



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO – UFMA
Centro de Ciências Agrárias e Ambientais
Coordenação de Ciências Biológicas

**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE UMA LECTINA DE
SEMENTES DE *Bauhinia pulchella* BENTH.**

NATHÁLIA MATOS FERREIRA

CHAPADINHA – MA
2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO – UFMA
Centro de Ciências Agrárias e Ambientais
Coordenação de Ciências Biológicas

EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE UMA LECTINA DE
SEMENTES DE *Bauhinia pulchella* BENTH.

NATHÁLIA MATOS FERREIRA

Monografia apresentada à Coordenação de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Maranhão do campus de Ciências Agrárias e Ambientais, como requisito para obtenção do Título de Bacharel/Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof^o. Dr. Claudener Souza Teixeira

CHAPADINHA – MA
2017

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

FERREIRA, NATHÁLIA MATOS.

EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE UMA LECTINA DE
SEMENTES DE BAUHINIA PULCHELLA / NATHÁLIA MATOS FERREIRA.

- 2017.

34 p.

Orientador(a): CLAUDENER SOUZA TEIXEIRA.

Monografia (Graduação) - Curso de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Maranhão, Chapadinha, 2017.

1. BAUHINIA PULCHELLA. 2. CARACTERIZAÇÃO PARCIAL. 3.
LECTINA. 4. LEGUMINOSAE. I. TEIXEIRA, CLAUDENER SOUZA.
II. Título.

À minha querida avó (Maria); minha mãe, (Valdirene) e ao meu pai (Cláudio), que nunca mediram esforços para que eu pudesse concretizar os meus sonhos e alcançar meus objetivos, me ajudando e apoiando em todas as decisões e momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder saúde e sabedoria em todos os momentos da minha longa caminhada.

Ao meu orientador, Prof^o. Dr. Claudener Souza Teixeira, por sua paciência, dedicação, ensinamentos e por ter confiança em meu trabalho.

Aos meus companheiros de laboratório, Rafael Carvalho da Silva e Raissa da Costa Sousa, por todos os ensinamentos e experiência trocados no LaBEM.

À Prof. Dr^a. Michelle e colaboradores do LAPOA, pela paciência e empréstimo de equipamentos para realização de nossos experimentos no LaBEM.

Aos demais professores do campus CCAA-UFMA pelo empréstimo de equipamentos importantes para a realização de nossos trabalhos no LaBEM.

Ao Centro de Hemoterapia e Hematologia do Maranhão – HEMOMAR, pelas amostras de sangues cedidos para realização dos experimentos.

Ao Prof. Dr. Wellington Ferreira do Nascimento e a Bióloga Karla Lílian Rodrigues Batista por aceitarem compor a banca examinadora da defesa de minha monografia.

À minha querida melhor amiga, Carla Costa Viegas, que apesar de todos os momentos de desespero, sempre me deu forças e conselhos para seguir sempre em frente. E, principalmente, por me ouvir e compreender sempre e, pela convivência e momentos de descontração que passaram e que ainda virão.

À minha amiga, Angélica Alves, que apesar do pouco tempo de convivência, fez partes de momentos importantes da minha vida.

À minha amiga, Gisele Correia Gomes, que mesmo distante sempre esteve comigo, me apoiando e ajudando com suas sábias palavras.

Aos meus irmãos, Italo, Cláudio Jr. e Kamily Vitória, pelo amor, carinho e apoio.

À minha tia e tio, Itala Maria e Raimundo, pelo apoio e orações.

À minha avó, Maria das Graças, pela ajuda e apoio.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi
1 INTRODUÇÃO.....	12
1.1. Aspectos históricos.....	13
1.2. Características gerais das lectinas de plantas.....	15
1.3. Classificação estrutural das lectinas de plantas.....	15
1.3.1. Merolectinas.....	15
1.3.2. Hololectinas.....	16
1.3.3. Superlectinas.....	16
1.3.4. Quimerolectinas.....	16
1.4. Lectinas de leguminosas.....	17
1.5. Lectinas da subfamília Caesalpinioideae.....	18
1.6. Considerações gerais sobre o gênero <i>Bauhinia</i>	19
2 OBJETIVOS.....	21
2.1. Objetivo geral.....	21
2.2. Objetivos específicos.....	21
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1. Preparação da farinha.....	22
3.2. Extração de proteínas.....	22
3.3. Tratamento dos Eritrócitos.....	22
3.4. Atividade hemaglutinante.....	23
3.5. Especificidade por carboidratos.....	23
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
4.1. Estudo da atividade hemaglutinante.....	25
4.2. Estudo da inibição por especificidade a carboidratos.....	26
5 CONCLUSÃO.....	28
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Classificação estrutural das lectinas de plantas

Figura 2: Fotos de *Bauhinia pulchella* Benth

Figura 3: Gráfico da atividade hemaglutinante do extrato bruto de *B. pulchella*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Inibição da atividade hemaglutinante de lectinas de sementes de *B. pulchella* por especificidade a carboidratos.

RESUMO

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas de origem não imune que apresentam pelo menos um domínio não catalítico que reconhecem e liga-se de maneira reversível às moléculas específicas de carboidratos e possuem habilidade de aglutinação de células animais e/ou células vegetais e ação de precipitar glicoconjugados. São amplamente distribuídas na natureza, estando presente em sua maioria na família Leguminosae, no qual uma variedade de lectinas deste grupo já foram isoladas e caracterizadas. Este estudo possibilitou identificar a presença de uma lectina em sementes de *B. pulchella* pertencente à família Leguminosae, subfamília Caesalpinioideae. Das extrações obtidas em diferentes valores de pH, a lectina apresentou a melhor solução tampão de extração protéica foi o TRIS HCl 0,1M pH 7,6, pois no extrato bruto preparado observou-se uma maior atividade hemaglutinante. Nos ensaios de hemaglutinação, observou-se que a lectina aglutinou fortemente eritrócitos de coelho tratados com papaína e tripsina após uma 1 h de incubação a 37 °C. Após 12 h de incubação, detectou-se que a lectina aglutinou fracamente eritrócitos humano do tipo B e O. Nos ensaios de inibição da atividade hemaglutinante, a lectina mostrou especificidade por Galactose, β -lactose e α -lactose, apresentando maior especificidade de ligação por β -lactose.

Palavras-chave: Pata de vaca. Lectina de sementes. Caracterização parcial. Leguminosae.

ABSTRACT

Lectins are proteins or glycoproteins of non-immune origin that have at least one non-catalytic domain that recognize and bind reversibly to specific carbohydrate molecules and have agglutination ability of animal cells and/or plant cells and the action of precipitating glycoconjugates. They are widely distributed in nature, being mostly present in the Leguminosae family, in which a variety of lectins from this group have already been isolated and characterized. This study allowed to identify the presence of a lectin in seeds of *B. pulchella* belonging to the family Leguminosae, subfamily Caesalpinioideae. From the extractions obtained at different pH values, the lectin presented the best solution of the protein extraction buffer was TRIS HCl 0.1M pH 7.6, because in the prepared crude extract a greater hemagglutinating activity was observed. In the haemagglutination assays, it was observed that the lectin was strongly agglutinated papain and trypsin-treated rabbit erythrocytes after a 1 h incubation at 37 °C. After 12 h incubation, the lectin was detected to poorly agglutinate human B and O type erythrocytes. In the hemagglutinin inhibition assays, lectin showed specificity for Galactose, β -lactose and α -lactose, exhibiting increased binding specificity for β -lactose.

Keywords: Pata de vaca. Lectin of seeds. Partial characterization. Leguminosae.

1. INTRODUÇÃO

As lectinas são proteínas ou glicoproteínas de origem não imunológica que apresentam pelo menos um domínio não catalítico. Estas reconhecem e ligam-se de maneira reversível às moléculas específicas de carboidratos, característica bastante peculiar em relação aos outros tipos de proteínas, e possuem habilidade de aglutinação de células animais e/ou células vegetais, bem como ação de precipitar glicoconjugados (LANNON & VAN DAMME, 2010; LIS & SHARON, 1998; PEUMANS & VAN DAMME, 1995).

Estas proteínas de plantas se diferenciam das outras proteínas por apresentarem a capacidade de reconhecer e ligar-se a carboidratos específicos como uma habilidade funcional bem definida, sendo assim, considerado um grupo heterogêneo de proteínas por disporem de propriedades bioquímicas, atividades biológicas, especificidades e estruturas moleculares consideravelmente distintas (PEUMANS & VAN DAMME, 1995).

Uma variedade de funções tem sido atribuída às lectinas, como a proteção contra patógenos, o armazenamento e transporte de moléculas, reconhecimento celular, reguladores de crescimento (PUSZTAI, 1991) desempenhando, portanto, um papel fundamental em muitos processos biológicos, tais como: resposta imunológica, fertilização e metástases tumorais (GABIUS; GABIUS, 1997).

As lectinas, atualmente, têm apresentado várias aplicabilidades em muitos estudos científicos, abrangendo aplicações na farmacologia, medicina e agricultura. Logo, são vistas como ferramentas fundamentais para áreas de âmbito biotecnológico devido, às mais diversas propriedades biológicas que estas proteínas apresentam, como: atividade antiinflamatória e pró-inflamatória (FREIRE *et al.*, 2003; BENJAMIN *et al.*, 1997; ASSREUY *et al.*, 1997), efeito vasodilatador (ASSREUY *et al.*, 2009), indução do processo de apoptose celular (BARBOSA *et al.*, 2001) e atividade inseticida (MACEDO *et al.*, 2007; BENETEAU *et al.*, 2010).

Encontram-se amplamente distribuídas na natureza, podendo ser observadas em seres unicelulares (IMBERT *et al.*, 2004), animais (MOURA *et al.*, 2006) e vegetais (LEITE *et al.*, 2005). Nos vegetais, as lectinas podem ser encontradas em algas (LIMA *et al.*, 2005), musgos (MOLINA & VINCENTE, 1995), angiospermas (WONG & NG, 2005; KAUR *et al.*, 2005) e gimnospermas (HAN *et al.*, 2005).

Em vegetais, estas lectinas são geralmente extraídas e isoladas a partir das sementes (FERNANDES *et al.*, 2011), raízes (SOUZA *et al.*, 2011), folhas (SILVA *et al.*, 2010), cerne (SÁ *et al.*, 2008) e tubérculos (KAUR *et al.*, 2006). Em leguminosas, estas proteínas estão, na sua maioria, em tecidos cotiledonares (PUSZTAI, 1991).

Através de sua interação com glicoconjugados de células, as lectinas promovem a formação de ligações de hidrogênio e interações de van der Waals com células adjacentes, provocando a aglutinação dos mesmos (PEUMANS & VAN DAMME, 1995). Tendo em vista esta propriedade peculiar das lectinas, a mesma pode servir como ferramenta para identificar a sua presença em vegetais, por meio da aglutinação de hemácias. Além disso, através de ensaios de inibição da atividade hemaglutinante é possível identificar o carboidrato no qual a lectina tem especificidade ao reconhecer e ligar-se a ele (RAMOS *et al.*, 2002).

1.1. Aspectos históricos

Os primeiros relatos sobre os estudos das lectinas vegetais datam de 1888 quando Hermann Stillmark descreveu a primeira lectina que aglutinava eritrócitos através de estudos realizados com sementes de *Ricinus communis* (Ricina), no qual ele extraiu e isolou a partir de extratos vegetais, amostras proteicas desta semente, que apresentava um grau de toxicidade relativamente alto. Esta descoberta, por sua vez, foi um grande marco na biologia e bioquímica de vegetais, pois a ricina foi a primeira proteína de origem vegetal que possibilitou determinar uma atividade biológica (PEUMANS & VAN DAMME, 1998; SHARON & LIS, 2004).

A partir de então, uma diversidade de lectinas vegetais foram isoladas e diferenciadas de acordo com sua especificidade a açúcares, características bioquímicas, estruturas moleculares e atividades biológicas. Segundo Van Damme e colaboradores (1998), outras sementes das espécies *Croton tiglium* (crotina), *Abrus precatorius* (abrina) e em cascas de *Robinia pseudoacacia* (robina) apresentavam substâncias tóxicas semelhantes a da ricina (KENNEDY *et al.*, 1995).

Até o momento, considerava-se que a toxicidade seria uma propriedade peculiar das lectinas isoladas. Entretanto, esta ideia foi abandonada no século XX, quando Ladsteiner e Raubitscheck (1907) pela primeira vez relataram a presença de lectinas sem toxicidade em sementes de leguminosas da espécie *Phaseolus vulgaris* (feijão), *Pisum sativum* (ervilha),

Vicia sativa e *Lens culinaris* (lentilha). Posterior a estes relatos, uma diversidade de lectinas vegetais não tóxicas foram descritas (VAN DAMME *et al.*, 1998).

Outro grande marco sobre o estudo de lectinas vegetais ocorreu quando Renkonen (1948) e Boyd & Reguera (1949) descreveram algumas lectinas que apresentavam preferência em aglutinar eritrócitos do sistema ABO. Foi este relato sobre a especificidade destas proteínas por grupos sanguíneos, que lhes deram o termo “lectina” que vem do latim “*legere*” = “selecionar”, pois anteriormente, eram chamadas de hemaglutininas (VAN DAMME *et al.*, 1998; SHARON & LIS, 2004).

Em meados de 1919, a lectina das sementes de *Canavalia ensiformes* foi isolada através de técnicas de cristalização realizadas por James Summer, que conseguiu obter a primeira lectina pura denominada de concanavalina A (ConA). Estudos posteriores realizados por Summer e Howell (1936) demonstraram que a ConA também aglutinava eritrócitos e precipitava glicoconjugados. Além disso, relataram que a atividade hemaglutinante desta lectina era inibida por sacarose, demonstrando os primeiros estudos sobre a especificidade destas proteínas por carboidratos. Porém, apenas em 1952 através de estudos realizados por Watkins & Morgan foi possível mostrar que estas propriedades de aglutinação de eritrócitos das lectinas estavam diretamente relacionadas com a atividade específica de ligação a açúcares (SHARON & LIS, 2004).

Outro marco ocorreu em 1960, quando Petter C. Nowell relatou que a lectina de *Phaseolus vulgaris* L. apresentava atividade mitogênica sobre os linfócitos, sendo assim, uma descoberta importante na imunologia, pois até o momento compreendia-se que estas células não eram capazes de se dividirem e se diferenciarem em outros tipos de células (SHARON & LIS, 2004). Em estudos anteriores, já havia sido demonstrado também, que as lectinas de abrina e a crotina possuíam ação antigênica (KENNEDY *et al.*, 1995).

Recentemente, as lectinas de plantas estão sendo amplamente utilizadas como ferramentas biotecnológicas essenciais para os estudos científicos, tendo em vista relatos que comprovam cada vez mais a eficiência dos papéis importantes desempenhados por estas proteínas, nas quais suas funções biológicas estão ligadas diretamente com suas propriedades estruturais diferenciadas e sua habilidade intrínseca em reconhecer e ligar-se especificamente a carboidratos.

1.2. Características gerais das lectinas de plantas

Lectinas são consideradas um grupo heterogêneo de proteínas vegetais que se distinguem em suas estruturas, entre os sítios de ligação a carboidratos, organização molecular e no tamanho (CAMACHO, 2007). São constituídas por cadeias ricas em aminoácidos e hidroxilas estando associadas por pontes de hidrogênio, algumas por pontes dissulfetos e por interações hidrofóbicas (KENNEDY *et al.*, 1995; RUDIGER & GABUIS, 1993).

Geralmente, grande parte das lectinas de plantas é obtida de sementes, principalmente de espécies pertencentes à família das leguminosas. Estas proteínas representam cerca de 10% das proteínas totais que constitui as sementes, em contrapartida, ao serem extraídas e isoladas, sua quantidade é relativamente pequena chegando a variar entre 0,1 – 1% do total de proteínas lectínicas (LORIS, 2002; SHARON & LIS, 2004).

São amplamente distribuídas no reino vegetal e constituindo principalmente as famílias Leguminosae, Algae, Euphorbiaceae, Gramineae, dentre outras. A família Leguminosae compreende a maior parte de lectinas extraídas e isoladas, principalmente, as de sementes (SHARON, 1993; LORIS *et al.*, 1998), visto que, também são encontradas em outros tecidos vegetais, tais como folhas (RATANAPO *et al.*, 2001), raízes (PEUMANS *et al.*, 1997; VAN DAMME *et al.*, 1997), tubérculos (SUSEELAN *et al.*, 2002) e frutos (SAMPIETRO *et al.*, 2001).

1.3. Classificação estrutural das lectinas de plantas

As lectinas vegetais são classificadas considerando suas habilidades de reconhecimento e especificidade de ligação de maneira reversível aos carboidratos e seus aspectos estruturais, logo, são divididos em: merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas (VAN DAMME *et al.*, 1998) (Figura 1).

1.3.1. Merolectinas

São lectinas que contém apenas um domínio ligante a carboidrato, sendo incapazes de aglutinar eritrócitos ou precipitar glicoconjugados, visto que, são monovalentes. Exemplo: *Hevea brasiliensis* (VAN PARIJS *et al.*, 1991).

1.3.2. Hololectinas

São proteínas que possuem dois ou mais domínios que interagem com carboidratos iguais ou similares. Podendo ser divalentes ou multivalentes têm a capacidade de aglutinar celular e precipitar glicoconjugados. Exemplo: Maioria das lectinas compreende esta classe, entre elas, as espécies da subtribo Diocleinae (CAVADA *et al.*, 2001).

1.3.3. Superlectinas

É considerada uma classe de hololectinas que possuem, no mínimo, dois domínios ligantes a carboidratos. Entretanto, estes domínios diferentes das hololectinas, não são iguais e nem similares resultando no reconhecimento de carboidratos diferentes em sua estrutura. Exemplo: lectina do bulbo de tulipa que apresentam dois domínios de ligação a açúcar, a manose e *N*-acetilgalactosamina (VAN DAMME *et al.*, 1996).

1.3.4. Quimerolectinas

Proteínas com um domínio ligante a carboidrato que está associado a outro domínio catalítico ou atividade biológica distinta atuando independente do domínio de ligação de açúcares. De acordo com o número de domínios ligantes de carboidratos, esta classe de lectinas pode ser considerada como merolecinas ou hololectinas. Exemplo: Ricina (PEUMANS; VAN DAMME, 1998).

De acordo com as afinidades estruturais e características evolutivas das lectinas vegetais, podem ser classificadas em sete famílias, são elas: lectinas ligantes a quitina compostas de domínios de heveína, proteínas inativadoras de ribossomos tipo II (RIP -2), lectinas relacionadas à jacalina, lectinas de leguminosas, lectinas de monocotiledôneas ligante de manose, lectinas de Amaranthaceae e lectina de Cucurbitaceae (VAN DAMME *et al.*, 2004).

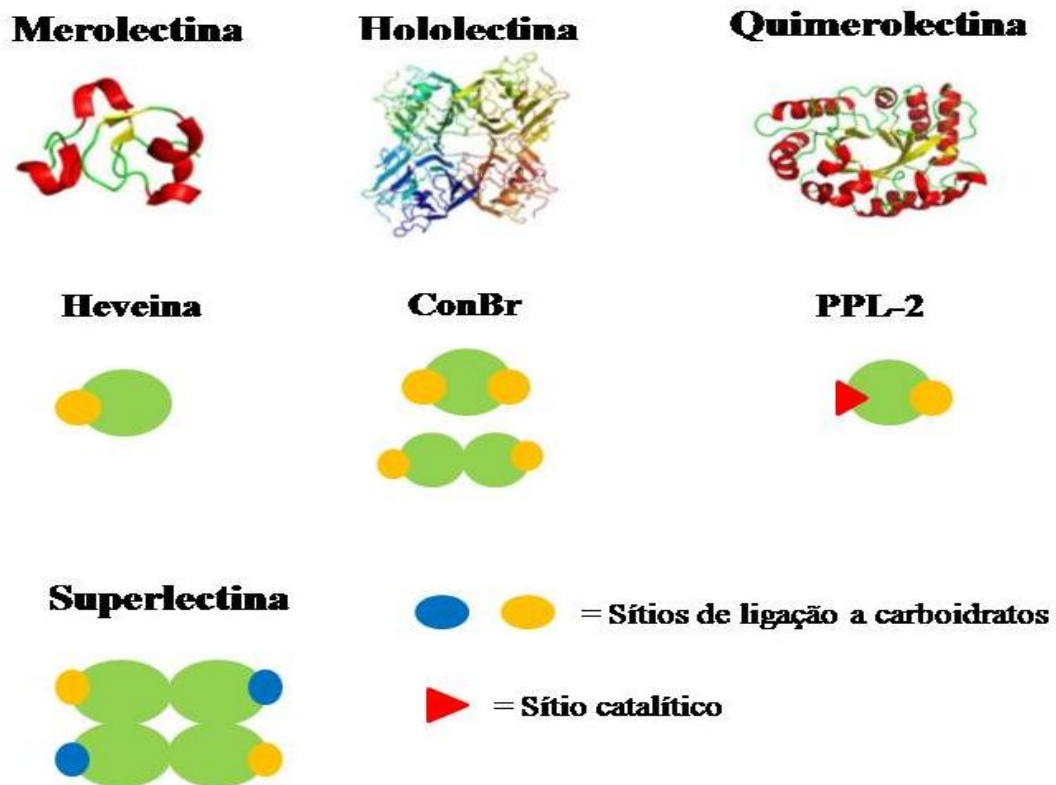


Figura 1. Classificação estrutural das lectinas de plantas. Esquemática de Merolectinas (Heveína); Hololectinas (ConBr); Quimerolectinas (PPL-2) e Superlectinas, estas últimas não possuem estrutura tridimensional ilustrada na literatura. Adaptado de Peumans & Van Damme, 1999.

1.4. Lectinas de leguminosas

Atualmente, uma variedade de lectinas vegetais já foram isoladas e caracterizadas, principalmente lectinas que são encontradas exclusivamente em sementes de espécies que pertencem à família Leguminosae (SHARON & LIS, 1990; VAN DAMME *et al.*, 1998).

A família Leguminosae é um dos principais grupos de angiospermas com aproximadamente 20.000 espécies de plantas. Apresenta três subfamílias muito distintas (Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae), 36 tribos e aproximadamente 727 gêneros (MOURÃO; KARAM; SILVA, 2011). No Brasil, é considerada uma das mais diversas e abundantes famílias de plantas superiores (LEWIS *et al.*, 2005), abrangendo cerca de 212 gêneros e 2.729 espécies estando presente em todos os biomas brasileiros (LIMA *et al.*, 2014) além de possuir uma grande importância econômica, principalmente no setor farmacológico, medicinal, industrial, entre outros (MOURÃO; KARAM; SILVA, 2011).

A maioria das lectinas de leguminosas são glicoproteínas, sendo bastante distintas em relação à sua especificidade de ligação a carboidratos, em suas funções e atividades biológicas, entretanto apresentam um alto grau de similaridade estrutural. São estruturalmente constituídas por uma única cadeia polipeptídica com aproximadamente 250 aminoácidos, podendo ser compostas por duas ou quatro subunidades, idênticas ou pouco diferentes, com pesos moleculares que variam de 25 a 30 kDa. As subunidades interagem por meio de ligações não covalentes, tais como: pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e eletrostáticas (SHARON & LIS, 1990; SHARON & LIS, 2002).

Em suas subunidades, estas lectinas apresentam os íons Ca^{2+} e Mn^{2+} que são essenciais para a atividade de ligação ao carboidrato, ou seja, estes íons além de estabilizarem o domínio de ligação ao carboidrato, também fixam as posições dos aminoácidos que interagem com os carboidratos ligantes sem alterar a estrutura dos mesmos (WEIS & DRICKAMER, 1996).

1.5. Lectinas da subfamília Caesalpinioideae

As lectinas de leguminosas são as mais estudadas atualmente entre as lectinas vegetais. Dentre as subfamílias, a Caesalpinioideae é um grupo parafilético das principais filogenias inseridas na família das leguminosas (DOYLE *et al.*, 2000). Um grande número de lectinas da família Leguminosae já foram isoladas e caracterizadas, porém, as proteínas lectínicas da subfamília Caesalpinioideae ainda estão entre as poucas estudadas (SILVA *et al.*, 2014).

Esta subfamília é constituída de aproximadamente 163 gêneros e 2.250 espécies, presentes em regiões tropicais e subtropicais, principalmente na América do Sul, África e Ásia (LEWIS *et al.*, 2005). No Brasil, correspondem aproximadamente a 53 gêneros e 733 espécies que já foram catalogadas (LIMA *et al.*, 2014). Na literatura, a Caesalpinioideae está dividida em quatro tribos: Caesalpinieae, Cassieae, Cercideae e Detarieae (LEWIS *et al.*, 2005). Desta, a tribo Cercideae é considerada a mais distinta, tendo em vista que, o táxon com o maior número de lectinas isoladas e caracterizadas bioquimicamente pertencem ao gênero *Bauhinia* L. (SILVA *et al.*, 2014).

1.6. Considerações gerais sobre o gênero *Bauhinia*

O gênero *Bauhinia* pertence à família Leguminosae, estando inserida na subfamília Caesalpinioideae (DOYLE *et al.*, 2000). Este gênero que compreende a tribo Cercideae, é considerado o maior desta, sendo composto por árvores e arbustos de distribuição pantropical, apresenta cerca de 310 espécies organizadas em 22 seções e 30 séries (VAZ & TOZZI, 2005). No Brasil, são encontradas aproximadamente 98 espécies nativas desse táxon e devido à forma de suas folhas, é conhecido popularmente como Pata-de-vaca (CECHINEL FILHO, 2009; VAZ, 2001).

Além disso, as folhas, caules e raízes das plantas desse gênero, são comumente utilizados na preparação de chás e demais soluções fitoterápicas para o tratamento de diversas patologias, pois possuem em suas estruturas propriedades antibacterianas, antidiabéticas, entre outras (CECHINEL FILHO, 2000; SILVA & CECHINEL FILHO, 2002).

Atualmente, o interesse em estudar lectinas das espécies do gênero *Bauhinia* tem sido cada vez maior, uma vez que, os primeiros estudos com este gênero têm aprovado as suas propriedades terapêuticas que já foram relatadas. No Brasil, as espécies mais estudadas fitoquimicamente são: *B. forficata*, *B. purpurea*, *B. splendens*, *B. candicans*, *B. manca* e *B. uruguayensis*, pois uma variedade de composto de interesse medicinal já foram isolados e identificados de folhas e sementes destas espécies, tais como as lactonas, flavonoides, esteroides, taninos, quinonas (SILVA & CECHINEL FILHO, 2002). Embora, ainda não há relatos na literatura relacionados às lectinas da espécie *B. pulchella* (**figura 2**) abordada no presente estudo.

Ademais, algumas espécies têm demonstrado atividades biológicas importantes, por exemplo, a lectina das sementes de *B. unguolata* possui atividade antifúngica contra espécies fitopatogênicas (SILVA *et al.*, 2014). Já a lectina de *B. forficata* é atualmente a única lectina desse gênero que apresenta propriedades anticoagulantes e inibe a agregação de plaquetas (SILVA *et al.*, 2012). Portanto, estas e outras propriedades que estas lectinas vegetais apresentam são consideradas ferramentas relevantes para aplicações terapêuticas e biotecnológicas.



Figura 2. Fotos de *Bauhinia pulchella* Benth. (A) Sementes (B) Exsicata.
Fonte: FERREIRA, N. M.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Este estudo teve como objetivo extrair e caracterizar parcialmente a lectina de sementes de *Bauhinia pulchella* Benth.

2.2. Objetivos específicos

- Extrair uma lectina de sementes de *B. pulchella*;
- Determinar qual o melhor tampão para extração;
- Determinar o título da atividade hemaglutinante;
- Avaliar a interferência do tratamento proteolítico na atividade hemaglutinante nos diferentes tipos de hemácias;
- Caracterizar a lectina quanto à sua especificidade aos carboidratos;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Preparação da farinha

Para obtenção da farinha, as sementes maduras de *B. pulchella* coletas no Centro de Ciências Agrárias e Ambientais – UFMA localizado na cidade de Chapadinha – MA, foram trituradas em moinho elétrico. Posteriormente, a farinha de textura fina foi armazenada em frascos fechados para futura utilização.

3.2. Extração de proteínas

As proteínas presentes nas sementes de *B. pulchella* foram extraídas em três tipos de soluções de tamponamento diferentes, sendo: tampão 1: TRIS-HCl 0,1 M pH 7,6 contendo NaCl 0,15 M; tampão 2: Glicina 0,1 M pH 2,6 contendo NaCl 0,15 M e no tampão 3: Glicina 0,1 M pH 9,0 contendo NaCl 0,15 M, na proporção de 1:10 (m/v). Em seguida, a mistura foi mantida sob constante agitação por 4 h a temperatura ambiente e centrifugada a 1.500 rpm durante 5 min. Assim obteve-se um sobrenadante denominado de extrato bruto e um precipitado que foi descartado. Posteriormente, foram reservadas amostras do sobrenadante para serem utilizadas nos testes de atividade hemaglutinante e de inibição da atividade hemaglutinante por especificidade a carboidratos.

3.3. Tratamento dos eritrócitos

As amostras de sangue humano dos tipos sanguíneos A, B e O e de coelhos foram coletadas no Centro de Hemoterapia e Hematologia do Maranhão – HEMOMAR e no Biotério do Laboratório de Biologia Estrutural e Molecular, no Centro de Ciências Agrárias e Ambientais da UFMA, respectivamente. As amostras foram lavadas adicionando-se solução de NaCl 0,15 M e, em seguida, centrifugadas a 1.500 rpm durante 5 minutos, descartando o sobrenadante. Esse procedimento foi realizado por nove vezes, ou até que o sobrenadante restante da centrifugação se tornasse completamente límpido. Os eritrócitos obtidos desse procedimento foram utilizados na preparação de eritrócitos normal à 3% e também, na preparação de eritrócitos à 3% tratados com enzimas proteolíticas (papaína ou tripsina),

sendo então, conservados e, posteriormente, utilizados nos testes de atividade hemaglutinante e inibição da atividade por especificidade a carboidratos.

3.4. Atividade hemaglutinante

O teste de atividade hemaglutinante foi realizado nos extratos brutos seguindo o método descrito por Moreira & Perrone (1977), utilizando-se os eritrócitos humanos a 3% (A, B e O) e de coelho a 3% ambos tratados com papaína e tripsina.

Os testes foram feitos em triplicatas nas placas de microtitulação com poços de fundo V. Cada poço foi preenchido com 50 μ L de solução TRIS-HCl 0,1 M contendo NaCl 0,15 M com pH 7,6. Em seguida, foi acrescentado 50 μ L do extrato bruto, sendo este diluído seriadamente, com homogeneização e transferência de 50 μ L para o próximo poço até o penúltimo, e no último poço foram descartados os 50 μ L referentes a este poço, restando um total de 100 μ L de solução. Posterior as diluições, foram adicionados 50 μ L de eritrócitos a 3% (normal e tratados com enzimas). A placa foi mantida em incubação a 37 °C por 30 min e em repouso por mais 30 min a temperatura ambiente.

Para calcular os títulos da atividade hemaglutinante foi utilizado a seguinte equação: $U.H. = 2^n$; onde “n” representa o número do último poço da diluição que seria possível detectar a aglutinação dos eritrócitos e “U.H” = unidade hemaglutinante.

3.5. Especificidade por carboidratos

Os testes de inibição da atividade hemaglutinante por especificidade a carboidratos foram realizados utilizando soluções de açúcares na concentração de 0,1 M seguindo a adaptação do protocolo descrito por Ramos e colaboradores (1996). Os açúcares utilizados neste procedimento foram: D-glicose, D-manose, D-galactose, α -Lactose, β -Lactose, D-fucose, L-rhaminose, N-acetil glicosamina.

Os procedimentos foram realizados em triplicatas nas placas de microtitulação, nos quais foram acrescentados em cada poço 50 μ L de TRIS-HCl 0,1 M contendo NaCl 0,15 M em pH 7,6. Em seguida, foram adicionados 50 μ L das soluções de açúcar em cada poço correspondente a ele, sendo diluídos seriadamente até o último poço. Posteriormente,

acrescentou-se 50 μ L das amostras do extrato bruto das sementes em cada poço até o último, incubando-os a 37 °C por 1 hora.

Decorrido o período de incubação, adicionou-se 50 μ L de solução de eritrócitos a 3% de humanos ou de coelho e incubou-se a 37 °C por mais 1 hora para que as proteínas pudessem interagir com os açúcares. Passado o tempo, realizou-se uma leitura para detectar se houve ou não a inibição da atividade hemaglutinante. Os títulos da inibição da A.H foram medidos em termos de U.I. (Unidade de Inibição) observando como a concentração de proteínas restantes no ultimo poço de uma diluição seriada causaram a inibição da atividade hemaglutinante.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Estudo da atividade hemaglutinante

Na tentativa de identificar a presença de lectina nas sementes de *B. pulchella*, observou-se que a melhor solução tampão de extração protéica foi o TRIS-HCl 0,1 M contendo NaCl 0,15 M em pH 7,6, pois o extrato bruto preparado com esse tampão apresentou melhor atividade hemaglutinante. Esse resultado foi semelhante àqueles obtidos para lectinas de *B. cheilantha* (CRUZ, 2015), *B. variegata* (PINTO *et al.*, 2008) e *B. unguata* (SILVA *et al.*, 2014) que apresentaram uma maior atividade hemaglutinante em solução tampão com valores de pH neutro (TRIS-HCl 0,1 M contendo NaCl 0,15 M em pH 7,6).

Em relação aos eritrócitos de coelho a 3% tratados com enzimas proteolíticas (tripsina e papaína), após 1 hora de incubação foi detectada visualmente no extrato bruto uma rede de hemácias nos poços da placa de microtitulação, indicando maior eficiência da lectina em aglutinar hemácias anteriormente tratadas com proteases, sendo que os eritrócitos tratados com papaína mostraram fortemente uma maior aglutinação e título de A.H (**Figura 3**).

É importante ressaltar que o tratamento dos eritrócitos com as enzimas proteolíticas (tripsina e papaína) torna a interação da lectina com o sítio de ligação mais eficiente ocasionando um aumento no título da atividade hemaglutinante, visto que, estas enzimas propiciam a clivagem das proteínas que possam impedir ou bloquear a ligação das lectinas aos carboidratos presentes na superfície celular das hemácias (NAGANO *et al.*, 2002).

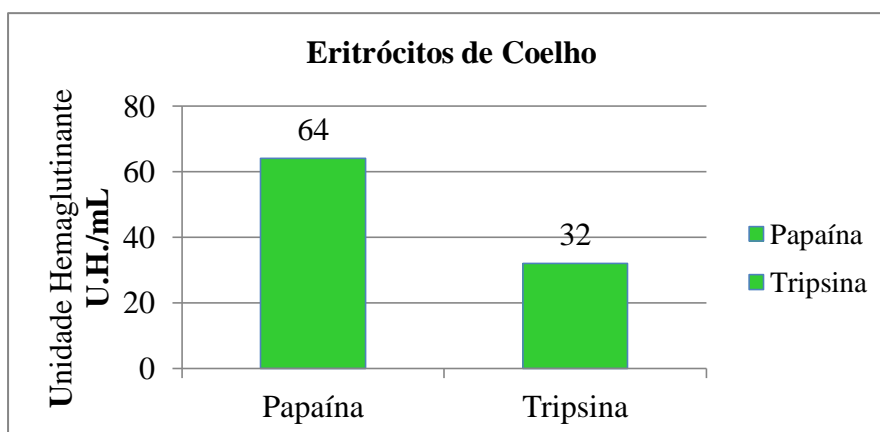


Figura 3. Gráfico da atividade hemaglutinante do extrato bruto de *B. pulchella*. Resultados dos testes de hemaglutinação com eritrócitos de coelho tratados com tripsina (32 U.H.) e papaína (64 U.H.).

Após 12 horas de repouso em temperatura ambiente, os demais resultados nas diferentes soluções de tamponamento utilizadas para a extração da proteína mostraram que a lectina de semente de *B. pulchella* aglutinou eritrócitos humanos de tipo sanguíneo B e O, entretanto, em solução tampão com Glicina 0,1 M + NaCl 0,15 M em pH 9,0.

Quando interagem com glicoconjugados, no caso das hemácias, as lectinas promovem a formação de ligações entre a superfície de células adjacentes através de pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas, entre outras, acarretando na aglutinação das mesmas (PEUMANS & VAN DAMME, 1995). Deste modo, esta característica típica das lectinas, foi utilizada para a identificação da presença da mesma em sementes de *B. pulchella*.

O termo aglutinação refere-se ao resultado da interação entre os açúcares existente na superfície celular com os sítios de ligação para os mesmos presentes nas lectinas (SINGH *et al.*, 1999). Logo, através da atividade hemaglutinante do extrato bruto foi possível detectar claramente a ocorrência de aglutinação de eritrócitos de coelho a 3% tratados com enzimas proteolíticas (tripsina e papaína) após duas horas de incubação. Além disso, foi possível observar fracamente a aglutinação de eritrócitos humanos do tipo B e O após 12 horas de incubação.

4.2. Estudo da inibição por especificidade a carboidratos

A determinação da especificidade por carboidratos foi realizada por meio da inibição da atividade hemaglutinante, onde se observou que a lectina de sementes de *B. pulchella* foi inibida por Galactose, α -Lactose e β -Lactose, porém, não apresentando ação inibitória pelos demais açúcares testados (**Tabela 1**).

Para os testes de inibição da atividade hemaglutinante foram utilizados eritrócitos de coelho a 3% tratados com tripsina. Dentre os açúcares testados, a ação inibitória mais eficiente na atividade hemaglutinante foi mostrada pelo açúcar β -Lactose, onde este apresentou uma concentração inibitória mínima de 1,56 mM (**Tabela 1**).

Os testes de inibição da atividade hemaglutinante por especificidade a carboidratos confirmam a presença da lectina como responsável pela aglutinação de células. Contudo, somente os testes de hemaglutinação não podem ser considerados conclusivos na detecção de lectinas, visto que há compostos que apresentam atividade de precipitação e

aglutinação de células semelhantes a estas proteínas, tais como: taninos, substâncias catiônicas, cátions divalentes em altas concentrações, alguns lipídios, entre outros (TRINDADE, 2005).

Tabela 1. Inibição da atividade hemaglutinante de lectinas de sementes de *B. pulchella* por especificidade a carboidratos.

Açúcar	Concentração (mM)*
D-glicose	NI**
D-manose	NI
D-galactose	3,12
D-fucose	NI
L-rhaminose	NI
N-acetil glicosamina	NI
β-Lactose	1,56
α-Lactose	3,12

*Concentração mínima requerida para inibição da atividade hemaglutinante.

**Açúcar não inibidor a 100 mM de concentração.

É bem documentado que a especificidade de reconhecimento e ligação a galactose é uma característica de lectinas extraídas e isoladas a partir das espécies do gênero *Bauhinia*, tais como: *B. variegata* (PINTO *et al.*, 2008), *B. bauhinioides* (SILVA *et al.*, 2011) e *B. monandra* (MACEDO *et al.*, 2007), tendo em vista que grande parte das lectinas isoladas do gênero *Bauhinia* são ligantes provenientes de galactose. Deste modo, estas hololectinas que possuem afinidade por galactose não são capazes de ligar-se à manose ou glicose.

O estudo da inibição por carboidratos foi considerado uma etapa de extrema importância, uma vez que, os resultados obtidos servirão de auxílio para estudos posteriores a respeito da lectina de sementes de *B. pulchella*.

5. CONCLUSÃO

As sementes de leguminosa da espécie *B. pulchella* nos permitiu identificar uma lectina que evidenciou afinidade por eritrócitos de coelhos tratados com enzimas proteolíticas e suposta afinidade por eritrócitos do sistema ABO humano apresentando títulos de hemaglutinação variáveis quando testados. Além disso, foi possível detectar a especificidade desta lectina em reconhecer e ligar-se a moléculas de β -lactose. Tais informações são bastante relevantes, visto que, ainda não há estudos referenciados na literatura relacionados às lectinas extraídas e isoladas de sementes de *B. pulchella*.

Outras perspectivas de estudo para esta lectina a respeito de suas propriedades físico-químicas seriam a purificação, seqüenciamento e elucidação da estrutura primária e terciária e, dessa maneira possibilitando compreender o seu mecanismo de ação e aplicação biológica fornecendo dados relevantes para utilização desta e de outras lectinas vegetais do gênero *Bauhinia* como ferramentas biotecnológicas necessárias para a ciência.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ASSREUY, A. M. S.; SHIBUYA, M. D.; MARTINS, G. J.; DE SOUZA, M. L. P.; CAVADA, B. S.; MOREIRA, R. A.; OLIVEIRA, J. A.; RIBEIRO, R. A.; FLORES, C. A.; **Anti-inflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from Brazilian beans.** Mediators of Inflammation, Inglaterra, v. 6, p. 201-210, 1997.

BARBOSA, T.; ARRUDA, S.; CAVADA, B.; GRANGEIRO, T. B.; FREITAS, L. A. R. and BARRAL-NETTO, M. **In Vivo Lymphocyte Activation and Apoptosis by lectins of the Diocleinae Subtribe.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 5, p. 673-678, 2001.

BENETEAU, J.; RENARD, D.; MARCHÉ, L.; DOUVILLE, E.; LAVENANT, L.; RAHBÉ, Y.; DUPONT, D.; VILAINE, F.; DINANT, S. **Binding properties of the N-acetylglucosamine and high-mannose N-glycan PP2-A1 phloem lectin in Arabidopsis.** Plant Physiol, v. 3, p. 1345-1361, 2010.

BENJAMIN, C. F.; FIGUEIREDO, R. C.; HENRIQUES, M. G. M. O.; BARJA-FIDALGO, C. **Inflammatory and anti-inflammatory effects os soybean agglutinin.** Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v. 30, p. 873-881, 1997.

CAMACHO, N.N. Expressão **heteróloga da lectina de *Bauhinia forficata* Link em *Escherichia coli* e efeito sobre linhagens celulares tumorais.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pelotas, 2007.

CAVADA, B. S.; BARBOSA, T.; ARRUDA, S.; GRANGEIRO, T. B.; BARRAL NETTO, M. **Revisiting proteus: Do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potencial biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins.** Current Protein and Peptide Sciences, v. 2, p. 123-135, 2001.

CECHINEL FILHO, V. **Principais avanços e perspectivas na área de produtos naturais ativos: Estudos desenvolvidos no NIQFAR/UNIVALI.** Quimica Nova, v. 23, p. 680-685, 2000.

CECHINEL FILHO, V. **Chemical composition and biological potential of plants from the genus *Bauhinia*.** Phytother, p.1347-1354, 2009.

CRUZ, D. R. R. **Isolamento, purificação e caracterização parcial da lectina de folhas de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel, nativa do bioma caatinga.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Vale do São Francisco, 2015.

DOYLE, J. J.; CHAPPILL, J. A.; BAILEY, C. D.; KAJITA, T. **Towards a comprehensive phylogeny of legumes: evidence from rbcL sequences and nonmolecular data.** In: HERENDEEN, P. S.; BRUNEAU, A. (Ed.). Advances in legume systematics. Kew: The Royal Botanic Gardens, p. 1-20, 2000.

FERNANDES, A. V.; RAMOS, M. V.; GONÇALVES, J. F. C.; MARANHÃO, P. A. C.; CHEVREUIL, L. R.; SOUZA, L. A. G. **Seeds of Amazonian Fabaceae as a source of new lectins.** Braz. J. Plant Physiol, v. 23, p. 237-244, 2011.

FREIRE, M. G. M.; DE SOUZA, I. A.; SILVA, A. C. M.; MACEDO, M. L. R.; LIMA, M. S.; TAMASHIRO, W. M. S. C.; ANTUNES, E.; MARANGONI, S. **Inflammatory responses induced in mice by lectin from *Talisia esculenta* seeds.** Toxicon, v. 42, p. 275-280, 2003.

GABIUS, H. J.; GABIUS, S. Glycoscience. **Status and Perspectives.** Chapman & Hall, Weinheim, Germany. 1997.

HAN, C. H.; LIU, Q. H.; NG, T. B.; WANG, H. X. **A novel homodimeric lactose-binding lectin from the edible split Gill medicinal mushroom *Schizophyllum commune*.** Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 14, p. 336. 2005.

IMBERT, A.; WIMMEROVÁ, M.; MITCHELL, E. P.; GILBOA-GARBER, N. **Structures of the lectins from *Pseudomonas aeruginosa*: insights into the molecular basis for host glycan recognition.** Microbes and Infection, v. 6, p. 221-228, 2004.

KAUR, M.; SINGH, K.; RUP, P. J.; SAXENA, A. K.; KHAN, R. H.; ASHRAF, M. T.; KAMBOJ, S. S.; SINGH, J. **A tuber lectin from *Arisaema hellebifolium* Schott with antiinsect activity against melon fruit fly, *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) and anti-cancer effect on human cancer cell.** Archives of Biochemistry and Biophysics, v. 445, p. 156-165, 2006.

KAUR, A.; SINGH, J.; KAMBOJ, S. S.; SAXENA, A. K.; PANDITA, R. M.; SHAMNUGAVEL, M. **Isolation of an N-acetyl-D-glucosamine specific lectin from the rhizomes of *Arundo donax* with antiproliferative activity.** Phytochemistry, v. 66, p. 16, 2005.

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

LANNOO, N.; VAN DAMME, E. J. **Nucleocytoplasmic plant lectins.** Biochemistry and Biophysics Acta, v.1800, p. 190-201, 2010.

LEITE, Y. F. M. M.; SILVA, L. M. C. M.; AMORIM, R. C. N.; FREIRE, E.A.; MELO, J. D. M.; GRANGEIRO, T. B.; BENEVIDES, N. M. B. **Purification of a lectin from the marine red alga *Gracilaria ornata* and its effect on the development of the cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae).** Biochimica et Biophysica Acta, v. 1724, p. 137-145, 2005.

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

LIMA, M. E. P.; CARNEIRO, M. E.; NASCIMENTO, A. E.; GRANGEIRO, T. B.; HOLANDA, M. L.; AMORIM, R. C. N. AND BENEVIDES, N. M. B. **Purification of a Lectin from the Marine Red Alga *Gracilaria cornea* and Its Effects on the Cattle Tick**

***Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae).** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 53, p. 6414-6419, 2005.

LIMA, H. C. de; PINTO, R. B. *Hymenaea* In. **Lista de Espécies da Flora de Brasil.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2014. Disponível em: <[HTTP://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB22971](http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB22971)> Acesso em 15 de dez de 2016.

LIS, H.; SHARON, N. **Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition.** Chem. Ver, v. 98, p. 637-674, 1998.

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

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

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

MOLINA, M. C.; VINCENTE, C. **Correlations between enzymatic activity of lectins, putrescine content and chloroplast damage in *Xanthoria parietina* phycobionts.** Cell Communication and Adhesion, v. 3, p. 1-12, 1995.

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

MOURA, R. M.; QUEIROZ, A. F. S.; FOOK, J. M.; DIAS, A. S.; MONTEIRO, N. K.; RIBEIRO, J. K.; MOURA, G. E.; MACEDO, L. L.; SANTOS, E. A.; SALES, M. P. **CvL, a lectin from the marine sponge *Cliona varians*: Isolation, characterization and its effects on pathogenic bacteria and *Leishmania promastigotes*.** Comparative Biochemistry and Physiology A, v. 145, p. 517-523, 2006.

MOURÃO, S. A.; KARAM, D.; SILVA, J. A. A. **Uso de Leguminosas no Semiárido Mineiro.** 91 p.: il. (Documentos / Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1518-4277; 135), 2011.

NAGANO, C. S.; MORENO, F. B. M. B.; BLOCH JUNIOR, C.; PRATES, M. V.; CALVETE, J. J.; SAKER-SAMPAIO, S.; FARIAS, W. R. L.; TAVARES, T. D.; NASCIMENTO, K. S.; GRANGEIRO, T. B.; CAVADA, B. S.; SAMPAIO, A. H. **Purification and characterization of a new lectin from the red marine alga *Hypnea musciformis*.** Protein and Peptide Letters, p. 159-165, 2002.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. **Lectins as plant defense proteins.** Plant Physiology, v. 109, p. 347-352, 1995.

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

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. **Plant lectins: versatile proteins with important perspectives in biotechnology**. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, v.15, p.199-228, 1998.

PINTO, L. S.; NAGANO, C. S.; OLIVEIRA, T. M.; MOURA, T. R.; SAMPAIO, A. H.; DEBRAY, H.; PINTO, V. P.; DELLAGOSTIN, O. A.; CAVADA, B. S. **Purification and molecular cloning of a new galactose-specific lectin from *Bauhinia variegata* seeds**. *J. Biosc.*, v. 33, p. 355-363, 2008.

PUSZTAI, A. **Plant Lectins**. Cambridge University Press, 1991.

RAMOS, M. V.; MOREIRA, R. A.; CAVADA, B. S.; OLIVEIRA, J. T. A.; ROUGE, P. **Interaction of lectins from the sub tribe Diocleinae with specific ligands**. *R. Bras. Fisiol. Veg.*, v. 8, p. 193-199, 1996.

RAMOS, M. V.; SAMPAIO, A. H.; CAVADA, B. S.; CALVETE, J. J.; GRANGEIRO, T. B.; DEBRAY, H. **Characterization of the sugar-binding specificity of the toxic lectins isolated from *Abrus pulchellus* seeds**. *Glycoconjugate journal*, v. 18, p. 391-400, 2002.

RATANAPO, S.; NGAMJUNYAPORN, W.; CHULAVATNATOL, M. **Interaction of a mulberry leaf lectin with a phytopathogenic bacterium, *P. syringae* PV mori**. *Plant Science*, v. 160, p. 739-744, 2001.

RUDIGER, H.; GABIUS, H. **Lectinologie: Geschichte, konzepte und pharmazeutische bedeutung**. *Deutsche Apotheker Zeitung*, v. 133, p. 15-36, 1993.

SÁ, R. A.; NAPOLEÃO, T. H.; SANTOS, N. D. L.; GOMES, F. S.; ALBUQUERQUE, A. C.; XAVIER, H. S.; COELHO, L. C. B. B.; BIEBER, L. W.; PAIVA, P. M. G. **Induction of mortality on *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae) by *Myracrodruon urundeuva* heartwood lectin**. *International Biodeterioration and Biodegradation*, v. 62, p. 460-464, 2008.

SAMPIETRO, A. R.; ISLÃ, M. I.; QUIROGA, E. N.; VATTUONE, M. A. **An N-acetylglucosamine oligomer binding agglutinin (lectin) from ripe *Cyphomandra betacea* Sendt**. *Fruits. Plant Science*, v. 160, p. 659-667, 2001.

SHARON, N.; LIS, H. **Legume lectins – a large family of homologous proteins**. *FASEB Journal*, v. 14, p. 3198-3208, 1990.

SHARON, N.; LIS, H. **How proteins bind carbohydrates: lessons from legume lectins**. *J. Agric. Food. Chem.*, v. 50, p. 6586-6591, 2002.

SHARON, N. **Lectins- carbohydrates complexes of plants and animals**. *Nature*, Trends Biochem. Science, v. 18, p. 221-226, 1993.

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

SILVA, H. C.; PINTO, L. S.; TEIXEIRA, E. H.; NASCIMENTO, K. S.; CAVADA, B. S.; SILVA, A. L. C. **BUL: A novel lectin from *Bauhinia unguolata* L. seeds with fungistatic and antiproliferative activities.** Process Biochemistry, v. 49, p. 203-209, 2014.

SILVA, K. L.; CECHINEL FILHO, V. **Plantas do gênero *Bauhinia*: composição química e potencial farmacológico.** Quimica Nova, v. 25, p. 449-454, 2002.

SILVA, M. C.; CORRÊA, A. D.; SANTOS, C. D.; MARCOS, F. C. A.; ABREU, C. M. P. **Extração da lectina da folha de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e o efeito de cátions divalentes na atividade hemaglutinante.** Ciência e Tecnologia de Alimentos, p. 103-107, 2010.

SILVA, H. C.; BARI, A. U., PEREIRA-JÚNIOR, 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. **Purification and partial characterization of a new pro-inflammatory lectin from *Bauhinia bauhinioides* Mart (Caesalpinoideae) seeds.** Protein Pept Lett, v. 18, p. 396-402, 2011.

SILVA, M. C. C.; SANTANA, L. A.; MENTELE, R.; FERREIRA, R. S.; MIRANDA, A.; SILVA-LUCCA, R. A.; SAMPAIO, M. U.; CORREIA, M. T. S.; OLIVA, M. L.V. **Purification, primary structure and potential functions of a novel lectin from *Bauhinia forficata* seeds.** Process Biochemistry, v. 47, p. 1049-1059, 2012.

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

SOUZA, J. D.; SILVA, M. B. R.; ARGOLO, A. C. C.; NAPOLEÃO, T. H.; SÁ, R. A.; CORREIRA, M. T. S.; PAIVA, P. M. G.; SILVA, M. D. C.; COELHO, L. C. B. B. **A new *Bauhinia monandra* galactose-specific lectin purified in milligram quantities from secondary roots with antifungal and termiticidal activities.** International Biodeterioration & Biodegradation, v. 65, p. 696-702, 2011.

SUSEELAN, K. N.; MITRA, R.; PANDEY, R.; SAINIS, K. B.; AND KRISHNA, T. G. **Purification and characterization of a lectin from wild sunflower (*Helianthus tuberosus* L.) tubers.** Archives of Biochemistry and Biophysics, v. 407, p. 241-247, 2002.

TRINDADE, M. B. **Purificação, caracterização e estudos estruturais de duas novas lectinas ligantes de quitina das sementes do gênero *Artocarpus*.** Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, 2005.

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

VAN DAMME, E. J. M.; GOUSSAERT, S.; CHARELS, D.; GOLDSTEIN, I. J.; PEUMANS, W. J. **The mannose/maltose-specific Convolvulaceae lectins.** European Journal of Cell Biology, v. 74, p. 7, 1997.

VAN DAMME, E. J. M.; PEUMANS, W. J.; BARRE, A.; ROUGE, P. **Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles.** Crit. Rev. Plant. Sci, v. 17, p. 575-692, 1998.

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

VAN DAMME, E. J. M.; BARRE, A.; ROUPÉ, P.; PEUMANS, W. J. **Cytoplasmic/nuclear plant lectins: a new story.** TRENDS in Plant Science, v. 9, p. 484-489, 2004.

VAZ, A. M. S. F.; TOZZI, A. M. G. A. **Sinopse de *Bauhinia* sect. *Pauletia* (Cav.) DC. (Leguminosae: Caesalpinioideae: Cercideae) no Brasil.** Revista Brasileira de Botânica, v. 28, p. 477-491, 2005.

VAZ, A. M. S. F. **Taxonomia de *Bauhinia* sect. *Pauletia* (Fabaceae Caesalpinioideae: Cercideae) no Brasil.** Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

WEIS, W. I.; DRICKAMER, K. **Structural basis of lectin-carbohydrate recognition.** Annu Ver. Biochem, v. 65, p. 441-473, 1996.

WONG, J. H.; NG, T. B. **Isolation and characterization of a glucose/mannose-specific lectin with stimulatory effect on nitric oxide production by macrophages from the emperor banana.** International Journal of Biochemistry and Cell Biology, v. 38, p. 234-243, 2005.