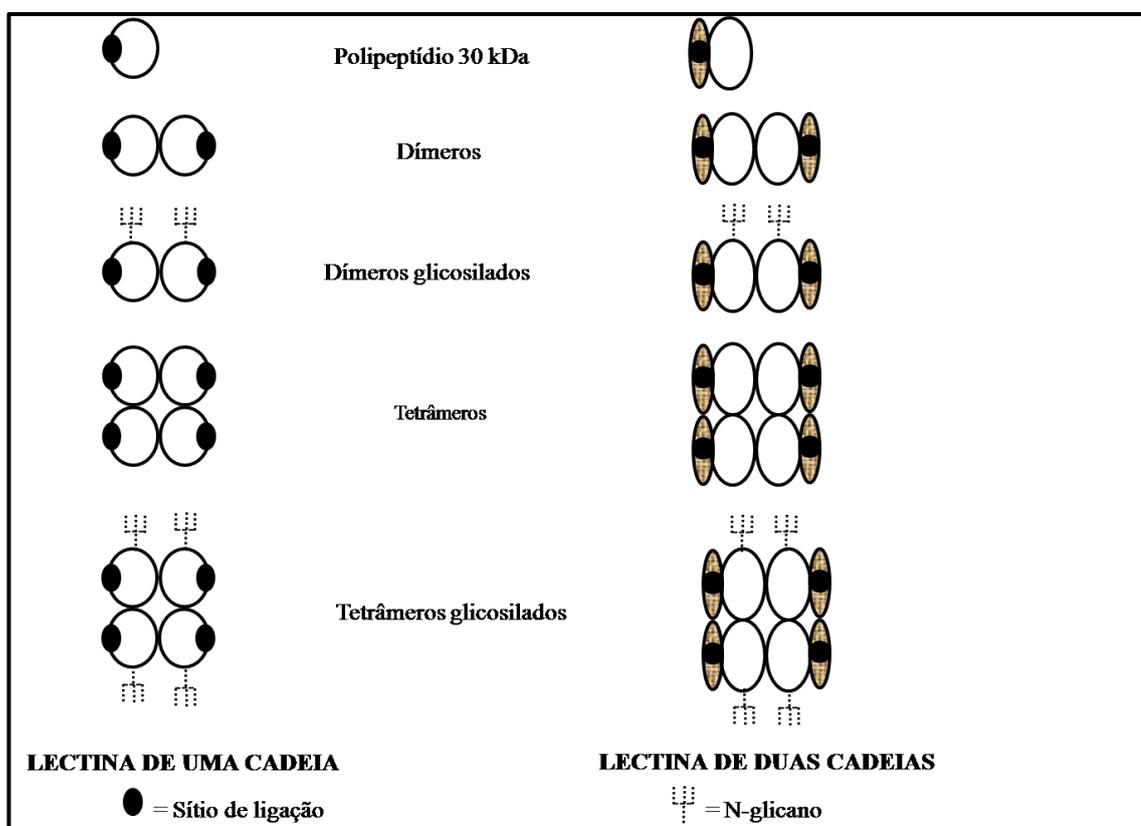
---

Fonte: PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. 1998. Plant Lectins: versatile proteins with important perspectives in biotechnology. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 15, 199-227.

A especificidade de ligação a carboidrato de lectinas de plantas é determinada primariamente pela estrutura tridimensional dos sítios de ligação e, análises estruturais têm demonstrado que esses sítios são conservados em termos de seqüência de aminoácidos dentro de uma dada família de lectinas, porém esse fato não implica necessariamente que todos os membros da mesma família têm a mesma especificidade (Rougé, 1990). Entretanto, os membros de diferentes famílias de lectinas podem reconhecer o mesmo açúcar, haja vista que análises estruturais têm demonstrado que os sítios de ligação de lectinas de famílias diferentes têm uma estrutura geral única. Por outro lado, lectinas estruturalmente diferentes podem reconhecer o mesmo carboidrato. Por exemplo, lectinas que se ligam a manose estão presentes na família das lectinas de leguminosas, de monocotiledôneas e da jacalina (Peumans e Van Damme, 1998).

Nas células vegetais, as lectinas são sintetizadas nos ribossomos ligados ao retículo endoplasmático e em seguida, transportadas via o complexo de Golgi, onde são direcionadas, por meio de vesículas, até o vacúolo. No interior do vacúolo, as lectinas são primariamente encontradas nos corpos protéicos, nos quais são encontradas também as proteínas de estocagem (vicilina, legumina e convicilina na Fabaceae (Shutov *et al.*, 1998), lectinas, hidrolases (glicosídates, fosfatases) e fitinas para estocar fosfatos (Vitale e Chrispeels, 1992). Estudos com microscopia de imunofluorescência e imunocitiquímica apresentaram evidências inequívocas sobre a presença de lectinas (ligantes a galactose e a manose) também no citoplasma (Peumans, 2000). As lectinas isoladas da semente, do caule e das folhas de *Dolichos biflorus* também foram imunolocalizadas. O fracionamento dos cotilédones mostrou que a maior quantidade de lectina nas sementes está associada aos corpos protéicos e que uma quantidade menor está presente na periferia dos grânulos de amido. Por outro lado, as lectinas do caule e da folha devem estar associadas à parede celular, embora elas fossem visualizadas também no citoplasma de células plasmolisadas. Estudos de extração sugerem que essas lectinas não estão ligadas covalentemente à parede celular (Etzler *et al.*, 1984).

Há uma grande diversidade estrutural na organização das lectinas (Kennedy *et al.*, 1995). Por outro lado, as lectinas de leguminosas têm estruturas características e, todas são constituídas por um protômero de massa molecular de aproximadamente 30 kDa, formado por uma cadeia polipeptídica única com cerca de 250 aminoácidos. Entretanto, o protômero pode ser clivado em dois polipeptídios menores e, dependendo da posição do sítio de clivagem os polipeptídios podem ser iguais ou diferentes em tamanho. As lectinas de leguminosas compostas por produtos clivados são denominadas de lectinas de duas cadeias (Figura 1) (Van Damme *et al.*, 1998<sup>a</sup>).



**Figura 1:** Representação esquemática das diferentes estruturas moleculares de lectinas de Fabaceae.

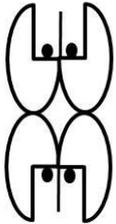
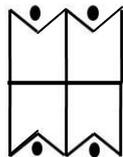
Fonte: VAN DAMME, E.J., PEUMANS, J., PUSZTAI, A., AND BARDOCZ, S. 1998. *Handbook of Plant Lectins: Properties and Biomedical Applications*. John Wiley, Chichester.

Lectinas isoladas de espécies do gênero *Phaseolus*, como a fito-hemaglutinina (PHA), a lectina concanavalina A (ConA) e a aglutinina da soja (SBA) são exemplos de lectinas de cadeia única. Enquanto a maioria das lectinas de espécies do gênero *Vicia* (*Pisum*, *Lens* e *Lathyrus*) são formadas por duas cadeias (Rüdiger e Gabius, 2001). Os

protômeros se mantêm associados por interações hidrofóbicas, por pontes dissulfeto e por pontes de hidrogênio (Kennedy *et al.*, 1995).

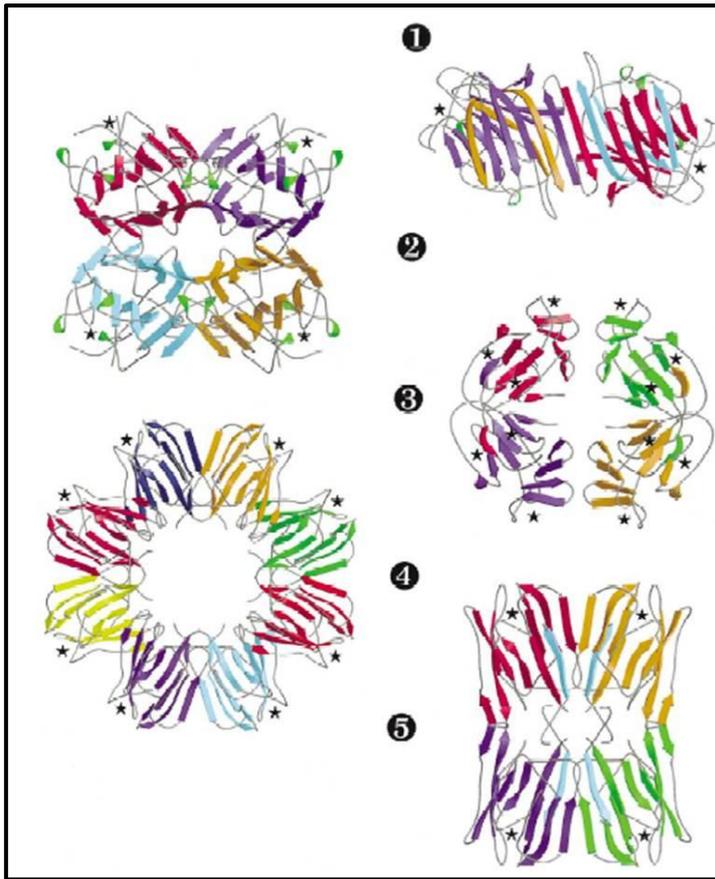
Os polipeptídios dissimilares podem ter funções distintas, por exemplo: a aglutinina da *Ricinus communis* (RCA I) contém dois tipos de subunidades, cadeias A e B; a atividade enzimática está na subunidade A e o sítio de ligação de carboidrato está na subunidade B (Houston e Doyle, 1982). Outra característica estrutural das lectinas refere-se à distribuição dos sítios de ligação a carboidratos por subunidade (**Tabela 3**).

**Tabela 3:** Exemplos da organização estrutural das subunidades das lectinas de plantas. As subunidades idênticas ou diferentes são representadas por figuras geométricas. O símbolo ● representa o sítio de ligação a carboidratos.

Lectina	Diagrama da estrutura quaternária	Referências
<i>Triticum vulgare</i> (WGA)		Goldstein e Hayes (1978) Quioco (1986)
<i>Glycine max</i> (SBA)		Deboeck <i>et al.</i> , (1984)
<i>Ricinus communis</i> (RCA I)		Houston e Doyle (1982)

Fonte: Modificado de Kennedy *et al.*, 1995. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. *Carbohydrate Polymers*, Great Yarmouth, 26, 3, 219-230.

Entretanto, as subunidades das lectinas podem se organizar na forma de dímeros e até octâmeros (**Figura 2**). A forma exata do sítio de ligação e a natureza dos resíduos de aminoácidos na lectina determinam a especificidade de interação lectina-carboidrato. Pequenas alterações no sítio de ligação a carboidrato podem resultar em significativas mudanças na especificidade da lectina e, conseqüentemente em sua atividade biológica (Barre *et al.*, 2001).



**Figura 2:** Organização oligomérica de diferentes lectinas que ligam a manose. As estrelas indicam sítios de ligação a carboidratos. **1-** Dímero: lectina de *Lathyrus ochrus* (Man/Glc); **2-** Tetrâmero: ConA (Man/Glc); **3-** Tetrâmero: lectina de *Galanthus nivalis* (Man); **4-** Octâmero: lectina de *Helianthus tuberosus* (Oligomanosídeos) e **5-** Tetrâmero: jacalina (Man).

Fonte: BARRE, A., BOURNE, Y., VAN DAMME, E.J., PEUMANS, W.J., AND ROUGE, P. 2001. Mannose-binding plant lectins: Different structural scaffolds for a common sugar- recognition process. *Biochimie*, 83, 7, 645–651.

A interação lectina-carboidrato ocorre por meio da formação de pontes de hidrogênio entre grupos polares de aminoácidos, presentes no sítio de ligação a carboidratos e o carboidrato ligante. Segundo Quioco (1986), para a formação de um complexo proteína-carboidrato haverá um deslocamento de moléculas de água associadas com os grupos polares da proteína e, ao redor dos grupos altamente polares do açúcar; enquanto há a formação de novas pontes de hidrogênio e em seguida, forças de Van der Waals, essas duas interações serão as forças dominantes na estabilidade de interação lectina-carboidrato.

As lectinas de leguminosas são um grupo único de lectinas que possuem sítios específicos de ligação a metais. Cada subunidade possui íons  $\text{Ca}^{+2}$  e/ou  $\text{Mn}^{+2}$ , que são essenciais para a atividade de ligação da lectina ao carboidrato. Ademais, os aminoácidos envolvidos na ligação dos íons são altamente conservados em todas as lectinas do grupo (Rüdiger e Gabius, 2001). A ConA necessita de íons  $\text{Ca}^{+2}$  para se ligar a seu carboidrato específico, enquanto a lectina isolada das sementes de *Erythrina speciosa* (EspecL) necessita dos íons  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Mn}^{+2}$  para capturar seu carboidrato específico (Konozy *et al.*, 2003). A presença desses íons nos seus sítios de ligação promove uma modificação na estrutura da lectina, aumentando a afinidade da lectina pelo seu carboidrato específico, pois essa ligação posiciona os aminoácidos polares do sítio de reconhecimento a carboidratos na posição espacial perfeita para que ocorra a interação lectina-carboidrato (Sharon e Lis, 1990).

Com base na estrutura global das lectinas vegetais foi proposta uma classificação de acordo com o domínio de reconhecimento a carboidrato e assim, receberam as seguintes denominações (Van Damme *et al.*, 1998<sup>a</sup>): **1- merolectinas:** consiste de um único domínio de ligação a carboidrato, por definição elas são monômeros e assim não podem precipitar glicoconjugados e aglutinar células. A proteína heveína isolada do látex de *Hevea brasiliensis* é uma merolectina típica (Van Parijs *et al.*, 1991); **2- hololectinas:** apresentam ao menos dois domínios de reconhecimento a carboidratos idênticos, com alto grau de homologia; estas lectinas são capazes de precipitar glicoconjugados e aglutinar células, a maioria das lectinas de plantas pertencem a esse sub-grupo e o exemplo clássico é a ConA; **3- quimerolectinas:** esse sub-grupo é constituído por lectinas formadas por um ou mais domínios de ligação a carboidratos, associado com outro domínio com atividade enzimática. A ricina de *Ricinus communis* e a lectina de *Viscum album* são exemplos deste sub-grupo (Olsnes e Kozlov, 2001; Van Damme *et al.*, 1998<sup>b</sup>); **4- superlectinas:** apresentam ao menos dois domínios de reconhecimento a carboidrato, como as hololectinas, porém reconhecem carboidratos com estruturas diferentes, como ocorre com a lectina de *Tulipa gesneriana* (TGL) com um domínio de ligação a manose e outro para N-acetil-D-galactosamina (Oda e Minami, 1986).

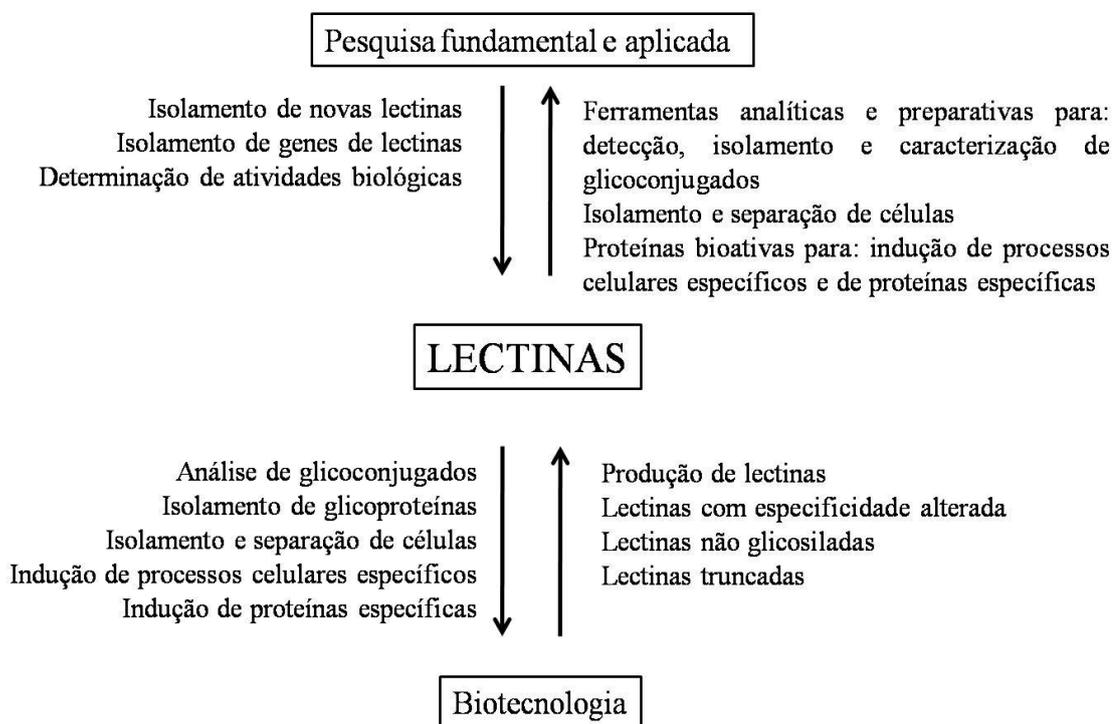
Em plantas, as lectinas não são constituídas somente de domínios de ligação a açúcares; mas, também podem apresentar um domínio não relacionado com estrutura e atividade biológica totalmente diferente (Van Damme *et al.*, 2004). Desta forma, o papel fisiológico das lectinas nas plantas depende de dois ou mais domínios e, em alguns casos a função chave da lectina pode ser determinada pelo domínio não catalítico

(Barondes, 1988). Após ter-se tornado evidente a ligação das lectinas a carboidratos, buscou esclarecer a definição do papel fisiológico para as lectinas de plantas. Em paralelo, houve esforços para descobrir se as lectinas vegetais interagiam com outros organismos e, se essa interação era específica (Hirsch, 1999). Como resultado de todo esse esforço, hoje há uma grande quantidade de informação sobre a biologia de lectinas de plantas e o efeito dessas proteínas nos organismos que interagem com essas plantas. Desde então, muitas pesquisas estão sendo desenvolvidas com o objetivo de estabelecer o papel fisiológico de lectinas de plantas e, duas hipóteses distintas foram postuladas: uma na qual a lectina se liga a carboidratos de fontes externas tal como, animais, fungos ou bactérias agressoras ou simbióticas e, a segunda é que a lectina interaja com ligantes da própria planta (Rüdiger e Gabius, 2001). Ademais, as lectinas também fornecem um modelo único para estudar interações proteína-carboidrato em nível atômico (Oliveira *et al.*, 2008; Debray *et al.*, 2009).

Há duas evidências que suportam o papel das lectinas no mecanismo de defesa das plantas contra patógenos; a presença de lectinas nos sítios de invasão pelos agentes infecciosos, a ligação de lectinas à parede celular de vários fungos e sua habilidade em inibir o crescimento e a germinação dos esporos (Charungchittrak *et al.*, 2011). De qualquer forma, o papel de lectinas no mecanismo de defesa de plantas pode ter evoluído da capacidade destas proteínas em aglutinar e imobilizar microorganismos (Kheeree *et al.*, 2010). Uma variedade de proteínas antifúngicas foi isolada de sementes de plantas leguminosas, incluindo diferentes variedades de feijão e amendoim (Ng *et al.*, 2002). Entre essas proteínas estão as lectinas, as quais são testadas quanto à sua atividade antifúngica. A lectina isolada da semente de *Lutzelburgia auriculata* (LAL) (Oliveira *et al.*, 2002), que se liga a N-acetil-D-galactosamina, D-lactose ou D-melibiose e D-galactose ou rafinose, inibiu o crescimento de *Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium solani* e *Aspergillus Niger* (Melo *et al.*, 2005). A lectina da semente de *Phaseolus vulgaris* (PHA) apresentou efeito supressivo no crescimento de espécies dos fungos *Fusarium oxysporum*, *Coprinus comatus* e *Rhizoctonia solani* (Ye *et al.*, 2001).

Atualmente, as lectinas formam um grupo de proteínas que mais se destacam em relação a aplicações biotecnológicas; durante a última década importantes progressos foram alcançados na clonagem molecular e nas análises dos genes das lectinas de plantas, como a expressão de lectinas em sistemas heterólogos. Os novos

desenvolvimentos oferecem perspectivas não somente para um uso mais intensivo de lectinas, mas também aplicações em outros campos (**Figura 3**).



**Figura 3:** Visão geral da interação entre lectinologia, pesquisa e biotecnologia.

Fonte: VAN DAMME, E.J., PEUMANS, J., PUSZTAI, A., AND BARDOCZ, S. 1998. *Handbook of Plant Lectins: Properties and Biomedical Applications*. John Wiley, Chichester.

Inúmeras são as aplicações de lectinas de plantas como ferramentas na ciência básica, médica e biotecnológica, como: a detecção de domínios de carboidratos em glicoconjugados em cromatografia de camada delgada; a purificação de glicoconjugados por cromatografia de afinidade - a lectina da semente de *Cratylia mollis* (Cramoll 1,4) foi imobilizada na matriz Sepharose CL-4B e, nessa matriz Silva *et al* (2011) conseguiram purificar uma proteína (ApcSP) da soja (*Glicine max*), a qual “*in vitro*” apresentou atividades anticoagulantes e antiplaquetárias; estudos de glicoproteoma (Lastovicková *et al.*, 2011); quantificação de glicoconjugados reativos a lectinas em ensaios de ligação lectina-enzima, e quantificação das atividades de glicosiltransferases, glicosidases por detecção baseada em lectina nos produtos de reação enzimática (Rüdiger *et al.*, 2000); fracionamento de populações de células; caracterização dos glicoconjugados da superfície celular; análise do mecanismo envolvido na correta glicosilação por células variantes resistentes a lectina (Rüdiger e Gabius, 2001); várias lectinas tem apresentado propriedades anti-câncer “*in vitro*” e em

estudos de casos humanos; as lectinas são usadas como agentes terapêuticos, preferencialmente na ligação aos receptores de membranas de células cancerígenas, causando citotoxicidade, apoptose e inibição do crescimento do tumor (De Mejia e Prisecaru, 2005). Várias outras lectinas de plantas apresentaram efeito inibitório em células malignas “*in vitro*”, por exemplo, a lectina de *Amaranthus caudatus* (ACA) apresentou efeito de inibição tumoral e citotoxicidade em células cancerígenas do cólon humano (Yu *et al.*, 2001); a aglutinina (WGA) do trigo (*Triticum aestivum* L.) foi capaz de ligar à membrana ou aos receptores de membrana de células do carcinoma pancreático humano, provocando a internalização da lectina resultando na apoptose e a condensação da cromatina (Schwarz *et al.*, 1999); a ConA (*Canavalia ensiformis*) ligou-se diretamente aos receptores de membrana das células do carcinoma de pele de Merkel, provocando adesão entre as células (Sames *et al.*, 2001). Embora as lectinas parecem ter grande potencial como agentes anticâncer, mais pesquisas ainda são necessárias e devem incluir uma abordagem genômica e proteômica (De Mejia e Prisecaru, 2005).

Por causa da possível participação de lectinas no mecanismo de defesa de plantas, essas proteínas e seus genes estão sendo usados como ferramentas contra patógenos e predadores e, atualmente várias são as lectinas que interagem com microorganismos, como: a ConA, a WGA a SBA, a PHA, a lectina (PNA) do amendoim (*Arachis hypogaea*). Entre as bactérias que reconhecem as lectinas estão uma variedade de bactérias Gram negativas e positivas e, também formas especializadas como micobactéria e micoplasma. Já em 1936 Sumner e Howell mostraram em seus estudos clássicos com a ConA que essa lectina é capaz de aglutinar espécies de *Mycobacterium* e *Actinomyces*. Hamada *et al* (1977) relataram que 13 das 15 espécies de *Streptococcus mutans* testadas foram aglutinadas pela ConA. *Neisseria gonorrhoeae* tem sido consistentemente aglutinadas pela WGA, outras espécies de *Neisseria* e *Branhamella catarrhalis* não são aglutinadas por essa lectina. As lectinas SBA e PNA e a lectina de *Ricinus communis* também aglutinam espécies de *N. gonorrhoeae* (Schaefer *et al.*, 1979). Schiefer *et al* (1974) usaram um total de dez lectinas para caracterizar a superfície estrutural de *Mycoplasma* spp. A lectina das sementes de *Archidendron jiringa* Nielsen mesmo em baixas concentrações, purificada por cromatografia de afinidade em ConA - Sepharose 4B, apresentou atividade inibitória contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* (Charungchitrak *et al.*, 2011).

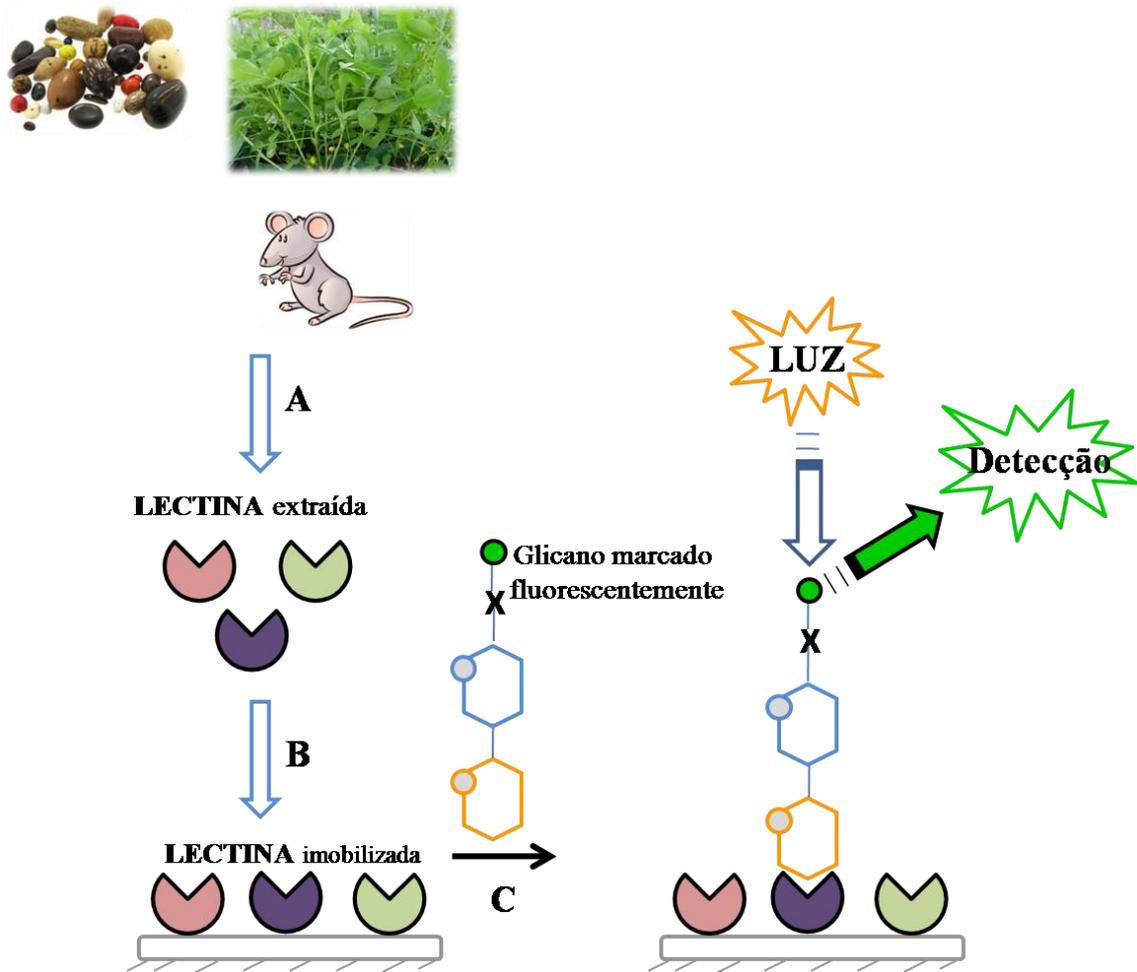
Tal como aconteceu com as bactérias, os primeiros estudos sobre interações lectina-fungo foi com a ConA. Há 70 anos Sumner e Howell (1936) relataram que

células de *Saccharomyces cerevisiae* foram fortemente aglutinadas por essa lectina. ConA também interage com outras espécies de *Saccharomyces* sem nenhum pré-tratamento, indicando que ligantes para esta lectina estão disponíveis na superfície dessas células (Pistole, 1981). Embora a maioria dos estudos de interação lectina-*Saccharomyces* tem usado a ConA, pelo menos um relato indica que WGA também liga-se a essas células de leveduras (Horisberger *et al.*, 1976). Até o momento, inúmeros trabalhos “*in vitro*” são apresentados com evidências de inibição de crescimento de fungos pelas lectinas, por exemplo: a lectina isolada dos rizomas de *Curcuma amaríssima* foi capaz de inibir o crescimento de *Exserohilum turcicum*, *Fusarium oxysporum* e *Colectrotrichum cassiicola* na faixa de concentração da lectina de 17,5 a 35 µg/mL (Kheeree *et al.*, 2010). A lectina das sementes de *Archidendron jiringa* Nielsen também apresentou atividade antifúngica contra esses mesmos três fungos (Charungchitrak *et al.*, 2011). A lectina (PHA) da semente de *Phaseolus vulgaris* apresentou efeito supressivo no crescimento dos fungos *Fusarium oxysporum*, *Coprinus comatus* e *Rhizoctonia solani* (Ye *et al.*, 2001). Por outro lado, uma lectina isolada da semente de *Phaseolus vulgaris* cv. “Anasazi beans” não apresentou nenhuma atividade antifúngica (Sharma *et al.*, 2009). A lectina isolada das sementes de pimenta (*Capsicum annum*) foi capaz de inibir a germinação dos esporos e o crescimento das hifas dos fungos *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium solani* e *Fusarium graminearum* (Kuku *et al.*, 2009). Uma lectina (SAL) isolada das sementes de *Sophora alopecuroides* suprimiu o crescimento micelial de *Penicillium digitatum* e *Alternaria alternata*, a inibição desse crescimento foi visualizada após 24 horas de tratamento e a concentração de SAL foi de 3,12 e 3,33 µM, respectivamente (Li *et al.*, 2012). Enfim, vários trabalhos evidenciam a interferência de lectinas de plantas no crescimento ou no desenvolvimento de diferentes espécies de fungos, por exemplo: as lectinas isoladas da semente de *Artocarpus incisa*, de *Artocarpus integrifolia*, de *Triticum vulgare*, todas com especificidade N-acetil-glicosamina, exibiram atividade antifúngica contra *Fusarium moniliforme*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Fusarium oxysporium* e *Fusarium graminearum* (Trindade *et al.*, 2006); as lectinas isoladas das sementes de *Pisum sativum* e *Talisia esculenta* com especificidade a D-manose inibiram o crescimento de *Aspergillus flavus*, *Fusarium oxysporium*, *Trichoderma viride* e *Colletotrichum lindemuthiam*, *Fusarium oxysporium*, *Saccharomyces cerevisiae*, respectivamente (Sitohy *et al.*, 2007; Freire *et al.*, 2002). Por outro lado, lectinas isoladas de outras partes das plantas, como a lectina da casca da *Sebastiania jacobinensis* (SejaBL) inibiu

o crescimento micelial de *Fusarium moniliforme* e *Fusarium oxysporum* (Vaz *et al.*, 2010); a lectina da raiz de *Astragalus mongholicus* com afinidade a *D*-galactose e lactose inibiu o crescimento dos fungos *Borrytis cinerea*, *Colletrichum sp.*, *Droschlara turi* e *Fusarium oxysporum* (Yan *et al.*, 2005).

Todos esses relatos estão baseados na ligação da lectina aos constituintes da parede celular dos fungos, desta forma deve-se, para demonstrar a atividade antifúngica de lectinas de plantas, evitar o uso de lectinas contaminadas por outras proteínas fungicidas, tal como as quitinases (Rüdiger, 1991).

Atualmente, as lectinas estão sendo usadas em dispositivos detectores e assim estão sendo classificadas como os novos bioreceptores, devidos às suas especificidades de ligação a carboidratos (Rahaie e Kazemi, 2010). O princípio de detecção é a ligação específica do analito de interesse ou grupo de analito a um elemento de bioreconhecimento imobilizado em um meio de suporte adequado (Sharma *et al.*, 2003; Neethirajan *et al.*, 2005). Há pouco tempo, lectinas foram escolhidas em aplicações de bioseparação onde os glicoconjugados estão envolvidos (**Figura 4**).



**Figura 4:** Um típico método para a produção de um dispositivo para a detecção óptica baseada em lectina, incluindo **A**- extração da lectina, **B**- imobilização da lectina em uma superfície sólida e **C**- biosensoriamento do glicano marcado por fluorescência.

Fonte: RAHAIE, M.; KAZEMI, S.S. 2010. Lectin-based biosensors: As powerful tools in bioanalytical applications. *Biotechnology*, 9: 428-443.

Diferentes lectinas são usadas para isolar glicoproteínas e glicolipídios com diferentes estruturas de carboidratos, por exemplo: ConA reconhece domínios oligomanosil em glicanos N-ligados (Ohyama *et al.*, 1985), a lectina (PNA) do amendoim é específica para glicanos O-ligados (Neurohr *et al.*, 1980) e a lectina do fungo *Aleuria aurantia* apresenta especificidade para oligossacarídeos contendo fucose (Monzo *et al.*, 2007). Um das aplicações mais importantes dos biosensores com lectinas imobilizadas está nas áreas médicas e terapêuticas (Rahaie e Kazemi, 2010). Os glicanos presentes nas superfícies de células desempenham importantes funções biológicas e, sua expressão anormal tem sido correlacionada com algumas doenças,

como diabetes, doença de Alzheimer, imunodeficiência e, em particular câncer (Stöckmann *et al.*, 2011). O desenvolvimento de métodos altamente sensíveis para ensaiar glicanos nas células é muito importante para entender e diagnosticar o desenvolvimento de doenças e também, fornecer ferramentas para o tratamento (Zhang *et al.*, 2011).

Safina *et al.*, (2008) propuseram um novo biosensor baseado em lectina de cristal de quartzo – Quartz Crystal Microbalance - (QCM) para identificar a presença de diferentes bactérias usando as lectinas imobilizadas na superfície do QCM; as bactérias injetadas são reconhecidas por meio da ligação dos oligossacarídeos da parede celular às lectinas imobilizadas. O biosensor proposto é capaz de detectar  $10^3$  células e o ensaio de injeção do fluxo das células bacterianas levou cerca de 30 minutos. Zhang (*et al.*, 2011) relataram um novo biosensor eletroquímico baseado em lectina (ConA) construído com nano tubos de carbono multivalentes funcionalizados (CNTs), essa plataforma oferece um meio altamente estável e bioativo para a imobilização da ConA, a fim de se fazer ensaios da expressão de glicanos em células cancerígenas vivas. Atualmente, a aplicabilidade dos sistemas de biosensores para a determinação precisa de analitos de interesse biomédico de diversas amostras clínicas, como sangue, urina, saliva, tecidos de células, é altamente desejável a fim de estabelecer ferramentas analíticas rápidas e confiáveis, evitando o consumo de amostra e de tempo nos métodos que necessitam de pré-tratamento da amostra (Shankaran *et al.*, 2007).

Diante do amplo espectro de aplicações biotecnológicas das lectinas, a temática desta tese está inserida no contexto da prospecção (biomoléculas – proteínas) e uso de recursos vegetais (sementes) da Amazônia com vistas no propósito de agregar valor a diferentes espécies arbóreas (Fabaceae) perseguindo-se a lógica da pesquisa e desenvolvimento de produtos (P&D) (produto anti-fúngico).

Algumas lectinas foram isoladas das sementes de Fabaceae coletadas na Amazônia Central e suas propriedades bioquímicas foram, inicialmente, caracterizadas; como em espécies do gênero *Parkia*, classificadas na subfamília Mimosoideae, onde as espécies arbóreas de origem tropical são consideradas um grupamento primitivo nas Fabaceae. A lectina nas sementes de *Parkia discolor* (PDL) é específica a Glc/Man, apresenta uma banda protéica única em SDS-PAGE com massa molecular estimada em 58 kDa e é caracterizada pelo alto conteúdo de aminoácidos glicina e prolina, porém ausência de cisteína (Cavada *et al.*, 2000). Uma lectina das sementes de *Parkia platycephala* foi também isolada e apresentou um padrão eletroforético semelhante à

PDL, porém com uma similaridade de sequência em três domínios seguidos com a lectina jacalina. A infectividade do citomegalovírus humano (HCMV) foi inibida “*in vitro*” pela lectina da semente de *Parkia pendula* (PpeL) em contraste com o vírus 6 da herpes humanos (HIV-6) que não teve sua infectividade afetada pela PpeL (Favacho *et al.*, 2007). Indicativos da presença de lectinas foram encontrados em frações protéicas das sementes de *Parkia multijuga*, onde os resultados não deixam dúvida quanto à existência de pelo menos uma lectina presente nas frações protéicas das albuminas e globulinas. O extrato protéico das sementes de *Parkia nitida* foi também fracionado e a atividade hemaglutinante foi verificada apenas na fração das globulinas, quando testada contra eritrócitos tripsinizados de coelho, o que poderia sugerir a existência de pelo menos uma lectina presente nesta fração (dados não publicados).

Em duas espécies do gênero *Erythrina* de distribuição na Amazônia, *Erythrina fusca* e *Erythrina velutina* foram identificadas lectinas. A lectina da semente de *Erythrina velutina* é um potente aglutinador de eritrócitos humanos O<sup>+</sup> e esta atividade é inibida por D-galactose e  $\alpha$ -lactose, é uma glicoproteína, é composta de duas subunidades idênticas com massa molecular 31,6 kDa cada uma e não é termoestável, pois perdeu a atividade ao ser aquecida durante 10 minutos a 70 °C; a lectina da semente de *Erythrina fusca* se liga a  $\alpha$ -lactose, apresenta uma banda protéica em SDS-PAGE de massa estimada em 28 kDa e é uma glicoproteína (Moraes *et al.*, 1996).

Outras espécies com distribuição geográfica na região Amazônica, a partir de suas sementes tiveram lectinas isoladas e caracterizadas, tais como *Bauhinia bauhinioides* (Mart.) J.F. Macbr. (Silva *et al.*, 2011), *Canavalia boliviana* Piper (Moura *et al.*, 2008), *Canavalia brasiliensis* Mart. *ex*Benth (Moreira e Cavada, 1984), *Canavalia ensiformis* DC. (subespontânea) (Melgarejo *et al.*, 2005), *Canavalia grandiflora* Benth. (Ceccatto *et al.*, 2002), *Cymbosema roseum* Benth. (Cavada *et al.*, 2006), *Dioclea grandiflora* Mart.*ex*Benth. (Ainouz *et al.*, 1987), *Dioclea violacea* Mart. *ex*Benth (Moreira *et al.*, 1996), *Dioclea sclerocarpa* Ducke (Correia *et al.*, 2011), *Dioclea virgata* (Rich.) Amshoff (Cavada *et al.*, 1996), *Dioclea wilsonii* Standl. (Rangel *et al.*, 2011).

Por tudo, nesta tese foram envidados esforços no sentido de se obter a caracterização bioquímica e atividade antifúngica de lectinas presentes em sementes de Fabaceae da Amazônia.

### **3-OBJETIVO GERAL**

Investigar extratos protéicos de sementes de Fabaceae da Amazônia Central visando ao isolamento, à purificação e à caracterização de novas lectinas e testá-las quanto a(s) potencial(s) atividades antifúngicas, assim como buscar relações de filogenia de subgrupos da família Fabacea.

Para melhor sistematização do conteúdo, esta tese foi dividida em dois capítulos, os quais apresentam finalidades definidas e complementares, são eles:

**Capítulo I:** “*Sementes de Fabaceae da Amazônia como fontes de novas lectinas*”, que trata de uma triagem direcionada (“*screening*”) a partir dos extratos protéicos de sementes de cinquenta espécies de Fabaceae da Amazônia, consubstanciando o esforço pela busca por lectinas a partir de testes de hemaglutinação e de isolamento protéico.

**Capítulo II:** “*Purificação e Caracterização de uma lectina da semente de Swartzia laevis*”, neste capítulo são apresentados atributos estruturais e funcionais de uma nova lectina encontrada no conjunto das cinquenta espécies originalmente investigadas.

## CAPITULO I

### “SEMENTES DE FABACEAE DA AMAZÔNIA COMO FONTE DE NOVAS LECTINAS”

#### 1-INTRODUÇÃO

Fabaceae é uma das três maiores famílias de angiospermas, com 19.327 espécies e 727 gêneros arranjados em 36 tribos (Lewis *et al.*, 2005), estimando-se a biodiversidade global. A ocorrência dessa família botânica no Brasil é bastante significativa; sendo que, desse total de gêneros, 210 estão presentes nos diferentes biomas brasileiros: incluindo a Amazônia, o Cerrado, a Caatinga, a Mata Atlântica, o Pantanal e os Pampas foram listados 2.964 espécies (1.458 endêmicas), 53 subespécies (16 endêmicas) e 731 variedades (419 endêmicas) (Lima, 2010). As sementes, os legumes, as folhas, as raízes e as flores de muitas de suas espécies são fontes de alimentos ricos em proteínas para homens e animais em quase todas as partes do mundo (Lewis & Owen, 1989).

Há pouco tempo as plantas da família Fabaceae eram denominadas Leguminosae, por isso esses vegetais são conhecidos popularmente como “leguminosas”, pois o nome relacionava-se a forma do fruto de muitas espécies, caracterizados como vagem ou legume. O conhecimento popular deve-se principalmente pelo uso de espécies da Fabaceae como alimento tais como o feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), o amendoim (*Arachis hypogaea*), a lentilha (*Lens esculenta*), o grão de bico (*Cicer arietinum*), o feijão de asa (*Psophocarpus tetragonolobus*) a ervilha (*Pisum sativum*), o feijão de corda (*Vigna unguiculata*), a soja (*Glycine max*), o feijão macuco (*Pachyrhizus tuberosus*) (Souza, 2012).

A família Fabaceae está dividida em três subfamílias, Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae, morfologicamente distintas entre si e, distribuída por todos os ecossistemas terrestres (Polhill *et al.*, 1981, Lewis *et al.*, 2005). Fabaceae pertence à ordem Fabales e a morfologia floral é utilizada como critério para se fazer as distinções entre os gêneros e as espécies das subfamílias (Souza, 2012). As principais características das subfamílias são:

- **Caesalpinioideae:** As espécies são constituídas por árvores, arbustos e poucas plantas herbáceas, distribuídas principalmente nos trópicos e subtropicais, com cerca de

180 gêneros e entre 2.500 a 3.000 espécies. As folhas são usualmente pinadas ou algumas vezes bipinadas. Todos os gêneros com espécies que apresentam folhas bipinadas em geral pertencem à tribo Caesalpinieae (Gentry, 1996). As flores são ligeiramente zigomorfas e, as pétalas laterais (alas), cobrem o estandarte no botão. Os estames são em número de 10 ou menos (livres ou monoadelfos). É considerada a subfamília mais primitiva dentro das leguminosas (Souza, 2012).

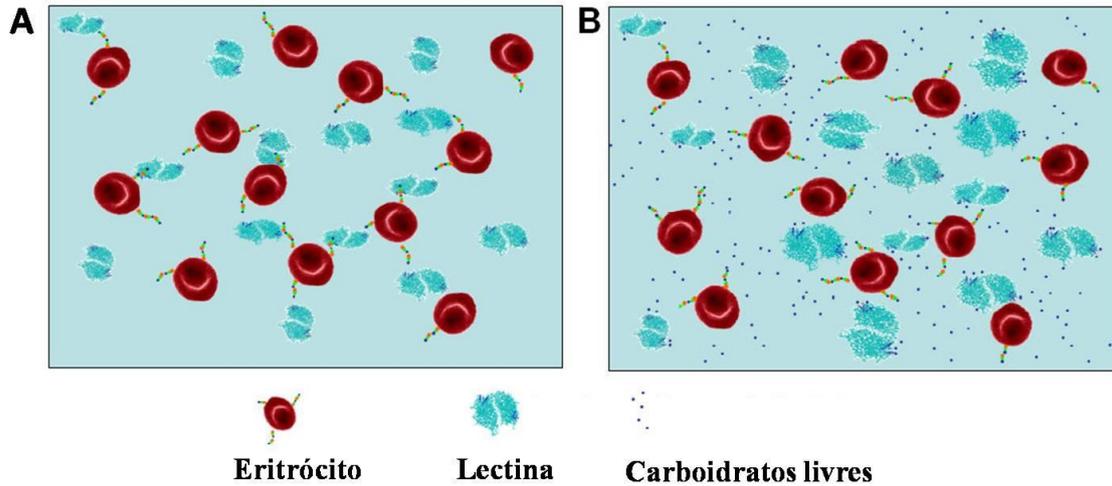
- **Mimosoideae:** As árvores e os arbustos ou as trepadeiras lenhosas, encontram-se, principalmente, nos trópicos e subtropicais com aproximadamente 56 gêneros onde se estima a ocorrência de 3.000 espécies (Lorenzi, 2002). As folhas são usualmente bipinadas, com glândulas na raqui (exceto em *Inga*), onde as folhas são apenas pinadas, com uma glândula conhecida como nectário extrafloral está posicionada entre cada par de folíolos. O pecíolo geralmente apresenta pulvino. A presença de espinhos é comum nesta subfamília, onde as espécies foram muitas vezes diferenciadas no ambiente seco, e estas podem ter origem de estipulas ou ocorrer ao longo dos ramos. As flores são regulares ou actinomorfas, andrógenas ou unissexuais, com pétalas valvares no botão; estames 10 ou mais. Em termos evolutivos as espécies desta subfamília estão posicionadas entre as Caesalpinioideae e Faboideae (Perez, 2008).

- **Faboideae:** Os indivíduos são constituídos, principalmente por ervas, mas, também por árvores e arbustos distribuídos nas zonas temperadas, tropicais e subtropicais, com cerca de 400 a 500 gêneros e acima de 10.000 espécies. As folhas são usualmente pinadas, mas algumas vezes simples unifolioladas (*Andira*) ou trifolioladas, o que ocorre especialmente nos diferentes tipos de feijões. As flores são hermafroditas, tipicamente zigomorfas, com as pétalas laterais (alas) recobertas pelo estandarte, no botão; estames 10, usualmente diadelfos (9 + 1), mas algumas vezes monoadelfos ou livres. As espécies desta subfamília, especialmente as ervas, são consideradas mais evoluídas dentre as leguminosas (Souza, 2012).

Em termos primitivos, a subfamília Caesalpinioideae originou as subfamílias Mimosoideae e a Faboideae e, considera-se, atualmente, que os representantes das Faboideae formam um grupamento mais evoluído, e também, numericamente predominante dentro da família Fabaceae, com 441 gêneros e cerca de 12.300 espécies distribuídas em todo o mundo (Corby, 1981). Dos 210 gêneros de leguminosas registrados para os biomas brasileiros (Lima, 2010), foi verificado, após atualização do conhecimento existente até então, que 160 deles estão representados na Amazônia.

A bioprospecção da diversidade de plantas silvestres em busca de produtos úteis na área médica, agrícola e de produtos florestais não-madeireiros pode ajudar a resolver alguns dos desafios da humanidade. Este esforço pode também ajudar a abordar as questões evolutivas que ainda não foram respondidas (Fernandes *et al.*, 2011). Lectinas de plantas encontradas nas sementes de leguminosas da Amazônia são um alvo particularmente intrigante para bioprospecção. Embora mais de um século se passou desde que a primeira lectina foi relatada e, alguns estudos de “*screening*” periodicamente revelam novas lectinas, muitas fontes potenciais de lectinas ainda precisam ser examinadas. Quase todo o nosso conhecimento atual sobre a estrutura, especificidade, afinidade de interações lectina-carboidrato, foi conseguido por meio de estudos com lectinas de leguminosas (Loris *et al.*, 1998). Além disso, os dados estruturais de lectinas de leguminosas têm ajudado a estabelecer as relações evolutivas entre táxons de leguminosas (Rougé *et al.*, 1987; Rougé and Varloot, 1990; Barre *et al.*, 1994). As sequências de aminoácidos e o processamento pós-transducional das lectinas das tribos de leguminosas mais comuns, tais como Parkieae e Phaseoleae, foram úteis para sustentar a quimiotaxonomia desses grupos (Gallego Del Sol *et al.*, 2005; Moreno *et al.*, 2008).

A principal evidência da presença de lectinas em extratos protéicos é revelada principalmente por meio de um ensaio de hemaglutinação, como ilustrado na **Figura 5A**, no qual utiliza uma diluição seriada da lectina, antes da incubação com eritrócitos (Coelho e Da Silva, 2000; Pajic *et al.*, 2002). Em seguida, a especificidade primária da lectina é visualizada por meio do ensaio de inibição da atividade hemaglutinante da proteína utilizando no ensaio carboidratos livres (**Figura 5B**).



**Figura 5:** A- Representação esquemática da rede de eritrócitos promovida pela ligação da lectina aos carboidratos da superfície das células: **A- HEMAGLUTINAÇÃO. B- INIBIÇÃO** da atividade hemaglutinante pela ligação da lectina aos carboidratos livres.  
 Fonte: Paiva, P.M.G.; Gomes, F.S.; Napoleão, Sá, T.H.; Correia, M.T.S.; e Coelho, L.C.B.B. 2010. Antimicrobial activity of secondary metabolites and lectins from plants. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. FORMATEX.

Para descrever novas lectinas de sementes de Fabaceae, cinquenta espécies da família Fabaceae nativas da Amazônia foram investigadas quanto à presença de lectinas. Além disso, investigou-se a hipótese que lectinas de plantas encontradas em sementes de diferentes subfamílias de Fabaceae na floresta amazônica pode refletir a história evolutiva dos táxons.

Portanto, reiterando, o objetivo deste capítulo foi investigar nos extratos protéicos de sementes de diferentes espécies de Fabaceae da Amazônia a existência de novas lectinas que estivessem inseridas na perspectiva de marcadores bioquímicos da filogenia de Fabaceae.

## 2-MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1- Material Botânico

As sementes maduras de cinquenta espécies da família Fabaceae nativas da floresta amazônica no Brasil foram coletadas ao longo do ano de 2010 em diferentes locais na Amazônia Ocidental. Amostras de cada lote de sementes coletadas foram separadas e depositadas no herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA / MCTI) para serem identificadas. A **Tabela 4** lista as espécies das três subfamílias da família Fabaceae que foram coletadas e estudadas. As sementes dessas espécies foram trituradas em moinho analítico, este material finamente pulverizado foi armazenado a 4 °C e estocado até o momento das análises.

**Tabela 4-** Relação das 50 espécies da família Fabaceae nativas da Amazônia Central, coletadas de diferentes regiões e selecionadas para se pesquisar quanto à presença de lectinas, incluindo a classificação por subfamília e por tribo.

Subfamília	Tribo	Espécie	Subfamília	Tribo	Espécie
Caesalpinioideae	Caesalpinieae	<i>Campsiandra laurifolia</i>	Mimosoideae	Parkieae	<i>Parkia panurensis</i>
Caesalpinioideae	Cassieae	<i>Cassia grandis</i>	Mimosoideae	Mimoseae	<i>Stryphnodendron guianense</i>
Caesalpinioideae	Cassieae	<i>Cassia leiandra</i>	Mimosoideae	Ingeae	<i>Zygia cauliflora</i>
Caesalpinioideae	Detarieae	<i>Copaifera venezuelana</i>	Mimosoideae	Ingeae	<i>Zygia inaequalis</i>
Caesalpinioideae	Detarieae	<i>Crudia oblonga</i>	Mimosoideae	Ingeae	<i>Zygia trunciflora</i>
Caesalpinioideae	Detarieae	<i>Cynometra bauhiniifolia</i>	Mimosoideae	Ingeae	<i>Zygia unifoliolata</i>
Caesalpinioideae	Cassieae	<i>Dialium guianense</i>	Faboideae	Phaseoleae	<i>Centrosema plumieri</i>
Caesalpinioideae	Cassieae	<i>Dicorynia paraensis</i>	Faboideae	Phaseoleae	<i>Centrosema triquetrum</i>
Caesalpinioideae	Caesalpinieae	<i>Dimorphandra caudata</i>	Faboideae	Dalbergieae	<i>Dalbergia spruceana</i>
Caesalpinioideae	Detarieae	<i>Hymenaea courbaril</i>	Faboideae	Phaseoleae	<i>Dioclea bicolor</i>
Caesalpinioideae	Caesalpinieae	<i>Caesalpinia ferrea</i> var. <i>ferrea</i>	Faboideae	Sophoreae	<i>Leptolobium nitens</i>
Caesalpinioideae	Detarieae	<i>Macrolobium multijugum</i>	Faboideae	Sophoreae	<i>Ormosia costulata</i>
Caesalpinioideae	Detarieae	<i>Peltogyne paniculata</i>	Faboideae	Sophoreae	<i>Ormosia discolor</i>
Caesalpinioideae	Cassieae	<i>Senna tapajozensis</i>	Faboideae	Sophoreae	<i>Ormosia grossa</i>
Caesalpinioideae	Caesalpinieae	<i>Tachigali hypoleuca</i>	Faboideae	Sophoreae	<i>Ormosia lignivalvis</i>
Mimosoideae	Mimoseae	<i>Anadenanthera peregrina</i>	Faboideae	Sophoreae	<i>Ormosia macrocalyx</i>
Mimosoideae	Mimoseae	<i>Dinizia excelsa</i>	Faboideae	Sophoreae	<i>Ormosia paraensis</i>
Mimosoideae	Mimoseae	<i>Entada polystachya</i> var. <i>polyphylla</i>	Faboideae	Sophoreae	<i>Ormosia smithii</i>
Mimosoideae	Ingeae	<i>Enterolobium schomburgkii</i>	Faboideae	Swartzieae	<i>Swartzia argentea</i>
Mimosoideae	Ingeae	<i>Macrosamanea spruceana</i>	Faboideae	Swartzieae	<i>Swartzia ingifolia</i>
Mimosoideae	Ingeae	<i>Inga pezizifera</i>	Faboideae	Swartzieae	<i>Swartzia laevicarpa</i>
Mimosoideae	Parkieae	<i>Parkia decussate</i>	Faboideae	Swartzieae	<i>Swartzia longistipitata</i>
Mimosoideae	Parkieae	<i>Parkia gigantocarpa</i>	Faboideae	Swartzieae	<i>Swartzia pendula</i>
Mimosoideae	Parkieae	<i>Parkia multijuga</i>	Faboideae	Swartzieae	<i>Swartzia polyphylla</i>
Mimosoideae	Parkieae	<i>Parkia nitida</i>	Faboideae	Swartzieae	<i>Swartzia sericea</i>

Fonte: FERNANDES, A.V.; RAMOS, M.V.; GONÇALVES, J.F.C.; MARANHÃO, P.A.C.; CHEVREUIL, L.R.; SOUZA, L.A. 2011. Seeds of Amazonian Fabaceae as a source of new lectins. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 23, 237 – 244.

## **2.2- Extração protéica**

As sementes inteiras e maduras das 50 espécies da família Fabaceae, foram individualmente trituradas em moinho analítico de facas (IKA – WERKE – M20 – Universal) até obtenção de um material finamente pulverizado. Esse material foi homogeneizado em solução salina de NaCl 0,15 M e a suspensão (10% p/v) foi mantida sob leve agitação, a temperatura ambiente, durante 2 horas. Após esse período, a fração de proteínas solúveis de cada extrato foi recuperada por meio de centrifugação a 11.000 x g durante 20 minutos a 10 °C, onde o resíduo foi descartado e o sobrenadante submetido à diálise contra água destilada durante 72 horas a 4 °C, com no mínimo quatro trocas diárias de água. Após esse período, a solução contendo as proteínas solúveis foi liofilizada, até obtenção de uma massa totalmente seca (modificado de Cavalcanti *et al.* 1990).

## **2.3- Ensaios de hemaglutinação:**

### **2.3.1- Preparo dos eritrócitos:**

Amostras de 3 mL de sangue de coelho ou de rato branco foram coletadas, sob punção venosa, de animais saudáveis provenientes do Biotério Central do INPA e, homogeneizadas com 30 µL de heparina sódica (Actparin 5.000 UI / mL – Bergamo). O sangue heparinizado foi transportado no gelo para o Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Vegetal (LFBV / CDAM / INPA). Ao sangue foram adicionados 15 mL de NaCl 0,15 M e a mistura foi centrifugada a 3.000 rpm, durante 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante do centrifugado foi descartado e a polpa de eritrócitos precipitada foi ressuspendida em NaCl 0,15 M para nova centrifugação. Esse procedimento foi repetido mais três vezes. O resíduo final foi ressuspendido em NaCl 0,15 M, de modo a obter uma suspensão de eritrócitos a 2% v/v em NaCl 0,15 M (Moreira e Cavada, 1984).

### **2.3.2- Determinação da atividade hemaglutinante (AHE):**

A AHE foi determinada pelo método de diluição seriada em placas de microtitulação contendo 8 fileiras de 12 poços; inicialmente, a cada um dos poços adicionou-se 25 µL da solução salina (NaCl 0,15 M), em seguida 25 µL da amostra (extrato protéico de cada uma das 50 espécies na concentração 5 mg / mL em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,6 adicionado de NaCl 0,15 M) no primeiro poço e, nos demais foi feita a diluição seriada até o último poço, por último foram adicionados em cada poço 25 µL da suspensão de eritrócitos a 2% v/v, posteriormente as placas foram incubadas

durante 30 minutos a 37 °C e os resultados foram analisados a olho nu após 30 minutos a temperatura ambiente e, 12 horas após o período de incubação (Moreira e Perrone, 1977).

#### **2.4- Determinação da inibição da AHE:**

O ensaio de inibição da AHE frente a diferentes carboidratos: N-acetil-D-galactosamina,  $\alpha$ -lactose, D-galactose, 2-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo,  $\beta$ -D-metil-galactopiranosídeo,  $\alpha$ -D-metil-galactopiranosídeo, D-mannose, N-acetil-D-glicosamina, D-glicose,  $\alpha$ -D-metil-glicopiranosídeo, D-frutose, L-arabinose, sacarose e maltose e realizado como previamente descrito por Ramos (1997). Os extratos protéicos (5 mg / mL em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,6 adicionado de NaCl 0,15 M) que apresentaram AHE, sob as condições testadas, foram incubados com concentrações decrescentes de carboidratos (100 mM) e posteriormente foi adicionado a cada poço uma suspensão de eritrócitos nativos a 2% v/v nas placas de microtitulação. As placas foram incubadas durante 30 minutos a 37 °C e os resultados foram em seguida analisados a olho nu.

#### **2.5- Purificação das lectinas:**

##### **2.5.1- Cromatografia de troca iônica:**

Os extratos protéicos que exibiram AHE foram passados por uma coluna cromatográfica de troca aniônica DEAE Sepharose Fast Flow (GE Healthcare). A resina (20 mL) foi empacotada em uma coluna de poliestireno com dimensões 1,5 x 12 cm e equilibrada com tampão Tris-HCl 0,05 M pH 8,0. Os extratos protéicos (2,5 mg / mL em Tris-HCl 0,05 M pH 8,0) foram aplicados na coluna e, as frações das amostras (v = 2,0 mL) que não foram retidas pela resina foram primeiramente eluídas no mesmo tampão de solubilização, a um fluxo constante de 20 mL / h. Em seguida, foi aplicado um gradiente salino utilizando os tampões Tris-HCl 0,05 M com pH 8,0 contendo NaCl 0,1 M; 0,5 M e NaCl 1 M. O monitoramento do perfil cromatográfico foi realizado por meio das leituras espectrofotométricas no comprimento de onda igual a 280 nm (Espectrofotômetro UV / Visível Ultrospec 2100 pro Armesham Biosciences). Nas frações correspondentes a cada pico, foi realizada a diálise e a liofilização das amostras e, em seguida foram realizados ensaios da AHE como descrito anteriormente.

### **2.5.2- Cromatografia de afinidade:**

A cromatografia de afinidade foi realizada em uma coluna de vidro com dimensões 30 x 2 cm, contendo 20 mL da resina  $\alpha$  – Lactose – Agarose (SIGMA) ou 15 mL da resina N – Acetil – D – Galactosamina (SIGMA), a resina foi equilibrada com tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,6 contendo NaCl 0,15 M, CaCl<sub>2</sub> 0,005 M e MnCl<sub>2</sub> 0,005 M. Os extratos protéicos (2,5 mg / mL Tris-HCl 0,1 M pH 7,6 contendo NaCl 0,15 M, CaCl<sub>2</sub> 0,005 M e MnCl<sub>2</sub> 0,005 M) obtidos das sementes de espécies da família Fabaceae foram aplicados naquela coluna e, inicialmente eluídas com o tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,6 contendo NaCl 0,15 M, CaCl<sub>2</sub> 0,005 M e MnCl<sub>2</sub> 0,005 M para retirar as proteínas não ligadas à resina, frações de 2 mL. Após essa eluição, as proteínas retidas foram removidas da coluna com solução tampão de glicina 0,1 M pH 2,6 contendo NaCl 0,15 M. Cada fração protéica (v = 4,0 mL) foi dialisada e ensaiada quanto à presença da AHE, aquelas frações com evidência da presença foram liofilizadas.

### **2.6- Eletroforese em gel de poliacrilamida:**

A eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) foi desenvolvida segundo o método de Laemmli (1970). O sistema empregado foi descontínuo e os géis de concentração e separação foram obtidos a partir de uma solução estoque de acrilamida 30% p/v contendo N-N'-metileno bis-acrilamida 0,8% p/v. A concentração final do gel de concentração foi igual a 5% p/v e foi preparado em tampão Tris-HCl 0,5 M pH 6,8; gel de separação a concentração foi igual a 12,5% p/v em tampão Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8, sendo acrescentado em ambos os géis SDS 20% p/v. A polimerização foi conseguida pela adição de TEMED e PSA a 10% p/v para ambos.

As amostras protéicas (10–20  $\mu$ g) foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,0 contendo 1% p/v de SDS, 1% v/v de  $\beta$ -mercaptoetanol e 10% v/v de glicerol e, posteriormente imersas em água em ebulição durante 10 minutos. A eletroforese foi realizada em tampão de corrida Tris-HCl 0,025 M, glicina 0,192 M e SDS 0,1% p/v. As condições de corrida foram iguais a 120 volts, 15 mA por gel, temperatura de 20 °C e durante aproximadamente 2 horas. Foram utilizados os marcadores de massas moleculares da Promega (220 kDa - 10 kDa), conforme recomendações do fabricante.

Após o desenvolvimento eletroforético, os géis foram corados com solução de Coomassie Brilliant Blue R-250 a 0,2% v/v de ácido acético glacial: metanol: água destilada na proporção de 1: 4: 5 durante 2 horas. Após esse período, os géis foram

descorados com solução de ácido acético glacial: metanol: água destilada na proporção 1: 4: 5.

### **2.6.1- Eletroforese em gel de poliacrilamida 2D:**

A focalização isoeétrica (FI) do pico (**PIII** 0,3 M NaCl de *Swartzia ingifolia*) cromatográfico obtido de DEAE Sepharose Fast Flow, foi realizada utilizando o equipamento IPGphor (Ettan IPGPhor 3/GE Healthcare). Amostras de 60 µL (50 µg de fração protéica) foram diluídas em um volume final de 250 µL em solução de reidratação (DeStreak™ rehydration solution/GE Healthcare) com 2% v/v de tampão IPG pH 3 a 10. As amostras foram aplicadas nas fitas com gradiente de pH imobilizado (IPG) (13-cm pH 3 a 10 linear; GE Healthcare) para reidratação. A reidratação passiva foi feita a 50 µA durante 12 h a 20 °C. As fitas foram estocadas a -80 °C durante 24 h e posteriormente aplicadas diretamente sobre o gel para a realização da segunda dimensão. Após a FI, as fitas foram equilibradas em tampão de equilíbrio (50 mM Tris-HCl pH 8,8, 6 M uréia, 30% v/v de glicerol, 2% p/v de SDS e traço de azul de bromofenol) contendo 10 mg / mL ditioneína (DTT) durante 20 minutos. E em uma segunda etapa, com tampão de equilíbrio contendo 25 mg / mL de iodoacetamida durante mais 20 minutos. Finalizada a FI, a separação na segunda dimensão (de acordo com a sua massa molecular) foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5 % p/v em condições desnaturantes, nas seguintes condições: P1- 600 V, 30 mA por gel, 30 W durante 30 minutos e P2 – 600 V, 40 mA por gel, 30 W durante 4 horas.

Os pontos de proteína no gel foram visualizados após tratamento com 0,1% p/v de solução de Coomassie Brilliant Blue R-250. O gel foi escaneado usando o programa Imager Scanner (Amersham Biosciences) e as ferramentas do programa LabScan foram utilizadas. Todos os detalhes do gel individual e as análises comparativas foram realizadas por meio do uso do programa Image-Master 2D Platinum Software 6.0 (Amersham Biosciences).

### **2.7- Digestão das proteínas nos pontos protéicos na análise em 2D e espectrometria de massas ESI-QToF (“Electrospray Ionization”):**

Os pontos protéicos no gel 2D do pico cromatográfico **PIII** 0,3 M NaCl de *Swartzia ingifolia* foram selecionados, escisados, reduzidos, alquilados e submetidos à digestão com tripsina. Uma alíquota de 4,5 µL da mistura resultante de peptídeos foi separada em resina C18 (75 µm x 100 mm) RP-nanoUPLC (nanoAcquity, Waters)

acoplada a um espectro de massas Q-ToF Ultima (Waters) com fonte de “nano eletrospray” a uma taxa de fluxo de 0,6 mL / min. O gradiente foi de 2 a 90% de acetonitrila em 0,1% de ácido fórmico durante 20 minutos. O instrumento foi operado no modo “*top three*”, no qual um espectro MS é obtido, seguido por MS / MS dos três picos mais intensamente detectados.

Os espectros resultantes foram processados utilizando o software Mascote Distiller 2.2.1.0, 2008, Matrix Science (MassLynx V4.1) e comparados com o banco de dados de proteínas do National Center for Biotechnology Information (NCBI) usando o software Mascote, com a carbamimo-metilação como uma modificação fixa, oxidação da metionina como modificação variável, permissão de até uma clivagem de tripsina perdida e uma tolerância de 0,1 Da para precursor e fragmentos de íons.

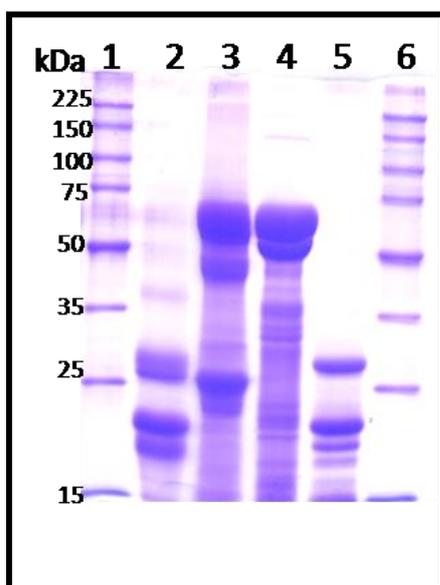
### 3-RESULTADOS E DISCUSSÃO

As sementes de 50 espécies da família Fabaceae foram escolhidas com base em suas posições taxonômicas ou nas suas relações evolucionárias dentro das tribos de leguminosas (**Tabela 4**). Essa estratégia foi escolhida em função do grande número de lectinas de leguminosas que tem sido descrito, principalmente, em espécies Phaseoleae (notadamente da subtribo Diocleinae) e Vicieae (principalmente em *Pisum* e *Lathyrus*) e, em quantidade bem menor, em espécies das tribos Loteae, Robineae, Crotalareae, Abreae e Dalbergieae, enquanto outros grupos têm sido muito poucos investigados, como representantes dos grupos mais primitivos da família Fabaceae (subfamília Faboideae), especialmente Sophoreae e Swartzieae.

O estudo para se verificar a presença de lectinas normalmente utilizam diferentes condições de pH para a extração das proteínas e diferentes fontes de eritrócitos para testar a atividade hemaglutinante (AHE) nos extratos (Ainouz e Sampaio, 1991). Para a análise da AHE dos extratos protéicos das sementes de 50 espécies da família Fabaceae (**Tabela 4**), foi utilizado NaCl 0,15 M, pois nessa condição os extratos que contém lectinas comumente são ativos nos ensaios de hemaglutinação (Fernandes *et al.*, 2011). Todos os 50 extratos protéicos foram investigados para a AHE na presença de dois tipos de eritrócitos: coelho e rato branco. Do total de 50 extratos analisados, somente sete exibiram hemaglutinação com um dos dois tipos de eritrócitos. As espécies cujos extratos protéicos das sementes exibiram AHE foram: *Dimorphandra caudata* (tribo Caesalpinieae), *Anadenanthera peregrina* (tribo Mimoseae), *Ormosia lignivalvis* (tribo

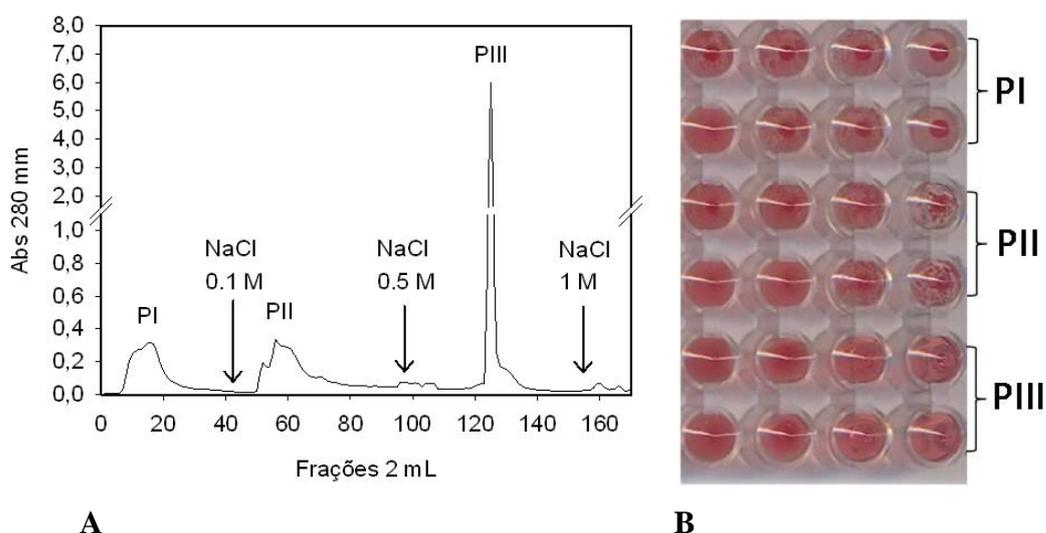
Sophoreae), *Dioclea bicolor* (tribo Phaseoleae) e em três espécies do gênero *Swartzia* (tribo Swartzieae): *Swartzia laevicarpa*, *Swartzia ingifolia* e *Swartzia longistipitata*. Embora a hemaglutinação fora facilmente visualizada após 24 horas, ela foi sempre fraca; os eritrócitos de coelho foram aglutinados por *Dimorphandra caudata* [título:  $2^4$  (HA = 16)] e *Dioclea bicolor* [título:  $2^6$  (HA = 64)], enquanto eritrócitos de rato branco foram aglutinados por *Anadenanthera peregrina* [título:  $2^6$  (HA) = 64)] e *Ormosia lignivalvis* [título:  $2^7$  (HA = 128)]. A AHE desses extratos foi perdida quando as amostras foram aquecidas a 100 °C durante 10 minutos, antes do ensaio de hemaglutinação; desta forma, moléculas protéicas foram provavelmente as responsáveis pela AHE visualizada.

Para avaliar a diversidade das proteínas extraídas, os extratos foram analisados por eletroforese em SDS-PAGE. O perfil protéico daqueles extratos que exibiram AHE é mostrado na **Figura 6**. Os extratos apresentaram um grande número de bandas protéicas, sugerindo que o procedimento de extração das proteínas foi eficiente.



**Figura 6:** Eletroforese em SDS-PAGE 12,5% p/v, em condições redutoras, dos extratos protéicos das sementes de Fabaceae da Amazônia. As proteínas foram visualizadas por meio da coloração com Coomassie Brilliant Blue R-250. **1 e 6:** Marcador de Massa Molecular (PROMEGA). **2, 3, 4 e 5** são quantidades iguais dos extratos protéicos totais de: *Dimorphandra caudata*; *Anadenanthera peregrina*; *Ormosia lignivalvis*; *Swartzia laevicarpa* (**PII** – DEAE Sepharose), respectivamente.

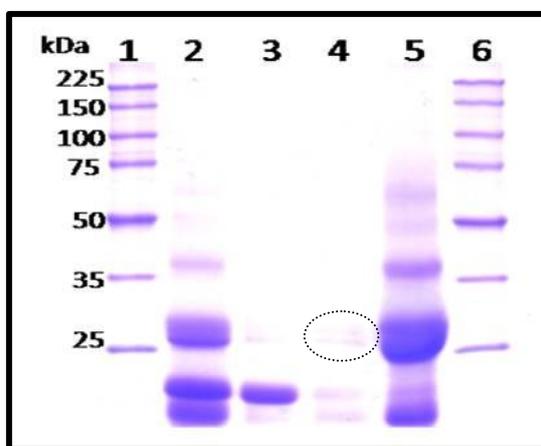
Os extratos protéicos de *Swartzia* exibiram forte atividade hemolítica para os eritrócitos de coelho e de rato branco, a qual impediu a medida da atividade da lectina e sugeriu a presença de hemolisinas ou de saponinas. Contudo, como a hemólise persistiu mesmo após os extratos serem aquecidos, as saponinas devem ter sido provavelmente, responsáveis pela ocorrência da hemólise (Konozy *et al.*, 2002). Sabe-se que, as sementes de espécies pertencentes ao gênero *Swartzia* são caracterizadas pela presença de alta concentração de saponinas (Magalhães *et al.*, 2006). Como as espécies do gênero *Swartzia* são de grande importância evolucionária dentro da família Fabaceae e, como há muito pouca informação sobre as lectinas desse grupo, a atividade da lectina nos extratos das espécies do gênero *Swartzia* foi investigada novamente. Inicialmente, o extrato protéico da espécie *Swartzia laevicarpa* foi fracionado por meio de cromatografia de troca aniônica DEAE Sepharose Fast Flow, para separar os agentes hemolíticos das possíveis lectinas. O extrato de *Swartzia laevicarpa* foi fracionado em três picos protéicos, dos quais as frações foram reunidas para cada pico I, II e III (**PI**, **PII** e **PIII**), em seguida dialisadas, liofilizadas e testadas quanto à presença da AHE. Foi, claramente, visualizada a hemaglutinação dos eritrócitos de coelho, na fração eluída com NaCl 0,1 M (**PII**), enquanto a hemólise foi observada na fração eluída com NaCl 0,5 M (**PIII**) (**Figura 7A e B**).



**Figura 7:** Cromatograma de troca aniônica do extrato de *Swartzia laevicarpa* em uma coluna de DEAE Sepharose Fast Flow e determinação da AHE dos **PI**, **PII** e **PIII**. **A-** Para a análise, 20 mL (2,5 mg / mL) da amostra foi aplicado a uma coluna de DEAE (20 mL) pré-equilibrada com 50 mM de Tris-HCl, pH 8,0. O Pico I (**PI**) foi eluído com o mesmo tampão, enquanto **PII** e **PIII** foram eluídos por gradiente salino de NaCl (0,1,

0,5 e 1,0 M, respectivamente), tal como indicado pelas setas. As frações (2 mL) foram coletadas a uma taxa de fluxo de 0,5 mL / min e monitoradas espectrofotometricamente a 280 nm. **B-** Ensaio de hemaglutinação usando eritrócitos de coelho 2% v/v das frações protéicas eluídas da coluna DEAE Sepharose: **PI** são as proteínas que não interagiram com a coluna; **PII** presença da AHE nas frações protéicas que interagiram com a resina e eluídas com 0,1 M de NaCl e atividade hemolítica nas frações do **PIII** do extrato de *Swartzia laevis* que foram separados por cromatografia de troca aniônica. As amostras foram aplicadas em diluição seriada.

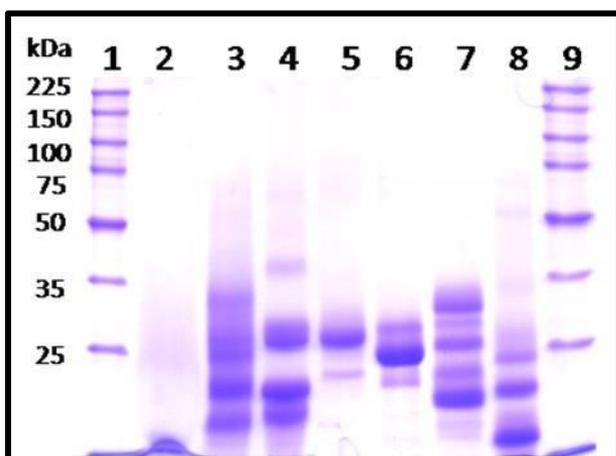
As atividades de hemaglutinação e hemolíticas permaneceram após as frações cromatográficas terem sido dialisadas e liofilizadas, como descrito anteriormente. Entretanto, a AHE foi perdida após aquecimento durante 30 minutos a 100 °C, indicando a presença da lectina. O perfil protéico dos **PI**, **PII** e **PIII** obtidos da cromatografia de troca aniônica (**Figura 7**) foi analisado por eletroforese em SDS-PAGE (**Figura 8**).



**Figura 8:** Eletroforese em SDS-PAGE 12,5% p/v, em condições redutoras, das frações protéicas do extrato de *Swartzia laevis*. As proteínas foram visualizadas por meio da coloração do gel com Coomassie Brilliant Blue R-250. **1 e 6:** Marcador de Massa Molecular (PROMEGA). **2-** Extrato protéico total de *Swartzia laevis*; **3-** DEAE-**PI** (- AHE); **4-** DEAE-**PII** (+ AHE); **5-** DEAE-**PIII** (hemólise).

A fração DEAE- **PII** que apresenta AHE (**Figura 7B**) mostrou uma quantidade pequena de bandas, enquanto DEAE-**PIII** conteve maior quantidade de bandas protéicas e reteve a atividade hemolítica (**Figura 7B**).

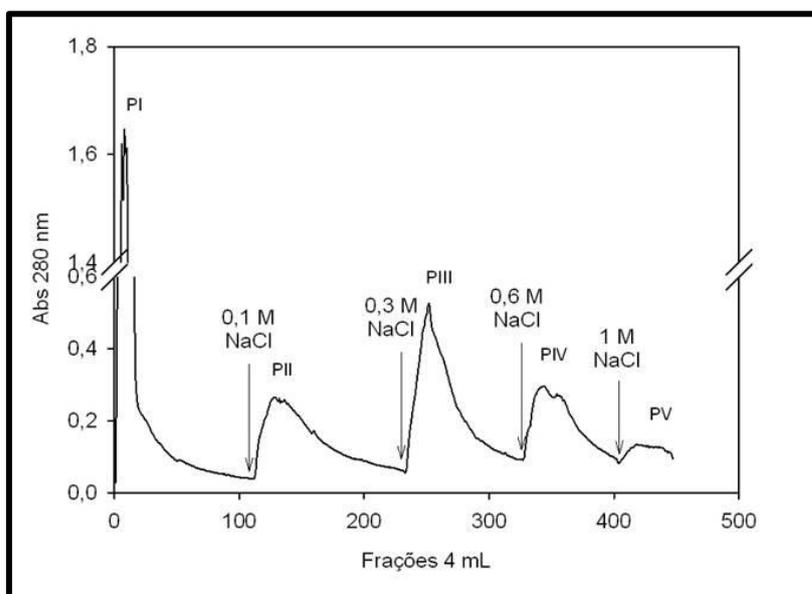
Como podem ser observadas na **Tabela 4**, sete espécies do gênero *Swartzia* foram investigadas quanto à presença da atividade de lectinas: *Swartzia argentea*, *Swartzia ingifolia*, *Swartzia laevicarpa*, *Swartzia longistipitata*, *Swartzia pendula*, *Swartzia polyphylla* e *Swartzia sericea*. Todos esses extratos exibiram forte atividade hemolítica, mesmo após o aquecimento da amostra durante 30 minutos a 100 °C. Entretanto, a detecção da atividade da lectina no extrato da espécie *Swartzia laevicarpa* após a separação cromatográfica, sugeriu que lectinas poderiam estar presentes nos demais extratos de *Swartzia*. Desta forma, os extratos protéicos das sete espécies de *Swartzia* foram comparados por eletroforese em SDS-PAGE (**Figura 9**). Surpreendentemente, os vários extratos de *Swartzia* exibiram perfis protéicos bem diferentes e, assim a comparação direta de seus conteúdos protéicos ficou descontinuada.



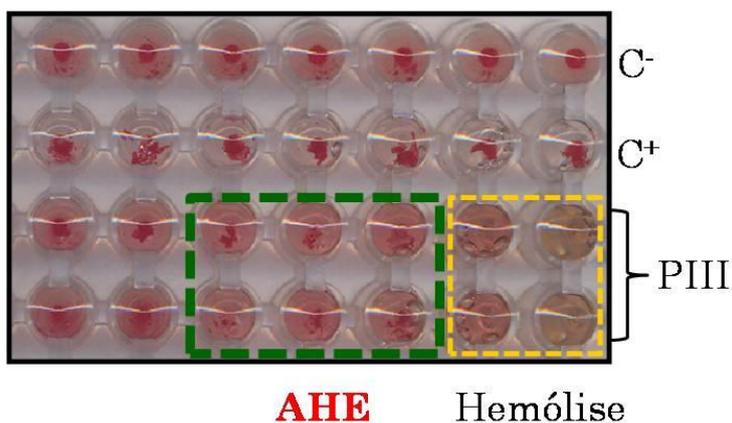
**Figura 9:** Eletroforese em SDS-PAGE 12,5% p/v, em condições redutoras, dos extratos protéicos das espécies do gênero *Swartzia*. **1 e 9:** Marcador de Massa Molecular (PROMEGA). **2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8** são os perfis protéicos dos extratos totais de *Swartzia*: *S. argentea*; *S. ingifolia*; *S. laevicarpa*; *S. longistipitata*; *S. pendula*; *S. polyphylla*; *S. sericea*, respectivamente. As proteínas foram visualizadas por meio da coloração do gel com Coomassie Brilliant Blue R-250.

Em decorrência, um protocolo semelhante utilizado para o fracionamento do extrato de *Swartzia laevicarpa* foi aplicado para os outros seis extratos protéicos de *Swartzia*, a fim de fracioná-los por cromatografia de troca iônica. O padrão de fracionamento dos extratos protéicos para as seis espécies foi muito diferente entre eles, mas a atividade hemolítica ainda foi observada para as frações cromatográficas obtidas.

E ainda, não se observou a AHE nas frações protéicas de *S. argentea*, *S. pendula*, *S. polyphylla* e *S. sericea*. Por outro lado, as frações protéicas de *S. ingifolia* e *S. longistipitata* exibiram AHE, os seus extratos foram fracionados em cinco (**Figura 10**) e dois picos (**Figura 11**), respectivamente.



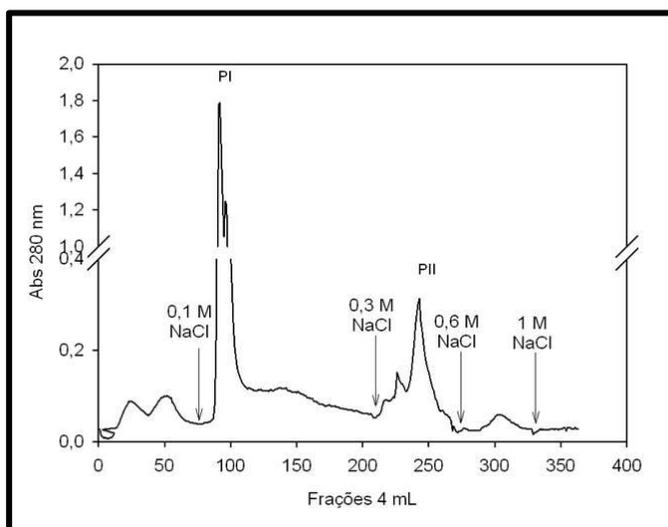
A



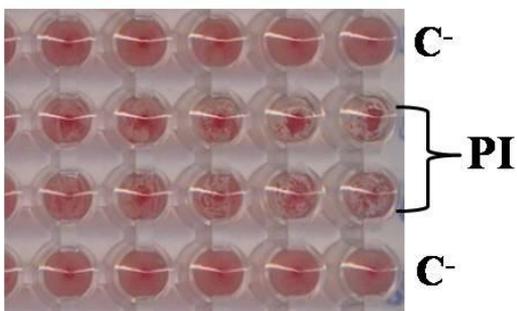
B

**Figura 10:** Cromatograma de troca aniônica do extrato de *Swartzia ingifolia* em uma coluna de DEAE Sepharose Fast Flow e determinação da AHE do **PIII** – 0,3 M NaCl. **A-** Para a análise, 20 mL (2,5 mg / mL) da amostra foram aplicados a uma coluna de DEAE (20 mL) pré-equilibrada com 50 mM de Tris-HCl, pH 8,0. O pico não retido (**PI**) foi eluído com o mesmo tampão; enquanto **PII**, **PIII**, **PIV** e **PV** foram eluídos por gradiente salino de NaCl (0,1, 0,3, 0,6 e 1,0 M), tal como indicado pelas setas. As

frações (4 mL) foram coletadas a uma taxa de fluxo de 0,5 mL / min e monitoradas espectrofotometricamente a 280 nm. **B-** Hemaglutinação do **PIII** 0,3 M NaCl do extrato de *Swartzia ingifolia* foi separado por cromatografia de troca iônica e determinada usando eritrócitos de coelho 2% v/v. **C<sup>-</sup>** - controle negativo (ausência de amostra); **C<sup>+</sup>** - controle positivo extrato protéico de *Parkia Platycephala* (reconhecidamente aglutinar eritrócitos de coelho 2% v/v). As amostras foram aplicadas em diluição seriada.



**A**



**B**

**Figura 11:** Cromatograma de troca aniônica do extrato de *Swartzia longistipitata* em uma coluna de DEAE Sepharose Fast Flow e determinação da AHE do **PI** 0,1 M NaCl. **A-** Para a análise, 20 mL (2,5 mg / mL) da amostra foi aplicado a uma coluna de DEAE (20 mL) pré-equilibrada com 50 mM de Tris-HCl, pH 8,0. O pico não retido foi eluído com o mesmo tampão; enquanto **PI** e **PII** foram eluídos com NaCl 0,1 e 0,3 M, respectivamente, como indicado pelas setas. As frações (4 mL) foram coletadas a uma taxa de fluxo de 0,5 mL / min e monitoradas espectrofotometricamente a 280 nm. **B-**

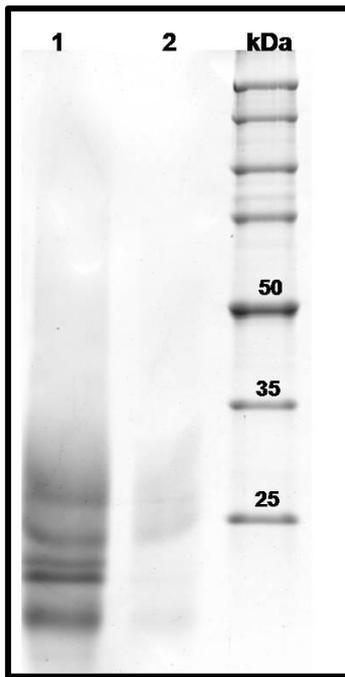
Hemaglutinação do **PI** 0,1 M NaCl do extrato de *Swartzia longistipitata*, usando eritrócitos de coelho 2% v/v. **C** - controle negativo (ausência de amostra). As amostras foram aplicadas em diluição seriada.

Entre os cinco picos protéicos do extrato de *Swartzia ingifolia* obtidos de DEAE Sepharose Fast Flow (**Figura 10**), a AHE foi observada somente para as frações eluídas com NaCl 0,3 M (**PIII**) e para o extrato de *Swartzia longistipitata*, dos dois picos obtidos (**Figura 11**) somente houve presença da AHE para as frações eluídas com NaCl 0,1 M (**PI**).

A fim de se identificar a afinidade da provável lectina presente nas frações obtidas de DEAE Sepharose Fast Flow dos extratos protéicos de *Swartzia ingifolia* e de *Swartzia longistipitata*, fez-se o ensaio de inibição da AHE com açúcares simples e ambos os picos **PIII** 0,3 M NaCl de *Swartzia ingifolia* e **PI** 0,1 M NaCl *Swartzia longistipitata* apresentaram forte inibição da AHE por D-galactose (< 0,01 M) e  $\alpha$ -lactose (< 0,01 M).

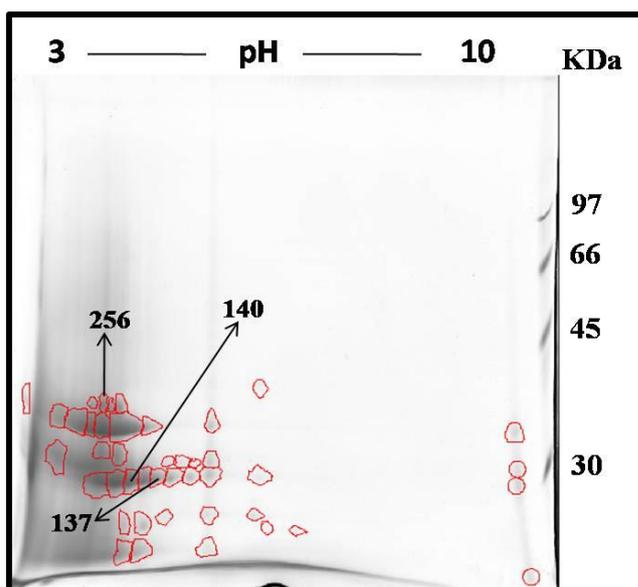
Com base no resultado de inibição da AHE das frações cromatográficas obtidas de DEAE Sepharose Fast Flow, o extrato de *Swartzia ingifolia* foi aplicado em uma coluna de afinidade  $\alpha$  – Lactose – Agarose (20 mL) e em uma coluna de N – Acetil – D – Galactosamina (15 mL). Porém, nenhuma fração protéica do extrato interagiu com essas duas resinas de afinidade. Em seguida, somente o **PIII** 0,3 M NaCl de *Swartzia ingifolia* foi aplicado na coluna de  $\alpha$  – Lactose – Agarose (5 mL) e, da mesma forma não houve fração protéica retida.

A fração **PIII** 0,3 M NaCl de *Swartzia ingifolia* obtida de DEAE Sepharose Fast Flow foi submetida à análise em eletroforese por SDS-PAGE (**Figura 12**), a fim de observar o perfil protéico daquelas frações que exibiram AHE (**Figura 10 - B**). Não foi visualizado, claramente, um padrão de bandas específico nessa fração protéica (**Figura 12 – 2**). Mesmo assim, **PIII** 0,3 M NaCl de *Swartzia ingifolia* foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida bidimensional, a fim de identificar isoladamente as proteínas presentes nessa fração protéica.



**Figura 12:** Eletroforese em SDS-PAGE 12,5% p/v, em condições redutoras, do extrato de *Swartzia ingifolia* e das frações protéicas de **PIII** 0,3 M NaCl. As proteínas foram visualizadas por meio da coloração do gel com Coomassie Brilliant Blue R-250. **1-** Extrato protéico de *Swartzia ingifolia* (10 µg); **2-** **PIII** 0,3 M NaCl (+ AHE) de *Swartzia ingifolia* em DEAE Sepharose Fast Flow.

Do procedimento em gel de poliacrilamida em duas dimensões das frações **PIII** 0,3 M NaCl de *Swartzia ingifolia* (**Figura 13**), um número igual a 42 pontos protéicos foram selecionados para se fazer a digestão das proteínas com tripsina para em seguida, obter e analisar por espectrometria de massas as seqüências de aminoácidos dos peptídeos obtidos. Desse total de pontos analisados somente três pontos identificados como **137**, **140** e **256** apresentaram identidade de seqüência de alguns peptídeos com lectinas de espécies da família Fabaceae.



**Figura 13:** Eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% p/v bidimensional das frações do **PIII** 0,3 M NaCl de *Swartzia ingifolia*. As proteínas foram visualizadas por meio da coloração com 0,1% p/v de Coomassie Brilliant Blue R-250. 30 µg de amostra foi aplicada na fita para ser focalizada. Os pontos protéicos nos quais os peptídeos foram seqüenciados e analisados e que apresentaram homologia com lectinas de espécies da família Fabaceae são indicados.

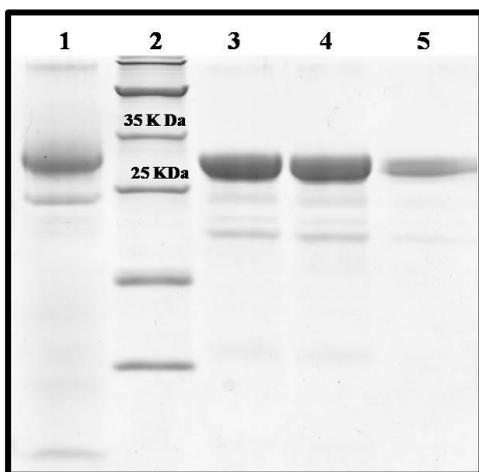
As seqüências dos peptídeos dos pontos **137**, **140** e **256** que exibiram identidade de seqüência com lectinas de espécies da família Fabaceae estão indicadas na **Tabela 5**. O resultado de identidade de seqüência dos peptídeos das frações protéicas de *Swartzia ingifolia* com seqüências de aminoácidos de lectinas de espécie do gênero *Sophora*, já era esperado, uma vez que a tribo Sophoreae é taxonomicamente a mais próxima da tribo Swartzieae.

**Tabela 5:** Peptídeos identificados no banco de dados Mascot<sup>®</sup> do gel 2D nos pontos protéicos das frações do **PIII** 0,3 M NaCl de *Swartzia ingifolia*, seqüenciados por espectrometria de massas (ESI-QTOF).

Ponto protéico	Nome da Proteína	NCBI	pI calculado	Mascot Score	Seqüência do peptídeo
137 <sup>a</sup>	Lectina de <i>Sophora flavescens</i>	gi 9837276	5,16	36	LPEWVR
137 <sup>b</sup>	Lectina de <i>Sophora alopecuroides</i>	gi 67518031	6,43	36	LPEWVR
140	Lectina de <i>Sophora japonica</i>	gi 35522892	5,39	49	TVLPEWVR
256	Lectina de <i>Sophora flavescens</i>	gi 9837276	5,16	37	LPEWVR

<sup>a, b</sup> representam dois peptídeos identificados a partir do ponto protéico 137.

O extrato de *Swartzia longistipitata* também foi utilizado em duas cromatografias de afinidades: uma coluna com a resina  $\alpha$  – Lactose – Agarose (20 mL) e uma coluna de N – Acetil – D – Galactosamina (15 mL), todavia não se obteve nenhuma fração protéica retida nessas resinas. Como o **PI** 0,1 M NaCl de *Swartzia longistipitata* (**Figura 11**) apresentou AHE, o seu perfil protéico foi analisado (**Figura 14**).

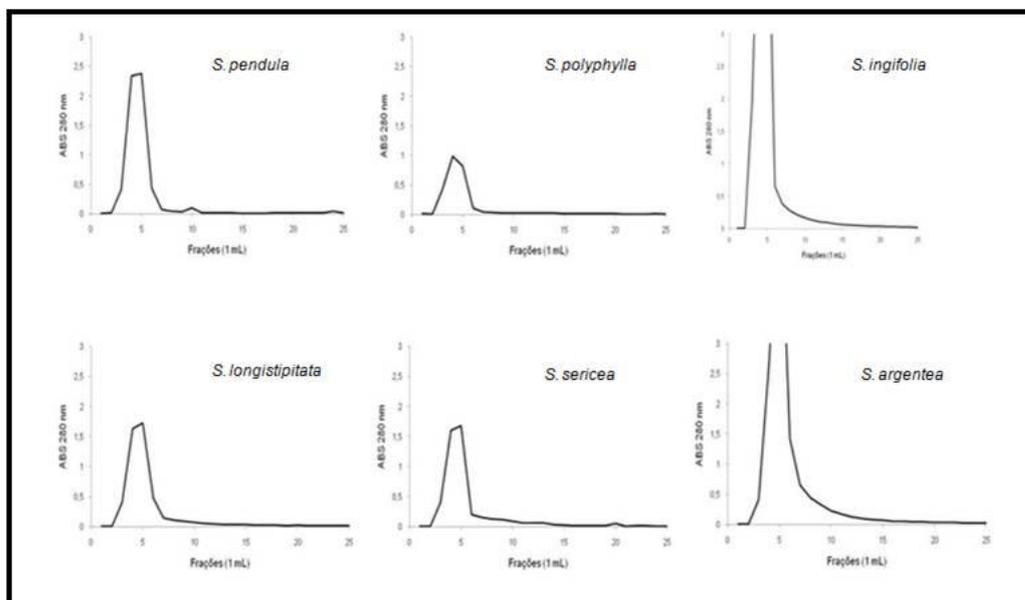


**Figura 14:** Eletroforese em SDS-PAGE 12,5% p/v, em condições redutoras, das frações protéicas do extrato de *Swartzia longistipitata*. As proteínas foram visualizadas por meio da coloração do gel com Coomassie Brilliant Blue R-250. **1-** Extrato protéico de *Swartzia longistipitata* (10  $\mu$ g); **2-** Marcador de Massa Molecular (PROMEGA); **3 e 4-** **PI** 0,1 M NaCl (+ AHE) e **5-** **PII** 0,3 M NaCl (- AHE) de *Swartzia longistipitata* em DEAE Sepharose Fast Flow.

O extrato de *Swartzia longistipitata* possui um perfil protéico relativamente simples e como foi evidenciada a AHE nesse extrato, será necessário utilizar protocolos de cromatografias diferentes daqueles utilizados neste estudo, a fim de isolar a provável lectina presente neste extrato.

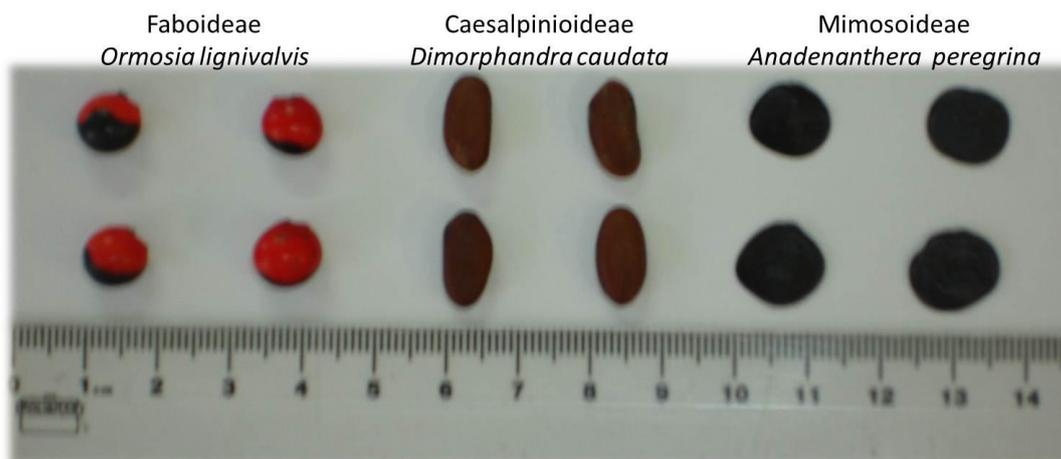
No intuito de tentar separar as saponinas dos extratos protéicos das espécies do gênero *Swartzia*, para em seguida verificar a presença de lectinas nas frações cromatográficas obtidas, os extratos de *Swartzia pendula*, *Swartzia polyphylla*, *Swartzia ingifolia*, *Swartzia longistipitata*, *Swartzia sericea*, *Swartzia argentea*, foram aplicados

na coluna DEAE Sepharose relação 4,5 mg / mL em Tris-HCl 50 mM pH 8,0, em uma coluna de poliestireno contendo uma resina (8,3 mL) de exclusão molecular de “PD-10 Desalting” (GE) (**Figura 15**). Para cada pico eluído de cada espécie, foram selecionadas as frações com as maiores absorvâncias para se verificar a presença da AHE ou a ausência da atividade hemolítica. Para as espécies *Swartzia pendula* e *Swartzia polyphylla* foi claramente visualizada a hemólise em todos os poços, com eritrócitos de coelho e de rato 2% v/v; por outro lado para *Swartzia ingifolia*, *Swartzia longistipitata* houve ausência da hemólise e presença da AHE para os dois tipos de eritrócitos e, para *Swartzia sericea* e *Swartzia argentea* houve a remoção das moléculas causadoras da hemólise, porém não foi visualizada AHE.



**Figura 15:** Cromatogramas de exclusão molecular em “PD-10 Desalting” dos extratos protéicos de seis espécies pertencentes ao gênero *Swartzia*. Para a análise, 2 mL (4,5 mg / mL) da amostra foi aplicado em uma coluna de “PD-10 Desalting” (8,3 mL) pré-equilibrada com 50 mM de Tris-HCl, pH 8,0 e as frações protéicas (1,0 mL) eluídas no mesmo tampão. A eluição foi monitorada espectrofotometricamente a 280 nm.

Os extratos protéicos das sementes (**Figura 16**) das espécies *Dimorphandra caudata*, *Anadenanthera peregrina*, *Ormosia lignivalvis* que exibiram AHE foram homogeneizados com carboidratos (D-glicose e D-galactose), que são comumente usados para se investigar a especificidade primária das lectinas.



**Figura 16:** Sementes das espécies de Fabaceae nativas da Amazônia: *Ormosia lignivalvis*, *Dimorphandra caudata* e *Anadenanthera peregrina*.

Como mostrado na **Tabela 6**, a AHE de todos os extratos foi inibida na presença de  $\alpha$ -lactose. O açúcar D-galactose inibiu a AHE dos extratos de *Anadenanthera peregrina* e *Ormosia lignivalvis*, mas não inibiu a atividade da *Dimorphandra caudata*. Os açúcares D-glicose e D-manose não inibiram a hemaglutinação de nenhum desses extratos. Esses resultados sugerem que todas as novas lectinas evidenciadas neste estudo, pertencem ao grupo Gal/GalNac.

**Tabela 6:** Inibição da AHE dos extratos protéicos das sementes de Fabaceae da Amazônia.

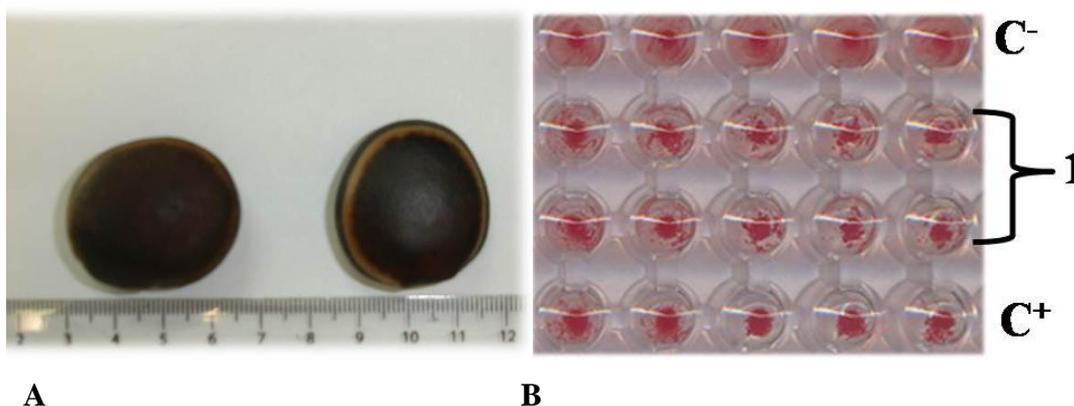
Espécies	Carboidratos			
	Glicose	Manose	Galactose	Lactose
<sup>(2)</sup> <i>Dimorphandra caudata</i>	-	-	-	+
<sup>(1)</sup> <i>Anadenanthera peregrina</i>	-	-	+	+
<sup>(1)</sup> <i>Ormosia lignivalvis</i>	-	-	+	+

Nota: AHE na presença de uma suspensão a 2% v/v de eritrócito de (1) rato branco ou (2) coelho. Inibição da AHE: (+) e Não Inibição (-).

Os extratos protéicos das sementes de *Dimorphandra caudata*, *Anadenanthera peregrina* e *Ormosia lignivalvis* foram utilizados em duas cromatografias de afinidades: uma coluna com a resina  $\alpha$  – Lactose – Agarose (20 mL) e uma coluna de

N – Acetil – D – Galactosamina (15 mL), todavia não se obteve nenhuma fração protéica retida nessas resinas para nenhum dos três extratos nas condições testadas. Condições cromatográficas ou protocolos de extração protéica diferentes daqueles utilizados neste trabalho deverão ser experienciados, a fim de isolar e purificar a(s) lectina(s) presente(s) naqueles extratos.

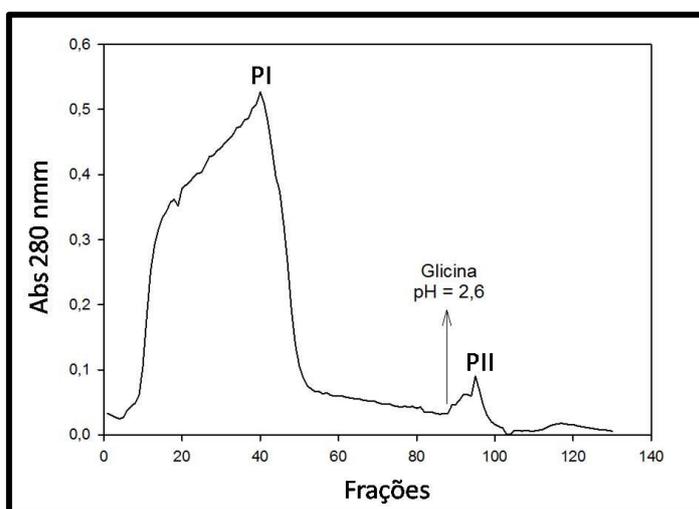
Com poucas exceções, o gênero *Dioclea* é conhecido por ser uma fonte de lectinas com especificidade de ligação aos açúcares D-glicose e D-manose. Neste estudo. O extrato protéico das sementes (**Figura 17A**) de *Dioclea bicolor* exibiu AHE somente com eritrócitos de coelho (**Figura 17B**), como mencionado anteriormente e, surpreendentemente a atividade hemaglutinante do extrato protéico de *Dioclea bicolor* foi inibida por D-galactose (< 10 mM) e  $\alpha$ -lactose (< 10 mM).



**Figura 17:** **A-** Sementes da espécie de Fabaceae nativa da Amazônia: *Dioclea bicolor*. **B-** Hemaglutinação do extrato protéico de *Dioclea bicolor* usando eritrócitos de coelho 2% v/v: **1.** Controle negativo (ausência de amostra: AHE - suspensão de eritrócitos + NaCl 0,15 M): **C<sup>-</sup>**. Controle positivo (+ AHE - suspensão de eritrócitos + NaCl 0,15 M + extrato protéico total na concentração 5 mg / mL da semente de *Parkia platycephala*): **C<sup>+</sup>**. As amostras foram aplicadas em diluição seriada.

Como houve forte inibição da AHE do extrato protéico de *Dioclea bicolor* na presença de  $\alpha$ -lactose (<10 mM), esse extrato foi aplicado em coluna cromatográfica contendo a resina de afinidade  $\alpha$  – Lactose – Agarose (20 mL), a fim de isolar a lectina presente no extrato. Como mostrado na **Figura 18**, após a eluição das proteínas não retidas pela resina (**PI**), uma pequena fração protéica (**PII**) que interagiu com a resina foi eluída por condições de mudança do pH. A fração protéica retida (**PII**) exibiu AHE e

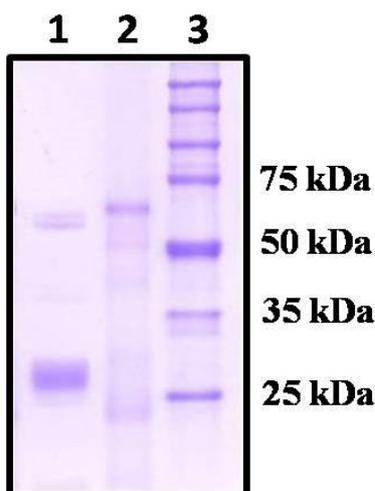
essa atividade foi inibida por D-galactose e  $\alpha$ -lactose; contudo, as proteínas que foram eluídas no **PI** não exibiram essas propriedades.



**Figura 18:** Cromatograma de afinidade do extrato protéico das sementes de *Dioclea bicolor* em uma coluna  $\alpha$  – Lactose – Agarose. Para a análise, 80 mL (2,5 mg / mL) da amostra foi aplicado a uma coluna (20 mL) pré-equilibrada com 0,1 M Tris-HCl, pH 7,6, mais 0,15 M de NaCl e 5 mM CaCl<sub>2</sub> e MnCl<sub>2</sub>. O pico I (**PI**) foi eluído com o mesmo tampão, enquanto **PII** (+AHE) foi eluído após a adição de 0,1 M glicina pH 2,6 adicionado de NaCl 0,15 M; como indicado pela seta. As frações (2 mL para **PI** e 4 mL para **PII**) foram recolhidas a uma taxa de fluxo de 20 mL / h e, monitoradas espectrofotometricamente a 280 nm.

A fração de proteína retida (**PII**) foi analisada por SDS-PAGE (**Figura 19**) e foi visualizada uma banda protéica principal em torno de 28 kDa e duas outras bandas correspondendo a aproximadamente 65 e 60 kDa, um perfil protéico comum observado para outras lectinas da subtribo Diocleinae. Essas proteínas ocorrem nas sementes e resultam do processamento de um precursor glicosilado complexo durante a maturação da semente, como relatado para a ConA (Bowles *et al.*, 1986). A subunidade principal da ConA compreende 237 resíduos de aminoácidos e duas outras subunidades,  $\beta$  e  $\gamma$ , são fragmentos naturais da subunidade  $\alpha$ , as quais ocorrem na estrutura quaternária dessas lectinas (Richardson *et al.*, 1984; Ainouz *et al.*, 1987). As lectinas da subtribo Diocleinae, isoladas até então, possuem um padrão eletroforético característico, formado por três bandas: uma subunidade  $\alpha$  com massa molecular (MM) entre 29 e 30 kDa, uma subunidade  $\beta$  com MM entre 16 e 18 kDa e uma subunidade  $\gamma$  com MM entre

12 e 13 kDa. Esse mesmo padrão é visualizado para todas as lectinas de *Canavalia* (Cavada *et al.*, 1996), indicando que o evento pós-traducional de “splicing” de proteínas é o único acontecimento que tem sido descrito para as lectinas de *Dioclea* e *Canavalia*, uma vez que lectinas de leguminosas têm sido isoladas de várias espécies de tribos e subtribos e não se verifica esse padrão eletroforético tão repetitivo formado por três bandas (Grangeiro *et al.*, 1997).



**Figura 19:** Eletroforese em SDS-PAGE 12,5% p/v, em condições redutoras, do extrato protéico da espécie *Dioclea bicolor*. **1-** Proteína retida em  $\alpha$  – Lactose – Agarose (**PII**), **2-** Extrato protéico total de *Dioclea bicolor* (10  $\mu$ g) e **3-** Marcador de Massa Molecular (PROMEGA). As proteínas foram visualizadas por meio da coloração do gel com Coomassie Brilliant Blue R-250.

A quantidade de proteína retida (**PII**) é, relativamente, muito pouca (**Figura 18**) e assim, as análises para a caracterização da lectina do extrato protéico das sementes de *Dioclea bicolor* com especificidade D-galactose e  $\alpha$ -lactose, purificada em cromatografia de afinidade  $\alpha$  – Lactose – Agarose, ficaram muito restritas. Apesar disso, a identidade dessa proteína foi revelada por meio do seqüenciamento automático de peptídeos da lectina, os quais analisados e combinados geraram uma seqüência de 42 aminoácidos (SILPEWVRVGFSAATSGLSRVNSAEILSFSFPKHIGIDVNSVK) e assim, foi possível determinar a identidade da lectina da semente de *Dioclea bicolor* (DBL) (**Tabela 7**).

**Tabela 7:** Análise comparativa da seqüência de aminoácidos do peptídeo interno da lectina da semente de *Dioclea bicolor* com as lectinas da semente de *Vatairea macrocarpa*, da casca de *Styphnolobium japonicum*, da semente de *Phaseolus leptostachyus*, da semente *Phaseolus acutifolius*, da semente de *Styphnolobium japonicum*, da semente de *Phaseolus vulgaris*. Os aminoácidos sublinhados estão presentes, na mesma posição, nas seis seqüências comparadas.

Identificação	Organismo	Seqüência	% Identidade	E- value
Semente	<i>Dioclea bicolor</i>	<u>S</u> ILPEWVRV <u>G</u> FS <u>A</u> TSGLSRVNSAEILSFSFPKHIGIDVNSVK	-	-
Semente	<i>Vatairea macrocarpa</i>	SALPEWVRV <u>G</u> FSATSGLSRDHVETHDVLDSWF	68%	2e <sup>-08</sup>
Casca	<i>Styphnolobium japonicum</i>	SILPEWVRV <u>G</u> FTATTGLTTQYVETNDVLSWSF	62%	7e <sup>-08</sup>
Semente	<i>Phaseolus leptostachyus</i>	<u>S</u> VLPEWVSIGFSATSGLSKGFVEIHDVLSWSF	62%	1e <sup>-06</sup>
Semente	<i>Phaseolus acutifolius</i>	<u>S</u> VLPEWVRV <u>G</u> FSATSGITKGNVETNDLLSWSF	62%	5e <sup>-08</sup>
Semente	<i>Styphnolobium japonicum</i>	SILPEWVRV <u>G</u> FTAATGLTTQYVETHDVLSWSF	59%	8e <sup>-07</sup>
Semente	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<u>S</u> VLPEWVS <u>V</u> GFSATTGITKGNVETNDVLSWSF	56%	1e <sup>-05</sup>

As lectinas da subtribo Diocleinae são conhecidamente serem específicas aos açúcares glicose e manose, são estruturalmente e físico - quimicamente bastante relacionadas, entretanto a DBL apresentou clara inibição por galactose e lactose, especificidade comum às lectinas da tribo Phaseoleae, por exemplo, as lectinas de *Arachis hypogaea* (Gal) e de *Dolichos biflorus* (GalNAc). Ademais, a comparação da seqüência de aminoácidos do peptídeo interno da DBL resultou identidade com três lectinas de espécies da tribo Phaseoleae e nem uma identidade com espécies da subtribo Diocleinae.

O extrato protéico das sementes de *Dioclea bicolor* obtido de acordo com o procedimento descrito no item 2.2 é extremamente difícil de solubilizar em soluções aquosas. Desta forma, o rendimento em qualquer etapa de purificação é muito baixo, além de inviabilizar o uso de resinas cromatográficas de afinidade ou outros tipos de

cromatografia. Desta forma, o prosseguimento aos protocolos de purificação da DBL em quantidades suficientes para sua caracterização, deverá passar por uma etapa de obtenção de um extrato protéico de melhor qualidade, portanto mais solúvel.

#### 4- CONCLUSÕES

O “*screening*” em extratos protéicos de sementes de cinquenta espécies de plantas da Amazônia para a detecção de novas lectinas permitiu a identificação da presença de sete novas lectinas nas espécies *Dimorphandra caudata*, *Anadenanthera peregrina*, *Dioclea bicolor*, *Ormosia lignivalvis* e em três espécies do gênero *Swartzia*: *Swartzia laevicarpa*, *Swartzia ingifolia* e *Swartzia longistipitata*. Muitas das espécies investigadas já haviam, provavelmente, sido avaliadas em estudos prévios e com resultados negativos. A maior dificuldade de prospectar lectinas em extratos protéicos está muitas vezes associada à presença da atividade hemolítica nesses extratos, o que impede a observação da aglutinação de hemácias, parâmetro primário para avaliar a possível presença de lectinas em amostras protéicas. Vários extratos investigados apresentaram atividade hemolítica. A associação das técnicas de cromatografia de troca iônica e da eletroforese para avaliar as amostras, permitiu, em alguns casos separar as frações hemolíticas das frações aglutinantes. O resultado do “*screening*” foi positivo no contexto em que foram identificadas lectinas em gêneros nos quais não há descrição de lectinas (*Dimorphandra*, *Anadenanthera* e *Ormosia*) e também onde havia relato apenas de atividade hemolítica (*Swartzia*). As novas lectinas detectadas em extratos protéicos de sementes de *Swartzia laevicarpa* e *Dioclea bicolor*, obtidas a partir de testes de hemaglutinação, procedimentos cromatográficos e análises de seqüências de aminoácidos foram inicialmente tomadas como modelo de estudos bioquímicos e de atividade. As demais lectinas serão alvos de protocolos de purificação para posteriores estudos similares. Os resultados obtidos neste “*screening*” permitem concluir que este trabalho, com sucesso, relata a ocorrência de lectinas em grupos primitivos de Fabaceae e fornece novas perspectivas sobre a detecção e a purificação de lectinas destas subfamílias, assim como, podendo ser útil para aumentar o entendimento da filogenia dos táxons das espécies da família Fabaceae.

## **ANEXO I**

### **ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA CIENTÍFICA:**

#### **Seeds of Amazonian Fabaceae as a source of new lectins**

Andreia V. Fernandes<sup>1</sup>, Márcio V. Ramos<sup>2</sup>, José Francisco C. Gonçalves<sup>1</sup>,  
Paulo A. C. Maranhão<sup>1</sup>, Larissa R. Chevreuril<sup>1</sup> and Luiz Augusto G. Souza<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Plant Physiology and Biochemistry, National Institute for Research and Innovation in the Amazon (MCTI-INPA), Manaus, Amazonas, Brazil

<sup>2</sup>Federal University of Ceará, Biochemistry and Molecular Biology Department, Fortaleza, Ceará, Brazil

**Brazilian Journal of Plant Physiology** Volume 23 Issue 3 pp. 237-244, **2011**.

**Brazilian Journal of Plant Physiology**

Print version ISSN 1677-0420

## CAPITULO II

### “PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA LECTINA DA SEMENTE DE *SWARTZIA LAEVICARPA*”

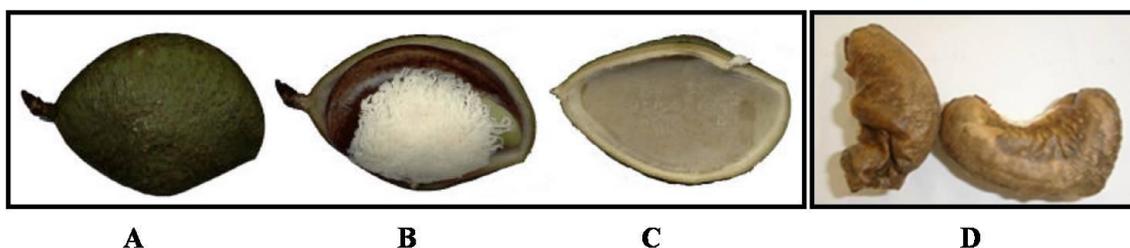
#### 1-INTRODUÇÃO

Na família Fabaceae são inúmeras as espécies que despertam interesse econômico, pois muitas delas são ricas em óleos (copaíba) *Copaifera multijuga* L., resinas (jatobá) *Hymenaea coubaril* L., corantes (cumaru) *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd., gomas naturais (bico de arara) *Parkia discolor* Benth, *P. pendula* (Willd.) Benth. ex Willd., (faveira-benguê) *P. nitida* Miq. e cola, laca e verniz de *H. coubaril*. O tanino obtido de (acácia-negra) *Acacia mearnsii* D. Wild. e (faveira camuzé) *Stryphnodendron guianensis* (Aubl.) Benth. e de outras espécies vem sendo pesquisado com o intuito de se aplicar nas formulações de adesivos para a manufatura de chapas e painéis de madeira (INPA, 1998) e como preservante de madeira (VITAL *et al.*, 2001) e de produtos medicinais. Os indivíduos dessa família possuem hábitos de crescimento muito variados sendo encontrados como árvores de grande porte, árvores médias e pequenas, arvoretas, lianas, ervas de crescimento indeterminado, ervas de ciclo anual, ocorrendo em vários ecossistemas (Sprent, 2000). Dentre esses, incluem-se as várzeas, os igapós da Amazônia e os ambientes xerofíticos.

*Swartzia* é um gênero tropical, representado por cerca de 160 espécies, a maioria das quais se encontra na América Central e do Sul. As espécies de *Swartzia* são todas árvores. O gênero, também possui espécies com aplicabilidade farmacológica e na etnomedicina, tendo em vista que das folhas, das sementes e dos frutos, foram isolados vários constituintes bioativos, os quais vêm sendo usados no controle de várias doenças tropicais (Sardas *et al.*, 1986; Marston *et al.*, 1993, Dubois *et al.*, 1995; Hostettmann e Wolfender, 1997), tratamento cardiovascular, (Jiménez *et al.*, 1995), como analgésico (Sanchez *et al.*, 1999), dentre outros tratamentos terapêuticos.

*Swartzia laevicarpa* Amshoff é uma espécie que apresenta nódulos radiculares (subfamília / tribo: Faboideae / Swartzieae), popularmente conhecida como saboarana ou saboarana branca e é um das espécies mais frequentes do gênero. Cresce na Amazônia as margens do Rio Negro, é considerada economicamente importante pelo valor de sua madeira (Silva e Souza, 2002). A madeira de *Swartzia laevicarpa* Amshoff

é largamente explorada economicamente nas proximidades de Manaus, principalmente na construção de embarcações (Moreira *et al.*, 1995). Morfologicamente a árvore é de porte mediano a grande, 6,0 a 30,0 m de altura, tronco com 1,5 a 2,0 m de diâmetro, casca fina e persistente, resina vermelha abundante na entrecasca, folhas com lâminas arredondadas a obtusas e subobtusas, parte inferior glabra ou tenuamente estrigulosa, parte superior glabra, flores nitidamente ascendentes, brácteas decíduas e persistentes, frutos lenhosos, glabros, indeiscentes, brilhantes, ovais a ovalados, tenuamente estrigulosos externamente, lateralmente achatados com 5,5 a 8,0 cm de comprimento, 3,5 a 5,0 cm de largura (**Figura 20 A-C**), (Cowan, 1967; Loureiro e Rodriques, 1975). É amplamente distribuída no Estado do Amazonas, Brasil, menos freqüente no Suriname e na Guiana, Venezuela e Colômbia. Ocorre amplamente em terra baixa, nas matas de igapó, de rios e de igarapés de água preta, usualmente em solos arenosos e menos freqüente em solo argiloso, não inundado ou raramente inundado (Loureiro e Rodriques, 1975). A madeira é muito bonita, com cerne escuro a castanho avermelhado-pardacento com veias, é fácil de trabalhar, podendo-se obter bom acabamento, com polimento é muito atrativa. É altamente explorada para a fabricação de embarcação, marcenaria de luxo e em construções (Loureiro e Rodriques, 1975). A espécie *Swartzia laevis* apresenta simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio (Moreira *et al.*, 1995). Pterocarpanos isolados do cerne da espécie apresentam atividade antimicrobiana (Braz Filho *et al.*, 1980; Nagy *et al.*, 1984).



**Figura 20:** **A-** Fruto inteiro de *Swartzia laevis*; **B-** Semente com arilo branco e bastante grande, cobrindo a semente; **C-** Pericarpo e casca do fruto (Retirado de Jesus, 2003); **D-** Semente madura de *Swartzia laevis* (Foto **D**: Paulo Abraão Cavalcante Maranhão).

O gênero *Swartzia* é caracterizado pela presença de isoflavonóides, saponinas triterpênicas e diterpenos aromáticos (Abdel-Kader *et al.*, 2000; Magalhães *et al.*, 2006).

Os glicosídeos de esteróides ou de terpenos policíclicos (saponinas isoladas inicialmente da *Saponaria officinalis* L.) são moléculas anfipáticas, constituintes do metabolismo secundário vegetal e estão relacionadas com o sistema de defesa. Nas plantas, ocorrem em diferentes partes tais como: raiz, tubérculo, casca, folhas, sementes, e frutos (Wina *et al.*, 2005). Em geral, sua presença é caracterizada pela formação de espuma em meio aquoso e agem como detergentes e surfactantes (Schenkel *et al.*, 2007). As saponinas estão presentes em pelo menos 400 espécies de plantas pertencentes a 60 famílias diferentes e em alguns animais (Wina *et al.*, 2005). A hemólise sanguínea é um teste realizado “*in vitro*” para se determinar a presença de saponinas em uma amostra; o glicosídeo se combina com as moléculas de colesterol presentes nas membranas dos eritrócitos, perturbando o equilíbrio interno-externo e promovendo a ruptura da célula com conseqüente liberação da hemoglobina (Cunha e Roque, 2005).

Com relação à identificação e ao isolamento de lectinas de espécies do gênero *Swartzia*, há na literatura somente um breve relato sobre o indicativo da presença de lectina do extrato protéico das sementes de *Swartzia pickelii* (Cavalcanti e Coelho, 1990), o qual descreveu a atividade hemaglutinante daquele extrato com eritrócitos, tratados com glutaraldeído, de diferentes animais (boi, cão, ovelha, porco, cavalo, galinha, pato e humano A, B e O). Porém, no ensaio de inibição da atividade, a fim de se determinar a especificidade primária da provável lectina, não houve inibição com nenhum dos carboidratos testados.

Considerando que a primeira evidência da presença de lectinas em extratos protéicos se faz por meio do ensaio de hemaglutinação, a presença das saponinas no extrato protéico das sementes de *Swartzia laevicarpa* representa um contaminante poderoso para impedir a confirmação visual desse primeiro indicativo. Como descrito anteriormente, a presença de lectinas em sementes do gênero *Swartzia* foi revista neste trabalho. Os resultados da cromatografia de troca aniônica (DEAE-Sephrose) do extrato da *Swartzia laevicarpa* foram fundamentais para a visualização da presença de lectina nas amostras protéicas, pois em geral, extratos de *Swartzia* exibiram forte atividade hemolítica, impedindo, no primeiro momento, a medida da atividade da lectina (Fernandes *et al.*, 2011).

A lectina assim detectada nas sementes de *Swartzia laevicarpa* foi então alvo de purificação. Desta forma, neste capítulo, é descrito o primeiro relato de purificação e

caracterização bioquímica de uma lectina do gênero *Swartzia*. A proteína purificada foi ainda avaliada quanto a sua possível ação sobre fungos fitopatogênicos.

## 2-MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1- Material Botânico

As sementes (**Figura 20 D**) inteiras e maduras de *Swartzia laevicarpa* foram coletadas no mês de março do ano de 2011 na Estação Experimental de Fruticultura Tropical do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), situada a 41 Km da rodovia BR 174 de Manaus-AM a Boa Vista-RR (2°37'S e 60°02'W). As sementes foram fotografadas e armazenadas a 4 °C até serem usadas nas análises.

### 2.2- Extração Protéica

As sementes foram trituradas em moinho analítico de facas (IKA-WERKE – M20 – Univeral) até obtenção de uma massa finamente pulverizada. O extrato protéico das sementes foi obtido por meio de uma mistura 10% p/v da semente triturada com tampão Tris HCl 0,1 M pH 7,6 com NaCl 0,15 M. Essa suspensão foi mantida sob leve agitação, a temperatura de 25 °C, durante 2 horas e em seguida centrifugada a 11.000 x g durante 20 minutos a 10 °C. O sobrenadante foi dialisado contra água destilada durante 72 horas a 4 °C e, liofilizado até a obtenção de uma massa totalmente seca. Essa amostra obtida ao final desse procedimento foi nomeada extrato total e, a partir dela a lectina foi purificada.

### 2.3- Purificação da lectina

A lectina da semente de *Swartzia laevicarpa* (SLL) foi purificada do extrato total após cromatografia de afinidade em uma coluna  $\alpha$  - Lactose Agarose (Sigma Chemical Co., São Paulo, Brasil). A eluição da proteína foi monitorada por meio da leitura da absorbância no comprimento de onda igual a 280 nm (Espectrofotômetro UV / Visível Ultrospec 2100 pro, Armesham Biosciences). O extrato total (10 mg / mL) foi aplicado na coluna, lavada previamente com o tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,6 contendo NaCl 0,15 M, CaCl<sub>2</sub> 0,005 M e MnCl<sub>2</sub> 0,005 M. As proteínas não ligadas à resina foram recuperadas no mesmo tampão e a lectina, retida pela resina foi eluída da coluna após a aplicação do tampão glicina 0,1 M pH 2,6 contendo NaCl 0,15 M. As amostras (80 mL) foram eluídas da coluna (30 x 2 cm e 25 mL de resina) a um fluxo de 20 mL / hora e as

frações de 2 mL para as proteínas não retidas e 4 mL para as frações das proteínas retidas foram coletadas.

#### **2.4- Eletroforese em SDS-PAGE:**

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada, para estimar a massa molecular e o ponto isoelétrico (pI) da lectina. A análise em uma dimensão foi realizada de acordo com o método de Laemmli (1970). A análise em duas dimensões (2D), permitiu fazer a focalização isoelétrica da lectina utilizando Immobiline Dry Strips (11 cm, pH 3-10) (GE Healthcare). Um método similar ao protocolo de Laemmli (1970) para a análise na segunda dimensão foi utilizado. As fitas Immobiline DryStrips (11 cm), pH 3 a 10 (GE-Healthcare), foram reidratadas por 14 horas em urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 1%, tampão IpG 2% pH 3 a 10, azul de bromofenol contendo 30 µg de SLL. A focalização isoelétrica da proteína foi desenvolvida em um equipamento Ettan- IPGPhor II- sistema da GE Healthcare, as condições elétricas foram como descritas pelo fabricante. Após o desenvolvimento da primeira dimensão, as fitas de pH IpG foram incubadas a 25 °C em 3 mL do tampão de equilíbrio (50 mM Tris HCl pH 8,8, 30% glicerol, 6 M uréia, 2% SDS e traços de azul de bromofenol) durante 30 minutos. A segunda dimensão em SDS-PAGE foi realizada em um sistema vertical com gel de separação uniforme 12,5% (14 x 14 cm) a 8 °C. Os pontos de proteína na eletroforese em duas dimensões foram visualizados após tratamento com 0,1% de solução de Coomassie Brilliant Blue R-250. O gel foi escaneado usando o programa Imager Scanner (Amersham Biosciences) e as ferramentas do programa LabScan. Todos os detalhes do gel individual e as análises comparativas do gel foram realizadas por meio do uso do programa Image- Master 2D Platinum Software 6.0 (Amersham Biosciences).

#### **2.5- Detecção de carboidratos ligados covalentemente a SLL**

A presença de carboidratos ligados covalentemente a SLL foi examinada por 1-D-SDS-PAGE e pelo uso do reagente de Schiff (Sigma S5133). Após a eletroforese, o gel foi incubado com 200 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10% v/v durante 30 minutos e lavado seis vezes com água destilada. Em seguida, o gel foi incubado com 200 mL de ácido periódico 1% v/v em ácido acético 3% v/v durante 60 minutos. Posteriormente, o gel foi lavado novamente com água destilada e 200 mL do reagente de Schiff foram adicionados. O gel permaneceu no escuro durante 50 minutos, após esse

período o gel foi lavado com ácido acético 5% v/v e a presença de glicoproteína foram observadas (Freitas *et al.*, 2011). A lectina não glicosilada da semente de *Canavalia ensiformis* (ConA) e a proteína glicosilada Ribonuclease B (SIGMA) foram usadas como controles negativo e positivo, respectivamente.

### **2.5.1- Detecção do teor de carboidratos da SLL**

A detecção de carboidratos foi também realizada por meio do método fenol-ácido sulfúrico usando glicose como padrão (Masuko *et al.*, 2005). A mistura de reação é composta de 50 µL da SLL 2 µg / mL em água, 200 µL de ácido sulfúrico 85% v/v e 30 µL de fenol 5% v/v. Após incubar a amostra a 90 °C durante 5 minutos em banho de água estático, o desenvolvimento da cor foi medido por turbidimetria a 492 nm, usando um leitor automatizado de microplaca (Biotrak II Plate Reader, Amersham Biosciences).

### **2.6- Estudos de hemaglutinação, termo-estabilidade e inibição da atividade da SLL**

A atividade hemaglutinante (AHE) da SLL e a inibição da atividade da lectina foram avaliadas conforme descrito nos itens 2.3 e 2.4 do Capítulo I. Eritrócitos de coelho foram utilizados para todas as determinações. Para analisar a termo-estabilidade da SLL, uma solução da lectina 1 mg / mL em Tris-HCl 0,1 M pH 7,6 contendo NaCl 0,15 M, CaCl<sub>2</sub> 0,005 M e MnCl<sub>2</sub> 0,005 M foi aquecida a 100 °C durante diferentes intervalos de tempo, antes de ser avaliada a AHE. Para avaliar a especificidade de ligação a carboidratos da SLL, os açúcares D-glicose, D-manose, D-galactose, α-lactose, N-acetil-D-glicosamina e N-acetil-D-galactosamina (Sigma) foram utilizados. Os dados são expressos como a concentração mínima de carboidrato necessária para inibir quatro unidades hamaglutinantes (Ramos *et al.*, 2002) pela média de dois experimentos independentes.

### **2.7- Espectrometria de Massas**

O espectro de massas da SLL nativa foi obtido utilizando o espectrômetro Synapt HDMS (Waters, Manchester, UK) acoplado ao sistema NanoUPLC-ESI. As amostras foram diluídas em água contendo 0,1% v/v de ácido fórmico a uma concentração final de 2 mg / mL. Em seguida, uma alíquota de 5 µL da amostra foi usada para realizar a cromatografia de fase reversa usando um gradiente de 5 a 80% v/v de acetonitrila em ácido fórmico 0,1% v/v a um fluxo de 600 nL / min usando uma

coluna nanoACQUITY UPLC C18 BEH com dimensões 17 mm, 100 mm × 10 cm. A SLL nativa foi eluída a aproximadamente 55% v/v de acetonitrila e o espectro de massas foi processado usando uma técnica de entropia máxima (MaxEnt) para se conseguir o espectro deconvoluído.

Para a análise das massas dos peptídeos fragmentados da SLL, a amostra foi quimicamente reduzida com 10 mM de dithiothreitol (DTT), alquilada com 10 mM iodoacetamida e enzimaticamente digerida com tripsina 1 : 100 w/w. A digitalização dos dados independentes (MSE) foi realizada e automaticamente planejada para alternar entre o padrão MS (3 eV) e elevadas energias de colisão MSE (12-55 eV) aplicada à colisão dissociação induzida com gás argônio. A célula de colisão de transferência foi ajustada para 1 eV, usando um tempo de varredura de 1,5 s com um tempo de vôo (TOF-OA) MSE a partir de m / z 50-3000.

## **2.8- Seqüenciamento da região N-terminal da SLL**

A seqüência de aminoácidos única da região N-terminal da SLL foi determinada pelo método da degradação de Edman em um seqüenciador automático de peptídeos (Shimadzu, modelo PPSQ-23A) e, as similaridades de seqüência foram analisadas utilizando o programa BLAST.

## **2.9- Ensaio antifúngico**

A atividade antifúngica da SLL foi ensaiada contra os fungos *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Colletotrichum gloriosporioides*, *Neurospora sp.* Os fungos foram obtidos da coleção local do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará e foram mantidos no meio Ágar Dextrose Sabouraud (0,5% de hidrolisado enzimático de caseína, 0,5% de hidrolisado enzimático de tecido animal, 4% dextrose e 1,5% ágar com pH final igual a 5,6) a 27 °C, com um ciclo de 12 horas luz / escuro e 70% de umidade relativa. Todos os ensaios foram realizados em condições similares e as soluções da SLL foram preparadas imediatamente antes do uso e foram filtradas em um filtro com membrana 0,22 µm (Millipore). As suspensões dos esporos homogêneos foram obtidas de 2 a 3 semanas de cultura em água destilada estéril. Os conídios foram quantificados em uma câmara de Neubauer com o auxílio de uma lente BX 60 Olympus Light Microscope. As soluções de esporos foram ajustadas para ter uma diluição apropriada

de  $2 \times 10^5$  células / mL em água. O efeito da SLL (1 mg / mL) na germinação dos esporos e no crescimento micelial dos fungos foi examinado.

### **2.9.1- Ensaio de inibição da germinação dos esporos**

O efeito da SLL na germinação dos esporos foi avaliado pela mistura de 10  $\mu$ L de uma suspensão de esporos ( $2 \times 10^5$  células / mL em água) com 10  $\mu$ L (1 mg / mL) da SLL preparada em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6,0. As placas foram tampadas para evitar evaporação e foram mantidas a 27 °C durante 24 horas em um ciclo luz/escuro e 70% de umidade relativa. Após 24 horas, a germinação dos esporos foi observada por meio de uma lente BX 60 Olympus Light Microscope e os esporos foram considerados germinados se uma estrutura de hifa estivesse presente. Cada experimento foi realizado duas vezes, consistindo em duas replicatas por tratamento.

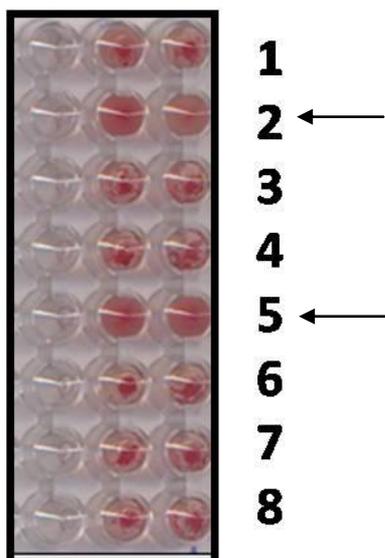
### **2.9.2- Ensaio de inibição do crescimento vegetativo**

Os ensaios foram desenvolvidos em placas de microtitulação de polietileno de fundo chato (estéreis) com 96 poços. Cada poço conteve 10  $\mu$ L da suspensão de esporos ( $2 \times 10^5$  células / mL em água) e 90  $\mu$ L da mistura de caldo de levedura Peptone Dextrose (5% p/v). Após 16 horas, na ausência de luz e a 27 °C, 100  $\mu$ L da SLL em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0 em diferentes concentrações (diluições 1:1 a 1:128), foram adicionados na placa. Os controles negativo e positivo para a inibição do crescimento foram o tampão acetato de sódio 50 mM pH = 5,0 e o peróxido de hidrogênio 200 mM, respectivamente. O crescimento dos fungos foi monitorado durante 48 horas, com intervalos de 12 horas, pela medida das mudanças na turbidimetria a 620 nm usando um leitor automático de microplaca (Biotrak II Plate Reader, Amersham Biosciences).

As concentrações protéicas capazes de reduzir em 50 % o crescimento fúngico do controle (tampão acetato de sódio 50 mM pH = 5,0), após 48 horas de ensaio, foram representados como IC<sub>50</sub>. Os valores foram representados em micrograma de proteína por mililitro, a partir de três ensaios realizados independentemente.

### 3-RESULTADOS E DISCUSSÃO

O extrato total de *Swartzia laevicarpa* exibiu forte atividade hemolítica, desta forma, nenhuma atividade para lectina foi inicialmente observada. Como apresentado na **Figura 7**, o **PII** da DEA-Sepharose exibiu hemaglutinação e, essa atividade da lectina foi inibida por 25 mM de D-galactose ou de  $\alpha$ -lactose (**Figura 21**).

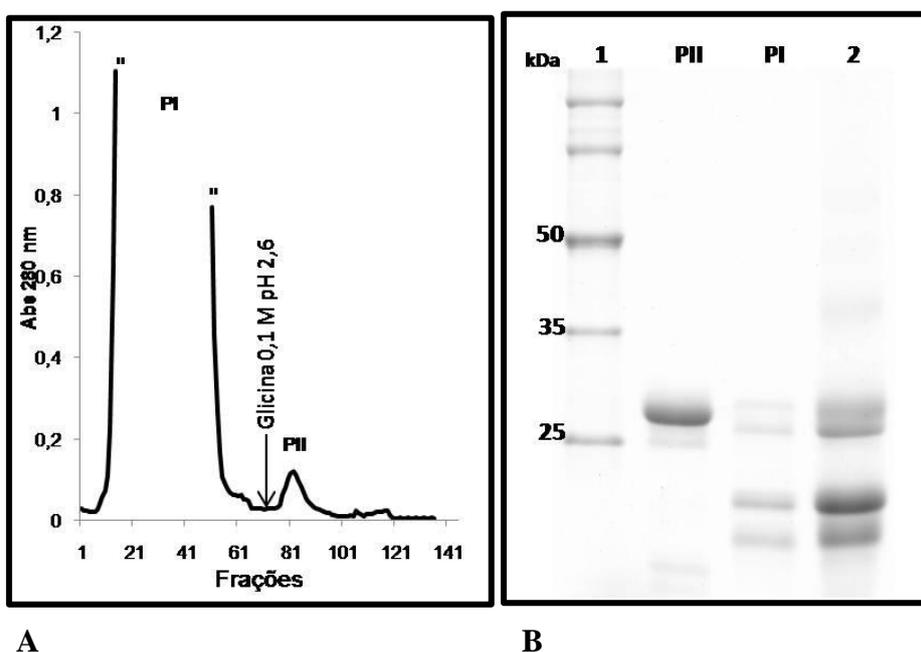


**Figura 21:** Inibição da AHE das frações reunidas do **PII**, do extrato de *Swartzia laevicarpa*, obtido de DEAE Sepharose como apresentado na **Figura 7**. Açúcares testados: D - arabinose (1),  $\alpha$  - lactose (2), D - frutose (3), D - manose (4), D - galactose (5), D - glicose (6), D - maltose (7) e N - acetil - D- glicosamina (8). As setas indicam os números correspondentes aos açúcares que inibiram a AHE das frações do **PII**.

Assim, a lectina purificada pertence ao grupo D-galactose / N-acetil-D-galactosamina, no que se refere à especificidade por monossacarídeos. A inibição por  $\alpha$ -lactose é igualmente comum em lectinas deste grupo.

Em função do resultado de inibição obtido e apresentado na **Figura 21**, o extrato protéico total da semente de *Swartzia laevicarpa* foi aplicado em uma coluna contendo a resina de afinidade  $\alpha$ -Lactose – Agarose e, uma pequena fração correspondendo a menos de 1% da área total do cromatograma é representada por proteína retida naquela coluna (**Figura 22 A**). A hemaglutinação das frações protéicas retidas na coluna (**PII**  $\alpha$ -Lactose – Agarose) foi visualizada, com título hemaglutinante igual a  $2^6$  e, essa

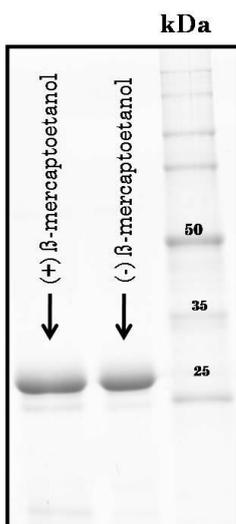
atividade foi inibida por D-galactose e  $\alpha$ -lactose. Por outro lado, as proteínas não retidas (**PI**  $\alpha$ - Lactose – Agarose) não exibiram essas mesmas propriedades. A eletroforese em SDS-PAGE (**Figura 22 B**) revelou que as frações de **PII** apresentam uma banda protéica única com uma massa molecular aparente de 26 kDa. A partir daí, essa fração protéica (**PII**), proveniente da cromatografia de afinidade  $\alpha$ - Lactose – Agarose passou a ser denominada SLL (lectina de *Swartzia laevicarpa*). Aproximadamente 10 mg da SLL foi obtida a partir de 10 g da semente triturada.



**Figura 22:** Cromatografia de afinidade do extrato protéico de *Swartzia laevicarpa* em uma coluna de  $\alpha$  - Lactose – Agarose e determinação da massa molecular relativa do **PII**. **A-** Para a análise, 20 mL (10 mg / mL) da amostra foi aplicado a uma coluna (25 mL) pré-equilibrada com 0,1 M Tris-HCl, pH 7,6, mais 0,15 M de NaCl e 5 mM CaCl<sub>2</sub> e de MnCl<sub>2</sub>. O pico I (**PI**) foi eluído com o mesmo tampão, enquanto **PII** foi eluído após a adição de 0,1 M de glicina pH 2,6, como indicado pela seta. As frações (2 mL para **PI** e 4 mL de **PII**) foram recolhidas a um fluxo de 20 mL / h, e monitoradas espectrofotometricamente a 280 nm. **B-** Eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% p/v em condições desnaturantes das proteínas retidas (**PII**), das proteínas não retidas (**PI**) e do extrato protéico das sementes de *Swartzia laevicarpa* (**2**) e marcador de massa molecular PROMEGA (**1**). As proteínas foram visualizadas por meio da coloração do gel com Coomassie Brilliant Blue R-250.

A SLL aglutinou eritrócitos de coelho a 2% v/v a uma concentração mínima de 7,8 µg / mL (128 UA). Os açúcares D-manose, D-glicose e N-acetil-D-glicosamina não inibiram a atividade hemaglutinante da lectina, mesmo quando testados a concentração de 100 mM. Nas doses indicadas, galactose (12,5 mM),  $\alpha$ -lactose (1,56 mM) e N-acetil-D-galactosamina (0,19 mM) inibiram mais fortemente a atividade hemaglutinante da SLL. Embora N-acetil-D-galactosamina tenha inibido mais fortemente a atividade da SLL comprado ao açúcar a  $\alpha$ -lactose, essa lectina foi classificada como lectina que liga a lactose, pois ela interagiu com  $\alpha$ -lactose imobilizada, mas não com N-acetil-D-galactosamina imobilizada. As lectinas de plantas são classificadas em função de suas afinidades por açúcares, de forma geral entre as lectinas de leguminosas há um padrão de afinidade primária observado, ou seja, lectinas isoladas de espécies de uma mesma tribo possuem afinidades de ligação aos mesmos grupos de carboidratos. Por exemplo, as lectinas isoladas das sementes das espécies da tribo Parkieae (*Parkia platycephala*, *Parkia discolor* e *Parkia pendula*); Vicieae (*Pisum sativum* e *Vicia faba*); Diocleinae (*Canavalia ensiformis*, *Canavalia brasiliensis*, *Dioclea grandiflora* e *Dioclea virgata* são todas ligantes a Glc/Man. Porém, lectinas das tribos Sophoreae (*Shophora japonica* e *Luetzelburgia auriculata*), Bauhinieae (*Griffonia simplicifolia* e *Bauhinia purpurea*), Glycineae (*Glycine Max*) são todas ligantes a GalNAc. Contudo, há lectinas isoladas a partir de espécies pertencentes da mesma tribo e que apresentam afinidades por diferentes açúcares, como as lectinas isoladas das espécies *Crotalaria striata* (GalNAc) e *Ulex europaeus I* (L-Fucose) tribo Genisteae; a lectina de *Medicago sativa* (Gal) e a de *Medicago truncatula* (Glc/Man) tribo Trifolieae. A SLL ligante a GalNAc da Swartzieae, a primeira lectina isolada dessa tribo, possui afinidade de ligação com as lectinas das tribos Sophoreae e a Dalbergieae.

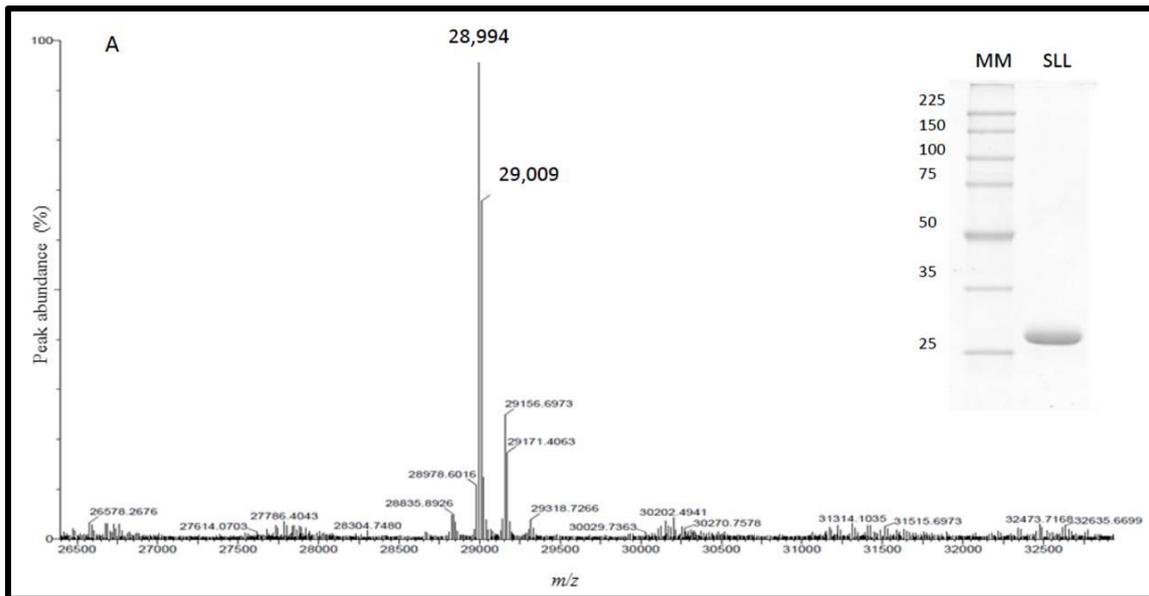
A fim de caracterizar aspectos estruturais da SLL, foi feita uma eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) em condições redutoras (com  $\beta$ -mercaptoetanol) e em condições não redutoras (ausência de  $\beta$ -mercaptoetanol). O resultado (**Figura 23**) sugeriu que a SLL é uma proteína com apenas uma cadeia polipeptídica. O grau de oligomerização da proteína não foi, entretanto, estabelecido devido à limitação de material disponível.



**Figura 23:** Eletroforese em SDS-PAGE 12,5% p/v da SLL em duas condições: REDUTORAS (na presença de  $\beta$ -mercaptoetanol) e NÃO REDUTORAS (na ausência de  $\beta$ -mercaptoetanol). As proteínas foram visualizadas por meio da coloração do gel com Coomassie Brilliant Blue R-250.

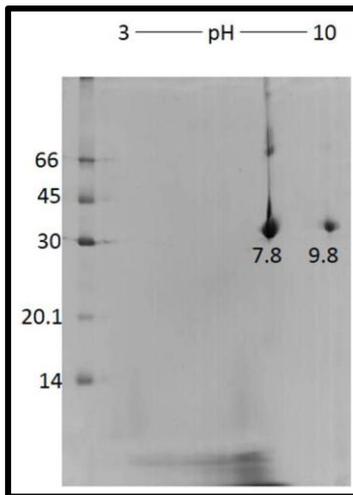
As lectinas das sementes de *Sophora japonica* (SJL), *Luetzelburgia auriculata* (LAL) espécies pertencentes à tribo Sophoreae e a lectina da *Vatairea macrocarpa* (VML) da tribo Dalbergieae, também são lectinas de cadeia única assim como a SLL. As tribos Sophoreae e Dalbergieae estão entre as tribos da subfamília Faboideae, mais próxima da tribo Swartzieae (**Tabela 8 B**).

Com o objetivo de determinar a massa molecular da SLL, a proteína foi analisada por meio de espectrometria de massas “*eletrospray*” MALDI-MS (**Figura 24**). O espectro obtido apresentou dois picos monoprotionados com massas moleculares iguais a 28,994 e 29,009 kDa. A discreta diferença de massas entre os dois picos deve ser resultado de micro-heterogeneidade na seqüência de aminoácidos ou de glicosilação.



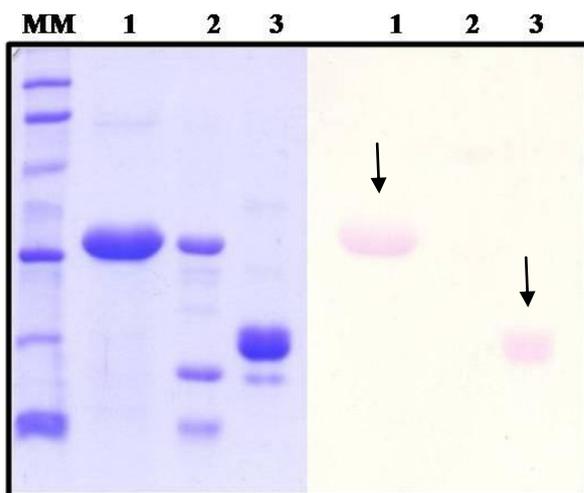
**Figura 24:** Espectro de massas “*eletrospray*” deconvolvido da SLL nativa. Inserido SDS-PAGE 12,5% p/v da SLL (10  $\mu$ g), MM marcador de massa molecular da PROMEGA (Broad Range Protein Molecular Weight Markers).

A focalização isoeétrica da SLL foi realizada e dois pontos de proteínas básicas (**Figura 25**) com pontos isoeétricos estimados em 7,8 e 9,8 foram detectados. Para esclarecer se os pontos protéicos obtidos no gel 2D eram a mesma proteína ou contaminantes, esses pontos foram também examinados por espectrometria MALDI-MS, após a digestão com tripsina seus peptídeos foram seqüenciados por espectrometria MS/MS. Os dois peptídeos diferentes de cada ponto protéico foram seqüenciados e, as suas seqüências foram comparadas com outras proteínas e ambas apresentaram similaridades com lectinas. As seqüências desses peptídeos confirmaram que era a mesma proteína. As diferenças existentes entre as proteínas poderão ser esclarecidas após o seqüenciamento completo de suas estruturas primárias.



**Figura 25:** Eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% p/v em duas dimensões da SLL. As proteínas foram visualizadas por meio da coloração com 0,1% p/v de Coomassie Brilliant Blue R-250. Amostra de 30 µg de proteína foi aplicada na fita para ser focalizada. Os pIs dos pontos protéicos foram estimados em 7,8 e 9,8, respectivamente.

A diferença de migração na eletrofocalização pode ser atribuída à microheterogeneidade na sequência ou ainda em glicoconjugados presentes na proteína. Por este motivo, foi posteriormente investigado se a lectina SLL seria uma glicoproteína. Para inferir sobre a presença de carboidratos ligados covalentemente na estrutura da SLL foi feita análise em SDS-PAGE e o gel foi corado com o reagente de Schiff. A SLL é uma glicoproteína, como revelado pela reação positiva com o reagente de Schiff (**Figura 26**). Desta forma, fez-se a quantificação dos carboidratos ligados a SLL; a qual revelou que aproximadamente 7,8% da massa da SLL é carboidrato. A natureza desse carboidrato poderá ser revelada por meio de análises posteriores.



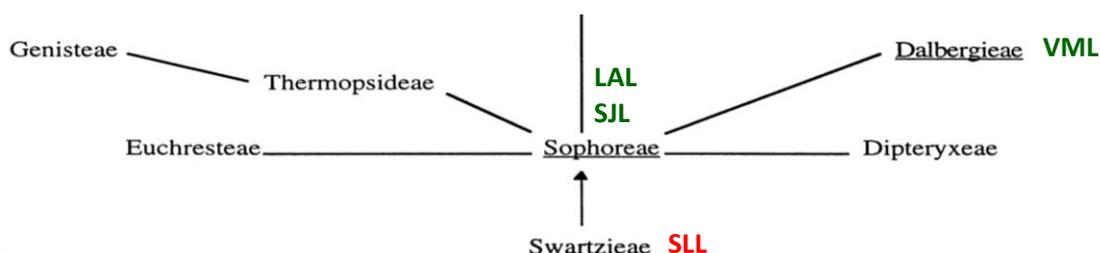
**Figura 26:** **Esquerda:** Eletroforese em SDS-PAGE 12,5% p/v em condições desnaturantes, as proteínas foram visualizadas por meio da coloração do gel com Coomassie Brilliant Blue R-250. **Direita:** Detecção de glicoproteínas em eletroforese revelada pelo reagente de Schiff. As amostras foram colocadas nos dois géis: SLL 50 $\mu$ g (**1**); lectina não glicosilada ConA 20 $\mu$ g (**2**); glicoproteína ribonuclease B 20 $\mu$ g (SIGMA) (**3**). As setas indicam as zonas de reação positivas, evidenciando a presença de carboidrato no gel revelado pelo reagente de Schiff.

Considerando a estimativa de que a SLL tem uma única cadeia polipeptídica com massa de 29.000 Da e o percentual de glicosilação foi estimado em 7,8%, isto significa que a porção glicana da molécula deveria corresponder a uma massa aproximada de 2.262 Da. Novamente, A SLL compartilha similaridades de estrutura com as lectinas LAL, VML e SJ1; as quais possuem carboidratos ligados covalentemente com 3,2%, 7,9% e 5,9% de glicosilação, respectivamente (**Tabela 8**).

**Tabela 8:** A SLL compartilha atividade de ligação, estrutura e Massa Molecular (MM) com as lectinas das sementes de *Luetzelburgia auriculata*, *Sophora japonica* e *Vatairea macrocarpa* (A). Relação filogenética entre algumas tribos da subfamília Faboideae (B).

A

Lectina da semente	Atividade de ligação	Estrutura	MM kDa	% Glicosilação
<i>Swartzia laevicarpa</i> (SLL)	N-acetil-D-galactosamina	CADEIA ÚNICA	29,0	7,8
<i>Luetzelburgia auriculata</i> (LAL)	N-acetil-D-galactosamina	CADEIA ÚNICA	29,0	3,2
<i>Sophora japonica</i> (SJ1)	N-acetil-D-galactosamina	CADEIA ÚNICA	29,5	5,9
<i>Vatairea macrocarpa</i> (VML)	D-galactose	CADEIA ÚNICA	28,0	7,9



B

Fonte: CALVETE, J.J.; SANTOS, C.F.; MANN, K.; GRANGEIRO, T. B.; NIMTZ, M.; URBANKE, C.; CAVADA, B.S. 1998. Amino acid sequence, glycan structure, and proteolytic processing of the lectin of *Vatairea macrocarpa* seeds. FEBS Letters, 1998, 425, 2, 286-292.

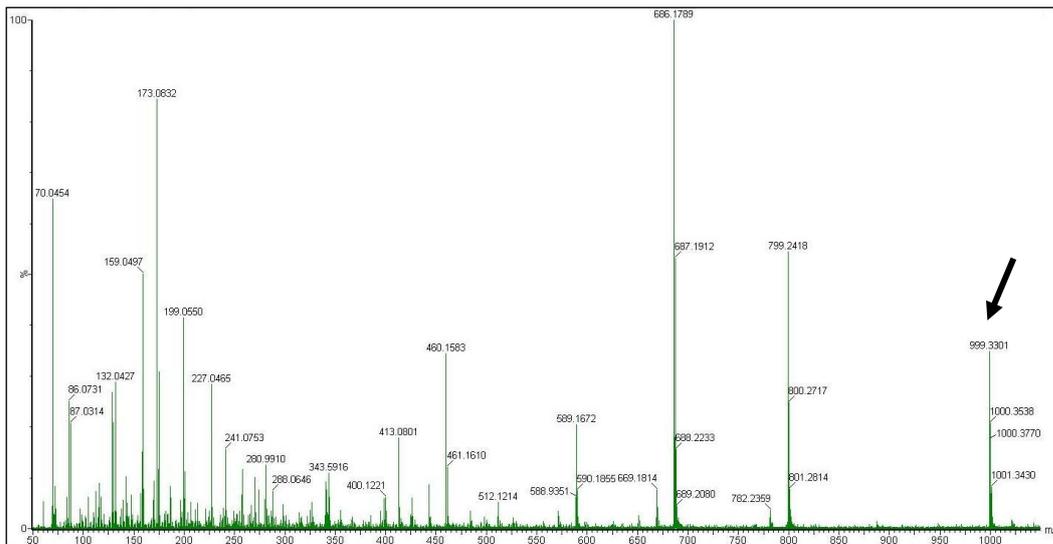
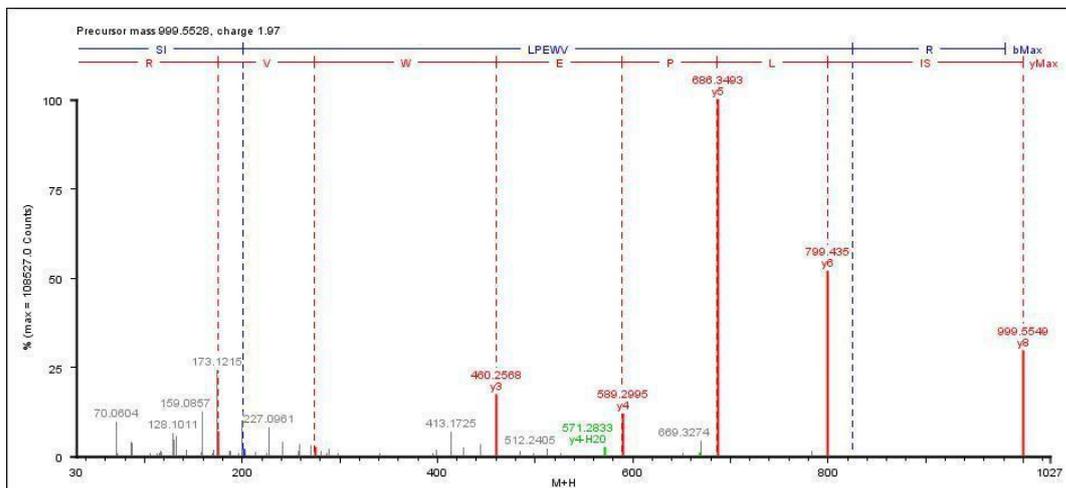
A seqüência de aminoácidos da região N-terminal da SLL foi determinada pela degradação automática de Edman, uma seqüência de aminoácidos única para os primeiros 39 aminoácidos da SLL foi encontrada (Tabela 9). Desta forma, a contaminação por outras moléculas foi descartada, considerando que este material apresentou como relatado anteriormente, uma única seqüência de aminoácidos na região N-terminal.

**Tabela 9:** Análise comparativa da seqüência de aminoácidos da região amino terminal (N-terminal) da lectina da semente de *Swartzia laevis* (SLL) com as lectinas da semente de *Sophora japonica* (SJ1), da casca de *Sophora japonica* (SJ2), da semente de *Vatairea macrocarpa* (VML), da semente de *Glycine Max* (GML) e da semente de *Luetzelburgia auriculata* (LAL).

Identification	Organism	Sequence alignment*	ID (NCBI)	% identity	E-value
Seed lectin	<i>Swartzia laevis</i> (SLL)	1ADIVSFTYTKFRPNQEDLLQGD <b>AEV</b> VSSGKLQLTAVDD39	-	-	-
Seed lectin	<i>Sophora japonica</i> (SJ1)	1AEILSFSFPKFAS <b>NQ</b> EDLLQGDALVSSKGELQLTTVEN39	gblAAB- 51441	25/39 (64%)	1e <sup>-05</sup>
Bark lectin	<i>Sophora japonica</i> (SJ2)	1AEILSFSFPKFVSNQEDLLQGDALVSS <b>EG</b> ELQLTTVEN39	gblAAB- 51458	25/39 (64%)	1e <sup>-05</sup>
Seed lectin	<i>Vatairea macrocarpa</i> (VML)	1SEVVFSF <b>TK</b> FNP <b>PK</b> DII <b>LQ</b> GDALVTSKGKLQLTKVKD39	p81371	24/39 (62%)	3e <sup>-06</sup>
Seed lectin	<i>Glycine max</i> (GML)	1AETV <b>SF</b> SW <b>NK</b> FVP <b>KQ</b> PN <b>MI</b> L <b>Q</b> GD <b>AI</b> V <b>TS</b> SGKLQLNKVDE39	gblAAA- 33983	23/39 (59%)	3e <sup>-05</sup>
Seed lectin	<i>Luetzelburgia auriculata</i> (LAL)	1SEVVFSF <b>TK</b> FNP <b>NQ</b> KDIII9	[16]	10/39 (25%)	

Obs.: Os aminoácidos em negrito são idênticos entre as respectivas lectinas das espécies comparadas.

A seqüência determinada é altamente consistente com as de outras lectinas de leguminosas e houve alinhamento mais próximo com a seqüência de aminoácidos da região N-terminal da lectina da semente e da casca de *Sophora japonica* (SJ1 e SJ2, respectivamente) e a lectina da semente de *Vatairea macrocarpa* (VML). Essa homologia da SLL com outras lectinas de leguminosas também foi confirmada por análise de espectrometria de massas (MS/MS) dos peptídeos da SLL obtidos por meio da digestão da proteína com tripsina (**Figura 27**).

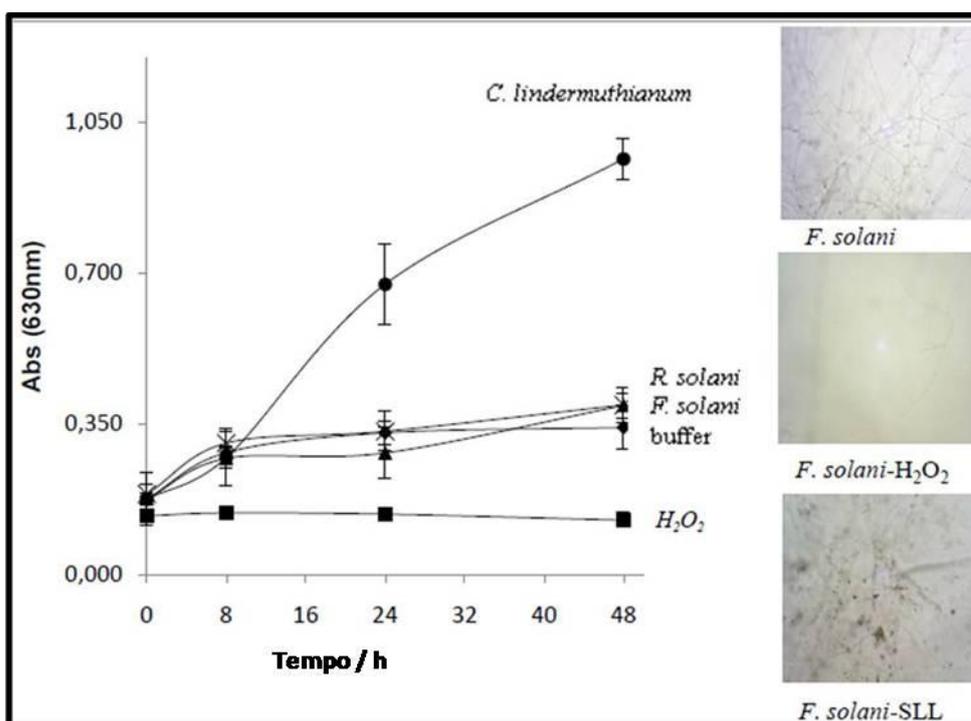
**A****B****C** – Peptídeos da SLL internos identificados:

**SLL:** VNSAEILSFSFPK (seqüência encontrada na lectina da casca e da semente de *Sophora japonica*).

**SLL:** SILPEWVR (seqüência encontrada na lectina da semente de *Sophora japonica*, e no fragmento da lectina relacionada *Cladrastis lutea*).

**Figura 27:** Espectros de massa (MS/MS) obtidos no espectrômetro Synapt HDMS para peptídeos internos da SLL. **A-** Espectro de massas dos peptídeos gerados pela digestão da SLL por tripsina. **B-** Espectro de massas e seqüência para o peptídeo observado na relação m/z 999,3301. **C-** Pesquisa de seqüência obtida pela ferramenta Mascot MS/MS Ion Search no banco de dados NCBI. A amostra foi misturada com 3,5-dimethoxy-4-hydroxicinamico (matriz) dissolvida em 0,1% v/v de ácido trifloroacético. Um total de nove peptídeos foi obtido exibindo superposição com aquele indicado em **C**.

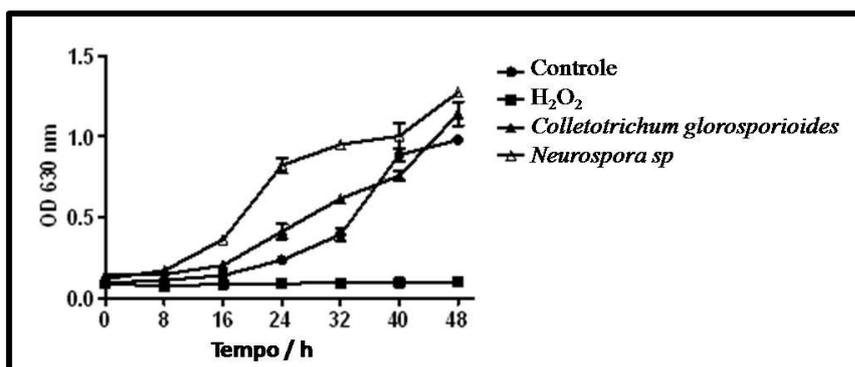
Um dos objetivos centrais desta pesquisa foi bioprospectar novas moléculas protéicas com atividade contra fitopatógenos de importância agrônômica. Assim, uma vez purificada e parcialmente caracterizada em seus aspectos bioquímicos, estruturais e de atividade lectínica, a SLL foi utilizada em bioensaios com fungos fitopatogênicos. Dois parâmetros foram avaliados: a inibição de germinação de esporos e a inibição do crescimento micelial. A SLL foi testada a uma concentração inicial de 1 mg / mL e não foi capaz de inibir a germinação dos esporos e nem retardou o crescimento dos fungos (*Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani* e *Colletotrichum lindemuthianum*) (**Figura 28**).



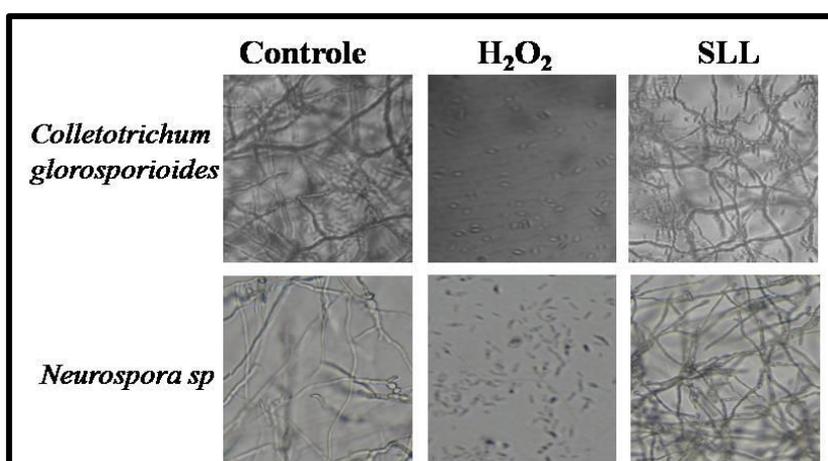
**Figura 28:** Tempo de curso do crescimento dos fungos: Os fungos *F. solani*, *R. solani* e *C. lindemuthianum* foram crescidos na presença da SLL (1 mg / mL) ou de peróxido de hidrogênio ou do tampão acetato de sódio pH 5,0 (*F. solani*) como controles. Imagens: germinação dos esporos de *F. solani*. Os ensaios foram realizados a 27 °C durante 48 horas e 70% de umidade. A germinação dos esporos foi observada através de uma lente de microscópio BX 60 Olympus.

Em um segundo momento, esses mesmos ensaios foram realizados com os fungos *Colletotrichum gloriosporoides* e *Neurospora sp.* E, novamente, a SLL (1 mg / mL) não foi capaz de retardar o crescimento dos fungos e nem de inibir a germinação dos esporos (**Figura 29**).

A



B



**Figura 29:** Tempo de curso do crescimento dos fungos: **A-** Os fungos *Colletotrichum glorosporioides* e *Neurospora sp* foram crescidos na presença da SLL (1 mg / mL) ou de peróxido de hidrogênio ou do tampão acetato de sódio pH 5,0, como controles. **B-** Imagens: germinação dos esporos de *Colletotrichum glorosporioides* e *Neurospora sp*. Os ensaios foram realizados a 27 °C durante 48 horas e 70 % de umidade. A germinação dos esporos foi observada através de uma lente de microscópio BX 60 Olympus.

A SLL, nas condições testadas, apresentou comportamento diferente do que se tem observado na literatura para outras lectinas de plantas; por exemplo, houve ligação e inibição do crescimento dos esporos de *Colletotrichum lindemuthianum* quando na presença das lectinas de *Triticum vulgare* (WGA), da *Griffonia simplicifolia* (GSI-B4), *Galanthus nivalis* (GNA) e a da *Bauhinia purpurea* (BPA), específicas a quitina, D-galactose, D-manose e D-galactose / N-acetil-D-galactosamina, respectivamente (Melo *et al.*, 2005). A lectina LAL (*Luetzelburgia auriculata* tribo Sophoreae) inibiu o crescimento da massa micelial dos fungos fitopatogênicos *Colletotrichum*

*lindemuthianum*, *Fusarium solani* e de *Aspergillus Niger* a uma concentração igual a 250 µg / mL, porém não houve inibição da germinação dos esporos. As lectinas da soja (SBA) e do amendoim (PNA), que são também específicas a D-galactose, inibiram a germinação dos esporos de alguns fungos, mas a uma concentração de 5 mg / mL (Barkai-Golan *et al.*, 1978), uma quantidade cinco vezes maior que aquela testada para a SLL.

#### 4- CONCLUSÕES

Uma nova lectina com especificidade por  $\alpha$ - lactose e D- galactose foi purificada das sementes da leguminosa arbórea *Swartzia laevicarpa* (SLL) e foi caracterizada em vários aspectos bioquímicos e fisicoquímicos, além de características lectínicas, sendo então a primeira lectina deste gênero com esta descrição. A proteína foi purificada por meio de cromatografia de afinidade em uma matriz contendo lactose imobilizada. A SLL aglutinou eritrócitos de coelho, mas não os de rato. Esta atividade foi consistentemente inibida na presença de lactose (1,56 mM); galactose (12,5 mM) e N-acetilgalactosamina (0,19 mM), enquanto carboidratos da série glicose e manose não alteraram sua atividade de aglutinação. SLL é uma glicoproteína e tem massa molecular igual a 29 kDa. Estas características são similares as de outras lectinas de leguminosas obtidas de espécies de gêneros proximamente relacionados à tribo Swartzieae, tais como Sophoreae e Dalbergieae, onde foram descritas as lectinas de *Sophora japonica* e de *Vatairea macrocarpa*, respectivamente. As lectinas desses grupos foram mais fortemente relacionadas por meio da sequência de aminoácidos da região N-terminal da SLL, a qual mostrou fortíssima homologia com as lectinas citadas acima e aquela de *Luetzelburgia auriculata* (Sophoreae). A SLL apresentou dois “spots” de massas idênticas com pI distintos quando analisada em eletroforese em duas dimensões. Estas diferenças podem estar associadas a micro-heterogeneidade de sequência ou mesmo na porção glicana da molécula, o que não foi investigado neste trabalho. O elevado grau de pureza obtido no protocolo de purificação da SLL foi confirmado pelo espectro de massas obtido, pela única sequência de aminoácidos determinada e ainda pelo fato de que a proteína cristalizou em ensaios exploratórios. Embora haja relatos na literatura de que outras lectinas, com as citadas acima apresentem atividade anti-fitopatogênica, SLL não foi capaz de inibir a germinação dos esporos e nem o crescimento micelial de vários fungos fitopatogênicos avaliados neste trabalho.

A descrição de lectinas na tribo Swartzieae, em especial no gênero *Swartzia* tem importância no contexto do estudo evolutivo e funcional de lectinas, haja vista que poucas lectinas foram descritas nos grupos taxonômicos mais primitivos da família Fabaceae. Do mesmo modo, muito há a ser explorado no contexto funcional desta nova molécula.

## ANEXO II

### ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA CIENTÍFICA:

#### **Purification and Characterization of a Lectin of the Swartziaea Legume Taxa**

Andreia Varmes Fernandes<sup>1\*</sup>, Márcio Viana Ramos<sup>2</sup>, Ilka Maria Vasconcelos<sup>2</sup>, Ana Cristina Oliveira Monteiro Moreira<sup>3</sup>, Frederico Bruno Moreno<sup>3</sup>, Jose Odair Pereira<sup>4</sup>, José Francisco de Carvalho Gonçalves<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>*National Institute for Research in the Amazon (MCTI-INPA), Laboratory of Plant Physiology and Biochemistry, Manaus, Amazonas, Brazil*

<sup>2</sup>*Federal University of Ceará (UFC), Biochemistry and Molecular Biology Department, Fortaleza, Ceará, Brazil*

<sup>3</sup>*University of Fortaleza (UNIFOR), Health Sciences Center, Fortaleza, Ceará,, Brazil*

<sup>4</sup>*Federal University of Amazonas (UFAM), Department of Agronomy, Manaus, Amazonas, Brazil*

**Protein and Peptide Letters** Volume 19 Issue 10 pp. 1082- 1088, **2012**.

#### **Protein and Peptide Letters**

ISSN: 0929-8665 (Print)

ISSN: 1875-5305 (Online)

## 5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEDL-KADER, M. S.; BAHLER, B. D.; MALONE, S.; WERKHOVEN, M. C. M.; WISSE, J. H.; NEDMANN, K. M.; BURSUKER, I.; KINGSTON, D. G. I.; 2000. Bioactive saponins from *Swartzia schomburgkii* from the suriname rainforest. *J. Nat. Prod.*, 63, 11, 1461-1464.

AINOUZ, I. L., SAMPAIO, A. H. 1991. Screening of Brazilian marine algae for hemagglutinins. *Bot. Mar.*, 34, 211-214.

AINOUZ, I.L.; MOREIRA, R.A.; CAMPOS, F.D.A.P.; RICHARDSON, M.; BEGBIE, M.; STEWART, J.C.; WATT, W.B. & PUSZTAI, A. 1987. The isolation and amino acid sequence of the b and g subunits of the lectin from the seeds of *Dioclea grandiflora*. *Phytochemistry*. 26, 5, 1435-1440.

ALENCAR, V.B.; ASSREUY, A.M.; ALENCAR, N.M.; MEIRELES, A.V.; MOTA, M.R.; ARAGAO, K.S.; CAJAZEIRAS, J.B.; NAGANO, C.S.; BRITO, G.A.; SILVA, L.I.; PINTO, V.P.; SAMPAIO, A.H.; DEBRAY, H., CAVADA, B.S., RIBEIRO, R.A.2005. Lectin of *Pisum arvense* seeds induces in-vivo and in-vitro neutrophil migration. *J. Pharm. Pharmacol.*, 57, 375-381.

BARKAI-GOLAN, R.; MIRELMAN, D.; SHARON, N. 1978. Studies on growth inhibition by lectins of *Penicillia* and *Aspergilli*, *Arch. Microbiol*, 116, 119–124.

BARONDES, S.H. Bifunctional properties of lectins: lectins redefined. 1988. *Trends in Biochemical Sciences*, Oxford, 13, 480-482.

BARRE, A., BOURNE, Y., VAN DAMME, E.J., PEUMANS, W.J., AND ROUGE, P. 2001. Mannose-binding plant lectins: Different structural scaffolds for a common sugar-recognition process. *Biochimie*, 83, 7, 645–651.

BARRE, A., LAUGA J., ROUGÉ P. 1994. The three-dimensional structure of lectins: a phenetic and phylogenetic tool for the Leguminosae. *Biochem. Syst. Ecol.*, 2, 4, 401-407.

BOWLES, D.J.; MARCUS, S.E.; PAPPIN, D.J.C.; FINDLAY, J.B.C.; ELIOPOULOS, E.; MAYCOX, P.R. and BURGESS, J. 1986. Posttranslational processing of Concanavalin A precursors in Jack bean cotyledons. *The Journal of Cell Biology*, 102, 1284-1297.

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

BRAZ- FILHO, R.; MORAES, M.P.L.; GOTTLIEB, O. R. 1980. Pterocarpanas from *Swartzia laevicarpa*. *Phytochemistry*, 19, 9, 2003-2006.

BROEKAERT WF, VAN PARIJS J, LEYNS F, JOOS H, PEUMANS WJ. 1989. A chitin-binding lectin from stinging nettle rhizomes with antifungal properties. *Science*, 8, 245, 1100–1102.

CALVETE, J.J.; SANTOS, C.F.; MANN, K.; GRANGEIRO, T. B.; NIMTZ, M.; URBANKE, C.; CAVADA, B.S. 1998. Amino acid sequence, glycan structure, and proteolytic processing of the lectin of *Vatairea macrocarpa* seeds. *FEBS Letters*, 1998, 425, 2, 286-292.

CAVADA, B.S.; MARINHO, E. S.; BENEVIDES, R. G.; SOUZA, L. A. G.; KYRIA, S. N.; SAMPAIO, A. H.; MORENO, F. B. M; RUSTIGUEL, J. K. R.; CANDURI, F.; AZEVEDO, W. F. DE, JR.; DEBRAY, HENRI. 2006. Purification, partial characterization and preliminary X-ray diffraction analysis of a mannose-specific lectin from *Cymbosema roseum* seeds. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*. 1, 62, 235–237.

CAVADA, B.S.; MOREIRA-SILVA, L.I.M.; GRANGEIRO, T.B.; SANTOS, C.F.; PINTO, V.P.T.; BARRAL NETTO, M.; ROQUE-BARREIRA, M.C.; GOMES, J.C.; MARTINS, J.L.; OLIVEIRA, J.T.A. & CAVADA, B.S. 1996. Purification and biological properties of a lectin from *Canavalia bonariensis* Lind. Seeds. In: VAN DRIESSCHE, E.; FISHER, J.; BEECKMANS, S. & BOG-HANSEN, T.C. (Ed) *Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*. Denmark, Textop, 11, 74-80.

CAVADA, BS, MADEIRA, SVF, CALVETE, JJ, SOUZA, LA, BOMFIM, LR, DANTAS, AR, LOPES, MC, GRANGEIRO, TB, FREITAS, BT, PINTO, VP, LEITE, KB, RAMOS, MV. 2000. Purification, chemical, and immunochemical properties of a new lectin from Mimosoideae (*Parkia discolor*). Prep. Biochem. Biotechnol. 30, 4, 271-80.

CAVALCANTI, M.S.M., COELHO, L.C.B.B. 1990. Isolation and partial characterization of a lectin from *Swartzia pickelii* Killip (white jacaranda). Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 85, 3, 371-372.

CECCATTO, V. M.; CAVADA, B. S.; NUNES, E. P.; NOGUEIRA, N.A.; GRANGEIRO, M. B.; MORENO, F. B.; TEIXEIRA, E. H.; SAMPAIO, A. H.; ALVES, M. A.; RAMOS, M. V.; CALVETE, J. J.; GRANGEIRO, T.B. 2002. Purification and partial characterization of a lectin from *Canavalia grandiflora* benth. seeds. Protein Pept Lett. 9, 1, 67-73.

CHARUNGCHITRAK, S., A. PETSOM, P. SANGVANICH AND A. KARNCHANATAT, 2011. Antifungal and antibacterial activities of lectin from the seeds of *Archidendron jiringa* Nielsen. Food Chem., 126, 1025-1032.

COELHO, L. C. B. B.; SILVA, M. B. R. 2000. Simple method to purify milligram quantities of the galactose-specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*; *Phytochem. Anal*, 295–300.

CORBY, H.D.L. 1981. *The systematic value of leguminous root nodules*, p.657-670. In: Pohlhill, R.M.; Raven, P.H. (EdS.). *Advances in Legume Systematics. Part 2. Proceedings of the International Legume Conference*. Royal Botanical Gardens, London.

CORREIA, J. L. A.; NASCIMENTO, A. S.; FERNANDES, J. B. C. *et al.*, 2011. Molecular Characterization and Tandem Mass Spectrometry of the Lectin Extracted from the Seeds of *Dioclea sclerocarpa* Ducke. *Molecules*. 16, 9077-9089; doi:10.3390/molecules16119077.

COWAN, R.S. 1967. *Swartzia* (Leguminosae, Caesalpinioideae, Swartzieae). Flora Neotropica Monograph. New York: Hafner Publishing Company., 1, 228 p.

CUNHA, A. P.; ROQUE, O. R. 2005. Esteróis e triterpenos: ácidos biliares, precursores da vitamina D e fitosteróides, cardiotônicos, hormonas esteróides, matérias-primas de núcleo esteróide usadas em sínteses parciais e saponósidos. In: CUNHA, A. P. Farmacognosia e fitoquímica. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 432-482.

DE MEJIA, E.; PRISECARU, V. 2005. Lectins as bioactive plant proteins: A potential in cancer treatment. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 45, 425-445.

DEBRAY, H., CODDEVILLE, B., BOMFIM, L.R, AND RAMOS, M.V. 2009. A simple micro-method for determining precise oligosaccharidic specificity of mannose-binding lectins. Glycobiol, 19, 12, 1417-26.

DUBOIS, J. L.; SNEDEN, A.T. 1995. Dihydrolico isoflavone a new isoflavonone from *Swartzia polyphylla*. Journal of Natural Products, Washington, 58, 4, 629- 632, 1995.

ETZLER, M.E.; MACMILLAN, S.; SCATES, S.; GIBSON, D. M.; JAMES, D.W.; COLE, D.; HAYER, S. 1984. Subcellular localizations of two *Dolichos biflorous* lectins. Plant Physiol, 76, 871-878.

FAVACHO, A. R. M.; CINTRA, E. A.; COELHO, C. B. B.; LINHARES, M. I. da S. 2007. In vitro activity evaluation of *Parkia pendula* seed lectin against human cytomegalovirus and herpes virus 6. Biologicals, 35, 189-194.

FERNANDES, A.V.; RAMOS, M.V.; GONÇALVES, J.F.C.; MARANHÃO, P.A.C.; CHEVREUIL, L.R.; SOUZA, L.A. 2011. Seeds of Amazonian Fabaceae as a source of new lectins. Brazilian Journal of Plant Physiology, 23, 237 – 244.

FREIRE, M.G.M.; GOMES, V.M.; CORSINI, R.E.; MACHADO, O.L.T.; DE SIMONE, S.G.; NOVELLO, J.C.; MARANGONI, S.; MACEDO, M.L.R. 2002. Isolation and partial characterization of a novel lectin from *Talisia esculenta* seeds that interferes with fungal growth. *Plant Physiology Biochemistry*, 40, 61-68.

- GABIUS, H. J. 1997. Animal lectins. *Eur. J. Biochem.* 243, 543-576.
- GALLEGO DEL SOL, F., NAGANO, C., CAVADA, B. S. AND CALVETE, J. J. 2005. The first crystal structure of a Mimosoideae lectin reveals a novel quaternary arrangement of a widespread domain, *J. Mol. Biol.* 353, 574-583.
- GENTRY, A.H. 1996. A field guide to the families and genera of woody plants of North West South America (Colômbia, Equador, Peru) with supplementary notes on herbaceous taxa. *Journal of Tropical Ecology*, 12, 5, 722-727.
- GOLDSTEIN, I. J.; PORETZ, R. D. 1986. Isolation, physico-chemical characteristics, and carbohydrate binding specificity of lectins. In: LIENER, I.E., SHARON, N. & GOLDSTEIN, I. J. ed. *The Lectins. Properties, Functions, and Applications in Biology and Medicine*. Orlando, Academic Press., 33-247.
- GRANGEIRO, T. B; GATEHOUSE, J. A PEREIRA, M. N.; CAVADA, B. S. 1997. Investigation on the origin of the naturally occurring fragments of *Cratylia floribunda* lectin. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, Brasil*, 9, 1, 9-13.
- HAMADA, S., GILL, K., SLADE, H. D. 1977. Binding of lectins to *Streptococcus mutans* cells and type-specific polysaccharides, and effect on adherence. *Infect. Immun.* 18, 708 - 716.
- HIRSCH, A. M. 1999. Role of lectins (and rhizobial exopolysaccharides) in legume nodulation. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2, 320-326.
- HORISBERGER, M.; ROSSET, J.; BAUER, H. 1976. Localization of mannan at the surface of yeast protoplasts by scanning electron microscopy. *Archives of Microbiology*, 109, 1-2, 9-14.
- HOSTETTMANN, K.; WOLFENDER, J L. 1997. The search for biologically active secondary metabolites. *Pesticide Science*, 51, 471-482.
- HOUSTON, L. L.; DOYLE, T. P. 1982. *Journal Biochem. Chem.* Hemagglutination of lectins. 257, 41-47.

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA. INPA. Estudo de leguminosas florestais da Amazônia Central como fonte potencial de matéria-prima para uso tecnológico. Manaus;1998. 11p. (INPA/PPI2-3360).

JIMÉNEZ, G.; HASEGAWA, M.; RODRIGUEZ, M.; ESTRADA, O.; MÉNDEZ, J.; KENNEDY, J.F., PALVA, P.M.G., CORELLA, M.T.S., CAVALCANTI, M.S.M., COELHO, L.C.B.B. 1995. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. *Carbohydrate Polymers*, Great Yarmouth, 26, 3, 219-230.

KENNEDY, J.F., PALVA, P.M.G., CORELLA, M.T.S., CAVALCANTI, M.S.M., COELHO, L.C.B.B. 1995. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. *Carbohydrate Polymers*, Great Yarmouth, 26, 3, 219-230.

KHEEREE N, SANGVANICH P, PUTHONG S, KARNCHANATAT, A. 2010. Antifungal and antiproliferative activities of lectin from the rhizomes of *Curcuma amarissima* Roscoe. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 162, 912- 925.

KOCOUREK, J.; HOREJS, V. I. 1983. A note of the recent discussion of definition of the term "lectin". In T.e. Bog-Hansen e G.A. Splengler, eds. *Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*, 3, 3-6, Walter de Gruyter, Berlin.

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

KONOZY, E.H.E., MULAY, R., FACA V., WARD R.J., GREENE, L.J., ROQUE-BARREIRA, M.C., SABHARWAL, S., BHIDE, S.V. 2002. Purification, some properties of a D-galactose-binding leaf lectin from *Erythrina indica* and further characterization of seed lectin, *Biochimie*, 84, 10, 1035-1043.

KUKU, A., ODEKANYIN, O., ADENIRAN, K., ADEWUSI, M., OLONADE, T. 2009. Purification of a mannose/glucose- specific lectin with antifungal activity from pepper seeds (*Capsicum annum*). *Afr. J. Biochem. Res.*, 36, 272-278.

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

LASTOVIC~KOV, M.; DAGMAR, S.; BOBALOVA, J. 2011. The Combination of Lectin Affinity Chromatography, Gel Electrophoresis and Mass Spectrometry in the Study of Plant Glycoproteome: Preliminary Insights. *Chromatographia*, 73, Suppl. 1, 113–122.

LEWIS, G.P. and OWEN, P.E. 1989. Legumes of the Ilha de Maracá. Royal Botanic Gardens, Kew.

LEWIS, G.P., SCHIRE, B.D., MACKINDER, B.A. & LOCK, J.M. 2005. Legumes of the World. Royal Botanic Gardens, Kew.

LI, T.; YIN, X.; LIU, D.; MA, X.; LV, H.; SUN, S. 2012. Isolation and characterization of a novel lectin with antifungal and antiproliferative activities from *Sophora alopecuroides* seeds. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 44, 7, 606-13.

LIMA, H.C. 2010. Fabaceae. p. 989-1102. In: Forzza, R.C. *et al.* (Org.). *Catálogo de plantas e fungos do Brasil*, v. 2. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

LORENZI, H. 2002. Árvores brasileiras: *Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil*. v. 2, 2ª Ed. Nova Odessa, Editora Plantarum, SP, 394 pp.

LORIS, R. 2002. Principles of structures of animal and plant lectins. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1572, 2002, 198– 208.

LORIS, R., HAMELRYCK, T., BOUCKAERT, J., AND WYNS, L. 1998. Legume lectin structure. *Biochim. Biophys. Acta* 1383, 9-36.

- LOUREIRO; A. L.; RODRIQUES, W. A. 1975. Estudo anatômico da madeira do gênero *Swartzia* (Leguminosae) da Amazônia. I. Acta Amazonica, 5, 1, 79- 86.
- MAGALHÃES, A.F.; TOZZI, A.M.G.A.; SANTOS, C.C.; MAGALHÃES, E.G. 2006. Analysis of metabolites from plants of the *Swartzia* genus using chemical indexes: evolutionary tendencies. Eclética química, 31, 13 - 16.
- MARSTON, M.A; MAILLARD, M.; HOSTETTMANN, K. 1993. Search for antifungal, molluscicidal and larvicidal compounds from African medicinal-plants. Journal of Ethnopharmacology, 38, 2, 215-223.
- MASUKO, T.; MINAMI, A.; IWASAKI, N.; MAJIMA, T.; NISHIMURA, S.I.; LEE, Y.C. 2005. Carbohydrate analysis by a phenol – sulfuric acid method in microplate format. Analytical Biochemistry, 339, 69 – 72.
- MELGAREJO, L. M.; VEJA, N. PÉREZ, G. 2005. Isolamento e caracterização de novas lectinas de sementes de *Canavalia ensiformis* DC e *Dioclea grandiflora* Mart. ex Benth. Braz. J. Plant Physiol. 17, 3, Londrina July/Sept.
- MELO, V.M.M., I.M. VASCONCELOS, V.M. GOMES, M.D. CUNHA, A.A. SOARES AND J.T.A. OLIVEIRA. 2005. A cotyledonary agglutinin from *Luetzelburgia auriculata* inhibits the fungal growth of *Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium solani* and *Aspergillus niger* and impairs glucose-stimulated acidification of the incubation medium by *Saccharomyces cerevisiae* cells. Plant Sci., 169, 629-639.
- MONZO, A., G.K. BONN AND A. GUTTMAN. 2007. Lectin-immobilization strategies for affinity purification and separation of glycoconjugates. Trends Anal. Chem., 26, 423-432.
- MORAES, S.M.; CAVADA, B. S.; MOREIRA, R. A.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; SANTOS-DE-OLIVEIRA, R.; PINTO, V. P.; OLIVEIRA, J.T. 1996. Purification, physicochemical characterization and biological properties of a lectin from *Erythrina velutina* forma aurantiaca seeds. Braz. J. Med. Biol. Res. 29, 8, 977-985.

MOREIRA, F.W.; MOREIRA, F.M.S.; SILVA, M.F. 1995. Germinação, crescimento inicial e nodulação em viveiro de saboarana (*Swartzia laevicarpa* Amshoff). *Acta Amazonica*, Manaus, 25, 3/4, 149-460.

MOREIRA, R. A.; AINOZ, I; OLIVEIRA, J. T. A. DE ; CAVADA, B. S. 1991. Plant lectins, chemical and biological aspects. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* , 86, 2, 211 - 218.

MOREIRA, R. A.; CORDEIRO, E. F.; RAMOS, M. V.; GRANGEIRO, T. B.; MARTINS, J. L.; OLIVEIRA, J. T. A.; CAVADA, B. S. 1996. ISOLATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF A LECTIN FROM SEEDS OF *Dioclea violacea*. *Revista. Bras. Fisiol. Veg.*, 8, 1, 23-29.

MOREIRA, R.A.; CAVADA, B.S. 1984. Lectin from *Canavalia brasiliensis* (Mart.). Isolation, characterization and behavior during germination. *Biologia Plantarum*, 26: 113 – 120.

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

MORENO, F.B.M.B., DE OLIVEIRA T.M., MARTIL D.E., VICOTI M.M., BEZZERA G.A., ABREGO J.R.B., CAVADA B.S., DE AZEVEDO W.F. JR. 2008. Identification of a new quaternary association for legume lectins. *J. Struct. Biol.*, 161, 133-143.

MOURA, T. R.; BEZERRA, G. A.; BEZERRA, M. J. B.; ALENCAR, K. L. L.; BEZERRA, E. H. S.; BENEVIDES, R. G.; ROCHA, B. A. M.; DELATORRE, P.; NAGANO, C. S.; CAVADA, B. S.; SAMPAIO, A. H. 2008. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the lectin from *Canavalia boliviana* Piper seeds. Brazilian Synchrotron Light Laboratory. Activity Report. 1-2.

MOUREY L, PE'DELACQ J-D, BIRCK C, FABRE C, ROUGE' P, SAMAMA J-P. 1998. Crystal structure of the arcelin-1 dimer from *Phaseolus vulgaris* at 1.9-Å resolution. *J. Biol. Chem.*, 273, 12914–12922.

NAGY, Z., NÓGRÁDI, M.; SRÁNYI, M.; SZABÓ, B. 1984. Synthesis of the pterocarpan constituents of *Swartzia laevicarpa*. Liebigs Annalen der Chemie, 127-132, *Nature*, 285, 66; doi:10.1038/285066b0.

NEETHIRAJAN, S., C. KARUNAKARAN AND D.S. JAYAS, 2005. Biosensors: An emerging technology for the agricultural and food industry. Proceedings of the CSAE/SCGR Meeting, June 26-29, Winnipeg, Manitoba, 1-8.

NEUROHR, K.J., N.M. YOUNG AND H.H. MANTSC. 1980. Determination of the carbohydrate-binding properties of peanut agglutinin by ultraviolet difference spectroscopy. *J. Biol. Chem.*, 255, 9205-9209.

NG, T. B; T.K. AU; T.L. LAM; X.Y. YE; D.C.C. WAN. 2002. Inhibitory effects of antifungal proteins on human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase, protease and integrase. *Life Sciences*, 70, 927-935.

OHYAMA, Y., K. KASAI, H. NOMOTO AND Y. INOUE, 1985. Frontal affinity chromatography of ovalbumin glycoasparagines on aconcanavalinA-Sepharose column. *J. Biol. Chem.*, 260, 6882-6887.

OLIVEIRA, J.T.; MELO, V.M.; CÂMARA, M.F.; VASCONCELOS, I.M.; BELTRAMINI, L.M.; MACHADO, O.L.; GOMES, V.M.; PEREIRA, S.P.; FERNANDES, C.F.; NUNES, E.P.; CAPISTRANO, G.G.; MONTEIRO-MOREIRA, A.C. 2002. Purification and physicochemical characterization of a cotyledonary lectin from *Luetzelburgia auriculata*. *Phytochemistry*, 61, 3, 301-310.

OLIVEIRA, M.D.L.; ANDRADE, C.A.S.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S.; COELHO, L.C.B.B.; TEIXEIRA, J.A.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M.G.; CORREIA, M.T.S. 2008. Purification of a lectin from *Eugenia uniflora* L. seeds and its potential antibacterial activity. *Lett. Appl. Microbiol.*, 46, 371-376.

OLSNES S, KOZLOV JV. 2001. *Ricin. Toxicon*, 39, 11, 1723-1728.

PAIVA, P.M.G.; GOMES, F.S.; NAPOLEÃO, SÁ, T.H.; CORREIA, M.T.S.; E COELHO, L.C.B.B. 2010. Antimicrobial activity of secondary metabolites and lectins from plants. Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. FORMATEX.

PAJIC I, KLJAJIC Z, DOGOVIC N, SLADIC D, JURANIC Z, GASIC MJ. 2002. A novel lectin from the sponge Haliclona cratera: isolation, characterization and biological activity. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol., 132, 213–221.

PEREZ, E.L. 2008. A diversidade vegetal da Amazônia e o Patrimônio Genético Mundial, p.39-52. In: Borém, A.; Lopes, M.T.G.; Clement, C.R. (Eds.). *Domesticação e melhoramento: espécies amazônicas*. Editora UFV, Viçosa.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. 1998. Plant Lectins: versatile proteins with important perspectives in biotechnology. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, 15, 199-227.

PEUMANS, W. J.; ZHANG, W., BARRE, A.; HOULÈS, A., S.; BALINT-KURTI, P. J., ROVIRA, P.; ROUGÉ, P.; MAY, G. D.; VAN LEUVEN, F.; TRUFFA-BACHI, P.; VAN DAMME, E. J. 2000. Fruit-specific lectins from banana and plantain. Planta, 211, 6, 546-554.

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

PISTOLE T,G. 1981. Interaction of bacteria and fungi with lectins and lectin-like substances. Ann Rev Microbiol., 35, 85-112.

POLHILL, R.M., RAVEN, P.H. e STIRTON, C.H. 1981. Evolution and systematics of the Leguminosae. In Advances in Legumes Systematics 1 (R.M. Polhill & P.H. Raven, ed.). Royal Botanic Gardens, Kew, 1-26.

QUIOCHO, F.A. 1986. Carbohydrate-binding proteins. Tertiary structures and protein-sugar interactions. *Ann. Rev. Biochem.*, 55, 287-315.

RAHAIE, M.; KAZEMI, S.S. 2010. Lectin-based Biosensors: As Powerful Tools in Bioanalytical Applications. *Biotechnology*, 9, 4, 428 - 443.

RAMOS, M.V. 1997. Biosynthesis and structural lectin features of the *Phaseoleae*, *Diocleinae* and the *Vicieae* (*Leguminosae* = *Fabaceae*) under a phylogenetic perspective. *J. Comp. Biol.*, 2, 129-136.

RAMOS, M.V.; BOMFIM, L.R.; CAVADA, B.S.; ALENCAR, N.M.N.; GRANGEIRO, T.B.; DEBRAY, H. 2000. Further characterization of the glycan-binding specificity of the seed lectin from *Vatairea macrocarpa* and its dependence of pH. *Protein Pept. Lett.*, 2000, 7, 4, 241-248.

RAMOS, M.V.; MOREIRA, R.A.; CAVADA, B.S.; OLIVEIRA, J.T.A.; ROUGÉ, P. 2002. Interaction of lectins from the sub-tribe Diocleinae with specific ligands. *R. Bras.Fsiol. Veg.*, 2002, 8, 3, 193-199.

RANGEL, T. B. A.; ASSREUY, A. M. S.; PIRES, A. F.; *et al.* 2011. Crystallization and Characterization of an Inflammatory Lectin Purified from the Seeds of *Dioclea wilsonii*. *Molecules*. 16, 5087-5103; doi:10.3390/molecules16065087.

RICHARDSON, M.; CAMPOS, F.D.A.P.; MOREIRA, R.A.; AINOZ, I.L.; BEGBIE, R.; WATT, W.B. & PUSZTAI, A. 1984. The complete amino acid sequences of the major a-subunit of the lectin from the seeds of *Dioclea grandiflora* (Mart). *European Journal Biochemistry*, 144, 101-111.

ROUGÉ P., VARLOOT L. 1990. Structural homologies between leguminosae lectins as revealed by the hydrophobic cluster analysis (HCA) method. *Biochem. Syst. Ecol.* 18, 419-427.

ROUGÉ, P., LAUGA, J., RICHARDSON, M. 1987. Tentative phylogenetic trees of the papilionoideae and viciae based upon the amino acid composition of their lectins Biochem. Syst. Ecol., 15, 445-452.

RÜDIGER H, SIEBERT HC, SOLÍS D, JIMÉNEZ-BARBERO J, ROMERO A, VON DER LIETH CW, DIAZ-MAURINO T, GABIUS H.J. 2000. Medicinal chemistry based on the sugar code: Fundamentals of lectinology and experimental strategies with lectins as targets. Curr Med Chem. 7, 389–416.

RÜDIGER, H, 1991. Structure and function of plant lectins. In Glycosciences: Status and Perspectives, edited by Gabius HJ, Gabius S (Chapman & Hall, London), 415–38.

RUDIGER, H.; GABIUS, H.J. 2001. Plant lectins: Occurrence, biochemistry, functions and applications. Glycoconjugate Journal, 18, 589-613.

SAFINA, G., M. VAN LIER AND B. DANIELSSON, 2008. Flow-injection assay of the pathogenic bacteria using lectin-based quartz crystal microbalance biosensor. Talanta, 77, 468-472.

SAMES, K., SCHUMACHER, U., HALATA, Z., VAN DAMME, E.J., PEUMANS, W.J., ASMUS, B., MOLL, R., AND MOLL, I. 2001. Lectin and proteoglycan histochemistry of Merkel cell carcinomas. *Exp. Dermatol.*, 10, 2, 100–109.

SANCHÉZ, C.S.; ROCHA, A.F.I.; PINHEIRO, M.L.B.; ANDRADE, C.H.S.; MONTE, F.J.Q. 1999. Brachyrachisina: isoflavona inédita de *Swartzia* (Leguminosae). *Acta Amazonica*, Manaus, 29, 3, 419-422.

SARDAS; R.H.; CHABRAS, S.C.; MINJAS, J.N. 1986. Laboratory observations on the molluscicidal properties of *Swartzia madagascariensis* (Leguminosae). *Journal of Ethnopharmacology*, 15, 2, 211-213.

SCHAEFER, R. L., KELLER, K. F. & DOYLE, R. J. 1979. Lectins in diagnostic microbiology: use of wheat germ agglutinin for laboratory identification of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Microbiol*, 10, 669–672.

SCHEGGIA, C., PRISCO, A.E., DEY, P.M., DALEO, G.R., AND PONT LEZICA, R. 1988. Alteration of lectin pattern in potato tuber by virus X. *Plant Sci.* 58, 9-14.

SCHIEFER, H. G., GERHARDT, U., BRUNNER, H., KNIPE, M. 1974. Studies with lectins on the surface carbohydrate structures of mycoplasma membranes. *J. Bacteriol.* 120, 81-88.

SCHWARZ, R.E.; WOJCIECHOWICZ, D.C.; PICON, A.I.; SCHWARZ, M.A.; PATY, P.B. 1999. Wheatgerm agglutinin-mediated toxicity in pancreatic cancer cells. *Br. J. Cancer.*, 80, 11, 1754–1762.

SHAKIROVA F. M., BEZRUKOVA M. V., KHAIRULLIN R. M., YAMALEEV A. M., 1993. The increase in lectin level in wheat shoots under the action of salt stress. *Proceedings of the Russian Academy of Sciences*, 1, 141–145.

SHANKARAN, D.R., K.V. GOBI AND N. MIURA, 2007. Recent advancements in surface plasmon resonance immunosensors for detection of small molecules of biomedical, food and environmental interest. *Sens. Actuators B*, 121, 158-177.

SHARMA, A.; NG, T. B.; WONG, J. H.; LIN, P. 2009. Purification and Characterization of a Lectin from *Phaseolus vulgaris* cv. (Anasazi Beans). *Journal Biomed. Biotechnol.* 929568. doi: 10.1155/2009/929568.

SHARMA, S.K., N. SEHGAL AND A. KUMAR, 2003. Biomolecules for development of biosensors and their applications. *Curr. Appl. Physics*, 3, 307-316.

SHARON, N.; LIS, H. 1990. Legumes lectins – a large family of homologous proteins. *FASEB J*, 4, 3198-3208.

SHARON, N.; LIS, H. 2004. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*, 14, 11, 53R–62R.

SHUTOV, A. D.; BRAUN, H.; CHESNOKOV, Y. V.; BÄUMLEIN, H. 1998. A gene encoding a vicilin-like protein is specifically expressed in fern spores. Evolutionary pathway of seed storage globulins. *Eur. Journal Biochem.* 15, 252, 1, 79-89.

SILVA, H. C; BARI, A. U; PEREIRA-JÊNIO, F. N; SIMÕES, R. C; BARROSO-NETO, I. L; NOBRE, C. B.; PEREIRA, M. G.; NASCIMENTO, K. S; ROCHA, B. A; DELATORRE, P.; NAGANO, C. S.; ASSREUY, A. M.; CAVADA, B. S. 2011. Purification and partial characterization of a new pro-inflammatory lectin from *Bauhinia bauhinioides* Mart (Caesalpinoideae) seeds. *Protein Pept. Lett.* 18, 4, 396-402.

SILVA, M. C. C. SANTANA, L. A. B.; SILVA-LUCCA, R.; LIMA, A. *et al.* 2011. Immobilized *Cratylia mollis* lectin: An affinity matrix to purify a soybean (*Glycine max*) seed protein with in vitro platelet antiaggregation and anticoagulant activities. *Process Biochemistry*, 46, 74–80.

SILVA, M.F.; SOUZA, L.A.G. 2002. Levantamento das leguminosas do arquipélago das Anavilhanas, baixo rio Negro, Amazonas. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, Série Botânica*, 18, 1, 3-35.

SINGH, R. S.; TIWARY, A. K.; KENNEDY, J. F. 1999. Lectins: Sources, Activities, and Applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 19, 2, 145-178, 34.

SITOHY, M., M. DOHEIM AND H. BADR, 2007. Isolation and characterization of a lectin with antifungal activity from Egyptian *Pisum sativum* seeds. *Food Chem.*, 104, 971-979.

SOUZA, L. A. G. 2012. Biodiversidade e importância madeireira das Fabaceae da Amazônia brasileira. In: Vianez, Bazilio Frasco; Varejão, Maria de Jesus Coutinho; Abreu, Raimunda Liége Souza; Sales-Campos, Ceci. (Org.). *Potencial tecnológico de madeiras e resíduos florestais da Amazônia Central*. 1 ed. Manaus, AM: Editora do INPA, 1, 11-30.

SPRENT, J.I. 2000. Nodulation in woody legumes our state of ignorance. *Iufro, NFT News, Improvement and Culture of Nitrogen Fixing Trees*, 3, 1, 4- 5.

STILLMARK, H. 1888. Ueber Ricin, ein giftiges Ferment aus den Samen von *Ricinuscomm.L.* und einigen anderen Euphorbiaceen, Schnakenburg's Buchdruckerei, Dorpat.

STÖCKMANN, H.; NEVES, A. A.; STAIRS, S.; IRELAND-ZECCHINI BRINDLE, H., K. M.; AND F. J. LEEPER. 2011. Development and evaluation of new cyclooctynes for cell surface glycan imaging in cancer cells. *Chem. Sci.*, 2, 932–936.

SUMNER, J. B.; HOWELL, S. F. 1936. The identification of the hemagglutinin of the jack bean with concanavalin A. *Journal Bacteriol.* 32, 227, 237.

SUN, Y. D., FU, L. D.; JIA, Y. P.; DU, X. J. 2011. A hepatopancreas-specific C-type lectin from the Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* exhibits antimicrobial activity. *Mol. Immunol.* 45, 348-361.

TRINDADE, MB, LOPES, JL, SOARES-COSTA A, MONTEIRO-MOREIRA AC, MOREIRA, RA, OLIVA, ML, BELTRAMINI, LM. 2006. Structural characterization of novel chitin-binding lectins from the genus *Artocarpus* and their antifungal activity. *Biochim Biophys Acta*, 1764, 146–152.

VAN DAMME, E. J. M., ALLEN, A. K. AND PEUMANS, W. J. 1988<sup>b</sup>. Related mannose-specific lectins from different species of the family Amaryllidaceae. *Physiol. Planta* 73, 52-57.

VAN DAMME, E. J. M.; BARRE, A.; ROUGÉ, P.; PEUMANS, W. J.; 2004. Cytoplasmic/nuclear plant lectins: a new story. *Trends Plant Sci.*, 9, 484–489.

VAN DAMME, E.J., PEUMANS, J., PUSZTAI, A., AND BARDOCZ, S. 1998<sup>a</sup>. *Handbook of Plant Lectins: Properties and Biomedical Applications*. John Wiley, Chichester.

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

VAZ, A. F. M.; COSTA, R. M. P. B.; MELO, A. M. M. A.; OLIVA, M. L. V.; SANTANA, L. A.; SILVA-LUCCA, R. A.; COELHO, L. C. B. B. ; CORREIA, M. T. S. 2010. Biocontrol of *Fusarium* species by a novel lectin with low ecotoxicity isolated from *Sebastiania jacobinensis*. *Food Chemistry*. 119, 1507–1513.

VITALE A, CHRISPEELS MJ. 1992. Sorting of proteins to the vacuoles of plant cells. *Bioessays*., 14, 3, 151–160.

WINA, E.; MUETZEL, S.; BECKER, K. 2005. The impact of saponins or aponincontaining plant materials on ruminant productions: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 8093-8105.

WU, G.; CUI, H.R.; SHU, Q.; XIA, Y.W.; XIANG, Y.B.; GAO, M.W.; CHENG, X. and ALTOSAAR, I. 2000. Stripped stem borer (*Chilo suppressalis*) resistant transgenic rice with a *cryIAb* gene from *Bt* (*Bacillus thuringiensis*) and its rapid screening. *Journal of Zhejiang University*, 19, 3, 15-18.

YAN Q, JIANG Z, YANG S, DENG W & HAN L. 2005. A novel homodimeric lectin from *A stragalus mongholicus* with antifungal activity. *Arch Biochem Biophys*. 442, 72–81.

YE, X. Y.; NG, T. B.; TSANG, P. W.; WANG. J. 2001. Isolation of a homodimeric lectin with antifungal and antiviral activities from red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. *J. Protein Chem.*, 20, 367-375.

YU, L.G.; MILTON, J.D.; FERNIG, D.G.; RHODES, J.M. 2001. Opposite effects on human colon cancer cell proliferation of two dietary Thomsen Friedenreich antigen-binding lectins. *J Cell. Physiol*; 186, 2, 282–287.

ZHANG, X.; TENG, Y.; FU, A. Y.; ZHANG, A. S.; WANG, C. T.; WANG, C. C.; JIN, L.; ZHANG, W. 2011. Lectin-based electrochemical biosensor constructed by functionalized carbon nanotubes for the competitive assay of glycan expression on living cancer cells. *Chemical Science*.