

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E AMBIENTAIS
COORDENAÇÃO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

VALDENICE FERREIRA DOS SANTOS

**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE UMA LECTINA DAS
SEMENTES DE *Camptosema rubicundum* HOOK. & ARN.**

Chapadilha-MA

2018

VALDENICE FERREIRA DOS SANTOS

**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE UMA LECTINA DAS
SEMENTES DE *Camptosema rubicundum* HOOK. & ARN.**

Monografia apresentada à Coordenação de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Maranhão do campus de Chapadinha, como requisito para obtenção do Título de Licenciada em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Claudener Souza
Teixeira

Chapadinha-MA

2018

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

Santos, Valdenice Ferreira dos.

Extração e caracterização parcial de uma lectina das sementes de *Camptosema rubicundum* HOOK. & ARN / Valdenice Ferreira dos Santos. - 2018.

39 p.

Orientador(a): Claudener Souza Teixeira.

Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Maranhão, Chapadinha/MA, 2018.

1. Atividade lectínica. 2. Caracterização físico-química. 3. Leguminosae. I. Teixeira, Claudener Souza. II. Título.

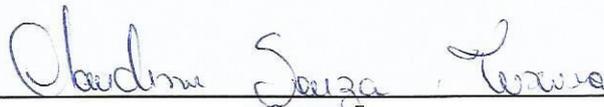
VALDENICE FERREIRA DOS SANTOS

**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE UMA LECTINA DAS
SEMENTES DE *Camptosema rubicundum* HOOK. & ARN.**

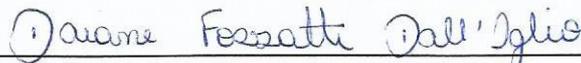
Aprovada em: 05 / 07 / 2018

Monografia apresentada à Coordenação de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Maranhão do campus de Chapadinha, como requisito para obtenção do Título de Licenciada em Ciências Biológicas.

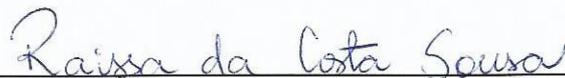
BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Claudener Souza Teixeira (Orientador)
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)



Profª. Msc. Daiane Fossatti Dall'Oglio (Examinadora)
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)



Raissa da Costa Sousa (Examinadora)
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)

À Deus, porque “DELE”, por “ELE” e para “ELE”
são todas as coisas (Rm 11.36), à minha mãe, Maria
Rosete, meu pai, Walter dos Santos por todo o
esforço, carinho e cuidado que me fizeram chegar
aqui, à meus irmãos Waldey e Walter Júnior.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me amar de uma forma inexplicável mesmo sem eu merecer, por me proporcionar a perfeita felicidade, por ser tudo em minha vida.

À toda a minha família, em especial meu pai Walter, minha mãe Maria Rosete, meus irmãos Waldey e Walter Júnior, por serem a minha base e por estarem sempre ao meu lado me inspirando e me incentivando a ir além das dificuldades.

À todas as pessoas do quilombo Piqui da Rampa, por me inspirarem a sair em busca de um sonho que pode parecer pouco para alguns, mas que para nós estava completamente distante. Não foi fácil, mas conseguimos e iremos muito além do que já foi conquistado.

Ao meu orientador Prof. Dr. Claudener Souza Teixeira, pela oportunidade, confiança, paciência e por todos os ensinamentos. Sou grata a Deus por ter me concedido a oportunidade lhe conhecer e poder seguir os seus passos.

Aos meus companheiros de laboratório, Rafael, Ana Lúcia, Karla, Renato, Nathália, Thaynara, Helena, Ana Larissa e professora Daniele, pela amizade e ajuda nos trabalhos.

Aos meus parentes e amigos da república “Família Unida”, Waldey, Vanderleia, Marcos Vinicius, Daiara e Edinando por estarem comigo desde o início buscando um mesmo objetivo.

Aos meus amigos de graduação, Gustavo, Raysse, Rayllander, Adna, Larissa, Tarcísio, Auriane, Laís, Leny, Hemily, Mirela, Jhon Paulo, Jaylane, Nayane, Karina, Darlene, Rosa, Almir, Wildson, Felipe e a todos que fazem parte dos mamíferos de luxo, pelo apoio nas lutas diárias da UFMA e por tudo que me proporcionaram.

Aos meus amigos e irmãos na fé que conheci em Chapadinha, em especial Kessia, Soelma, Ruby entre outros, agradeço pela amizade e por eu estar presente em suas orações.

Ao Laboratório de Produtos de Origem Animal (LAPOA) e à Professora Michelle Maia Parente.

À Profª. Msc. Daiane Fossatti Dall’Oglio e à Raissa da Costa Sousa por aceitarem compor a mesa da banca examinadora da minha monografia.

A todos os meus professores desde a educação básica até o ensino superior, por suas contribuições na minha formação.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho e para minha formação acadêmica e humana.

Muito obrigada!

Os que confiam no SENHOR serão como o monte Sião,
que não se abala, mas permanece para sempre.

(Salmos 125.1)

RESUMO

As lectinas constituem um grupo de proteínas ou glicoproteínas de origem não imunológica que apresentam no mínimo um domínio não catalítico que reconhecem e ligam-se reversivelmente a carboidratos. Entre as características mais peculiares das lectinas estão inclusas a capacidade de aglutinar células animais e/ou células vegetais e precipitar glicoconjugados. Este trabalho objetivou a identificação e caracterização parcial de uma lectina das sementes de *Camptosema rubicundum*, pertencente à família das leguminosas, subfamília Papilionoideae. Após a preparação da farinha a extração da lectina foi testada em solução salina de NaCl 0,15 M, além de 3 soluções tamponadas com pH 2,6, 7,6 e 9,0 ambas contendo NaCl 0,15 M, a eficiência das soluções de extração foi testada a partir de ensaios de atividade hemaglutinante usando eritrócitos de coelho nativos e tratados com as enzimas papaína e tripsina, além de eritrócitos humanos do sistema ABO, aliado a isso foi verificado o teor de proteínas solúveis em cada extrato afim de calcular a atividade específica da lectina. A especificidade à carboidratos foi observada através do teste de inibição da hemaglutinação, ensaios estes que nortearam a técnica de isolamento da lectina, foram testadas as resinas de agarose/manose, agarose/fetuína e sephadex G-50 e G-75. A caracterização físico-química se deteve na avaliação da dependência da lectina à efeitos da temperatura e pH. A extração mais eficiente foi em NaCl 0,15 M. A lectina apresentou atividade tanto para eritrócitos de coelho quanto para eritrócitos humanos, contudo o tratamento dos eritrócitos de coelhos com enzimas proteolíticas otimizou a hemaglutinação. Além disso, a ação da lectina foi inibida pelos carboidratos manose e α -metil-D-manopiranosídeo, além da glicoproteína fetuína, entretanto a mesma não foi purificada em resinas contendo os seus inibidores. A caracterização físico-química da lectina revelou que a mesma é termoestável e resistente a variações de pH na faixa de 5,0 a 10. Esse trabalho permitiu a identificação de uma nova lectina das sementes de *C rubicundum* e estudos posteriores na busca por mais características dessa lectina podem elucidar propriedades moleculares que poderão ser utilizadas como ferramenta biotecnológica a partir da interação proteína-carboidrato em diversos modelos celulares.

Palavras-chave: Atividade lectínica. Caracterização físico-química. Leguminosae

ABSTRACT

Lectins are a group of proteins or glycoproteins of non-immunological origin that have at least a non-catalytic domain that recognizes and binds reversibly to carbohydrates. Among the most peculiar characteristics of lectins are the ability to bind animal and / or plant cells and precipitate glycoconjugates. This work aimed at the identification and partial characterization of a lectin of the seeds of *Camptosema rubicundum* belonging to the legume family subfamily Papilionoideae. After preparation of the flour, the lectin extraction was tested in 0.15 M NaCl saline solution, in addition to 3 solutions buffered with pH 2.6, 7.6 and 9.0, both containing 0.15 M NaCl. The efficiency of extraction solutions was tested from hemagglutinating activity assays using native rabbit erythrocytes and treated with the enzymes papain and trypsin, in addition to human ABO system erythrocytes, the soluble protein content in each extract was verified in order to calculate the specific activity of the lectin. Carbohydrate specificity was observed through the hemagglutination inhibition test, these trials guided the lectin isolation technique, the agarose/mannose, agarose/fetuin and sephadex G-50 and G-75 resins were tested. The physico-chemical characterization stopped in the evaluation of lectin dependence to the effects of temperature and pH. The most efficient extraction was in 0.15 M NaCl. The lectin presented activity for both rabbit erythrocytes and human erythrocytes, however the treatment of rabbit erythrocytes with proteolytic enzymes optimized hemagglutination. In addition, lectin action was inhibited by mannose and α -methyl-D-mannopyranoside carbohydrates, besides the fetuin glycoprotein, however it was not purified on resins containing their inhibitors. The physico-chemical characterization of the lectin revealed that it is thermostable and resistant to variations in pH in the range of 5.0 to 10. This work allowed the identification of a new lectin of the seeds of *C. rubicundum* and further studies in the search for more characteristics of this lectin can elucidate molecular properties that could be used as a biotechnological tool from the protein-carbohydrate interaction in several cellular models.

Keywords: Lectin Activity. Physico-chemical Characterization. Leguminosae.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- A: interação entre a lectina e carboidratos da membrana dos eritrócitos. B: Ilustração da reversibilidade da ligação lectina-carboidratos.....	14
Figura 2 - Esquematização de Merolectinas (Heveína); Hololectinas (DVL); Quimerolectinas (DLL-II) e Superlectinas (Lectina de banana).....	17
Figura 3 - Flores de <i>Camptosema rubicundum</i>	19

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Teor de proteínas totais e atividade específica da lectina de <i>C. rubicundum</i>	27
Tabela 2 - Inibição da atividade hemaglutinante de lectinas de sementes de <i>C. rubicundum</i> por especificidade a carboidratos.....	28

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Título da atividade hemaglutinante da lectina de <i>C. rubicundum</i> para eritrócitos de coelho.....	25
Gráfico 2 - Título da atividade hemaglutinante da lectina de <i>C. rubicundum</i> para eritrócitos humanos no sistema ABO.....	26
Gráfico 3 - Cromatografia de afinidade em agarose/manose, eluída com diferentes soluções.....	29
Gráfico 4 - Cromatografia de afinidade em agarose/fetuína, eluída com diferentes soluções.....	30
Gráfico 5 - Cromatografia de em gel sephadex G-50, eluída com glicose 0,2 M.....	31
Gráfico 6 - Cromatografia de em gel sephadex G-75, eluída com glicina 0,1 M pH 2,6 e glicose 0,2 M.....	31
Gráfico 7 - Influência da temperatura sobre a atividade hemaglutinante da lectina de <i>C. rubicundum</i>	32
Gráfico 8 - Influência do pH sobre a atividade hemaglutinante da lectina de <i>C. rubicundum</i>	33

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1 ASPECTOS HISTÓRICOS.....	15
2.2 CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS LECTINAS DE PLANTAS.....	15
2.3 CLASSIFICAÇÃO ESTRUTURAL DAS LECTINAS DE PLANTAS.....	16
2.4 LECTINAS DE LEGUMINOSAS.....	17
2.5 LECTINAS DE DIOCLEINAE.....	18
2.6 CARACTERÍSTICAS GERAIS DO GÊNERO <i>Camptosema</i>	18
3. OBJETIVO	20
3.1 GERAL.....	20
3.2 ESPECÍFICOS.....	20
4. METODOLOGIA	21
4.1 PREPARAÇÃO DA FARINHA.....	21
4.2 EXTRAÇÃO PROTEICA.....	21
4.3 TRATAMENTO DOS ERITRÓCITOS.....	21
4.4 DETERMINAÇÃO DO TÍTULO DA ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE.....	22
4.5 DOSAGEM DE PROTEÍNAS.....	22
4.6 ESPECIFICIDADE A CARBOIDRATOS.....	22
4.7 ENSAIOS COM RESINAS DE AFINIDADE	23
4.8 EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE A ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE	23
4.9 EFEITO DO pH SOBRE A ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE.....	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1 ESTUDO DA ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE	25
5.2 ESTUDO DA INIBIÇÃO POR ESPECIFICIDADE A CARBOIDRATOS.....	27
5.3 CROMATOGRAFIAS DE AFINIDADE A RESINAS.....	29
5.4 ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA SOBRE A ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE.....	32
5.5 ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO pH SOBRE A ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE	32
6. CONCLUSÃO	34
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

1. INTRODUÇÃO

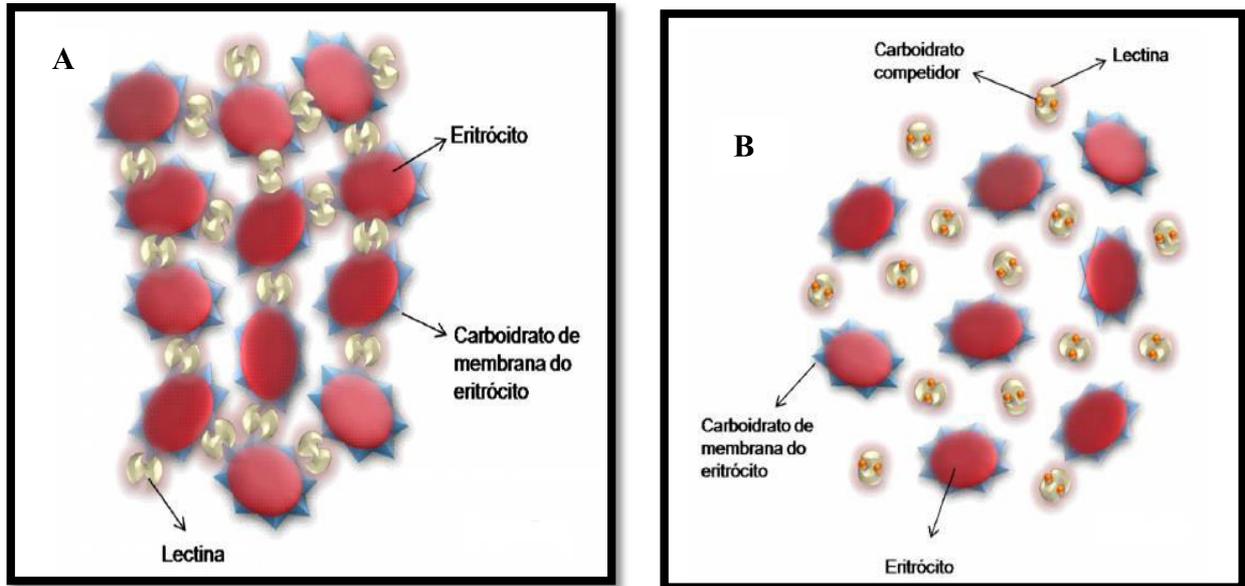
As lectinas constituem um grupo de proteínas ou glicoproteínas de origem não imunológica, que apresentam no mínimo um domínio não catalítico, que reconhecem e ligam-se reversivelmente a carboidratos. Entre as características mais peculiares das lectinas estão inclusas a capacidade de aglutinar células animais e/ou células vegetais e a ação de precipitar glicoconjugados (LAM et al., 2010; PEUMANS; VAN DAME, 1995; SHARON, 2007).

Através de ligações conhecidas como pontes de hidrogênio e interações de van der Waals com células adjacentes as lectinas interagem com os glicoconjugados de células, provocando a aglutinação dos mesmos (PEUMANS; VAN DAMME, 1995). Essa peculiaridade torna possível a identificação das lectinas em tecidos vegetais, por meio da aglutinação de eritrócitos (figura 1). Aliado a isso, através de ensaios de inibição da atividade hemaglutinante é possível identificar o carboidrato ao qual a lectina tem especificidade, no momento em que esta reconhece e liga-se a este, procedimento este que auxilia no isolamento destas proteínas, norteando a escolha de técnicas de purificação (RAMOS et al., 2002).

Quanto a distribuição, as lectinas encontram-se praticamente de forma ubíqua na natureza, sendo encontradas desde microrganismos (IMBERT et al., 2004), até plantas (LEITE et al., 2005) e animais (MOURA et al., 2006). Em animais e microrganismos estas podem atuar na mediação do reconhecimento biológico de muitos eventos ligados a comunicação celular, desenvolvimento, defesa, metástase tumoral, inflamação, entre outros (CAVADA et al., 2001).

Frente aos pressupostos supracitados é válido ressaltar que as lectinas apresentam ainda outra variedade de aplicações e funções biológicas, pois exercem um papel importante em vários processos biológicos, tais como resposta imunológica, interação célula a célula, fertilização (GABIUS; GABIUS, 1997), proteção contra patógenos e insetos, reconhecimento celular, reguladores de crescimento (PUSZTAI, 1991), ação anti e pró-inflamatória (FREIRE et al., 2003), atividade inseticida, entre outras (MACEDO et al., 2007). Assim, podendo aplicar a diversas áreas das ciências, tais como, a farmacologia e medicina (KIM et al., 2013), além da agricultura (SÁ et al., 2009) constituindo ferramentas fundamentais para estudos de âmbito biotecnológico (RÜDIGER; GABIUS, 2001).

Figura 1- A: interação entre a lectina e carboidratos da membrana dos eritrócitos. B: Ilustração da reversibilidade da ligação lectina-carboidratos.



FONTE: Bezerra (2009).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ASPECTOS HISTÓRICOS

Ao final do século XIX, algumas evidências demonstram que havia no meio ambiente um grupo de proteínas que possuía a habilidade de aglutinar eritrócitos, iniciando-se desta forma a história da pesquisa com lectinas. A princípio estas proteínas ficaram conhecidas através dos termos hemaglutininas ou fito-hemaglutininas, dado que a maioria foram encontradas em plantas (SHARON; LIS, 2004).

A partir da divulgação de estudos pioneiros, que relatavam principalmente o fato de Silas Weir Mitchell em 1860, ter observado atividade hemaglutinante em extrato de veneno de cobra *Crotalus Durissus* (MITCHELL, 1860) e de Peter Hermann Stillmark ter descoberto a ricina uma lectina extraída das sementes de mamona (*Ricinus communis*) caracterizada por seu alto grau de toxicidade (STILLMARK, 1888), surgiram novos trabalhos com uma diversidade de lectinas vegetais, a exemplo, foi constatado através do isolamento e caracterização biológica das sementes da *Phaseolus limensis* e *Vicia craca* que haviam lectinas que não apresentavam toxicidade e que tinham a habilidade e preferência por aglutinar eritrócitos do sistema ABO (SHARON; LIS, 2004). Outro ponto crucial na história das lectinas foi a descoberta de Peter Nowell (1960), onde o mesmo revelou que a lectina de *Phaseolus vulgaris* possui atividade mitogênica atribuindo informações importante na área imunológica, gerando avanços nas pesquisas e estudos das interações intraespecíficas das células do sistema imunológico (BRANDO-LIMA et al., 2006).

Atualmente existe uma gama de estudos com lectinas, onde estas se mostraram capazes de ativar células do sistema imune de animais (GUPTA, 2012), interferindo em várias vias apoptóticas, como agentes antitumorais (HAMID et al., 2013; FU et al., 2011), sendo consideradas bons agentes biotecnológicos para as diversas áreas (SHARON; LIS, 2004).

2.2 CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS LECTINAS DE PLANTAS

As Lectinas extraídas a partir de plantas diferem de outras proteínas vegetais devido a sua capacidade de reconhecer e ligar-se de forma reversível a carboidratos específicos. Suas peculiaridades fazem com que esta classe de proteínas apresente características bioquímicas e atividades biológicas extremamente diferenciadas (PEUMANS; VAN DAMME, 1995).

Quanto às cadeias polipeptídicas as lectinas de plantas, possuem em muitos casos aminoácidos ácidos e hidroxilados, ligados por interações do tipo pontes de hidrogênio e pontes de dissulfetos (KENNEDY et al., 1995; RÜDIGER; GABIUS, 1993).

Dentro do reino Plantae há estudos que relatam a presença de lectinas desde organismos mais simples como as algas (LIMA et al., 2005) e musgos (MOLINA; VINCENTE, 1995) até aos mais complexos, a exemplo as gimnospermas (HAN et al., 2005) e angiospermas, sendo as mais estudadas em relação aos demais grupos (KAUR et al., 2005).

2.3 CLASSIFICAÇÃO ESTRUTURAL DAS LECTINAS DE PLANTAS

Segundo o trabalho de Van Damme et al. (1998) as lectinas extraídas a partir de vegetais são classificadas considerando suas habilidades de reconhecimento e especificidade de ligação de maneira reversível aos carboidratos e seus aspectos estruturais, logo, estão organizadas em quatro grupos: merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas.

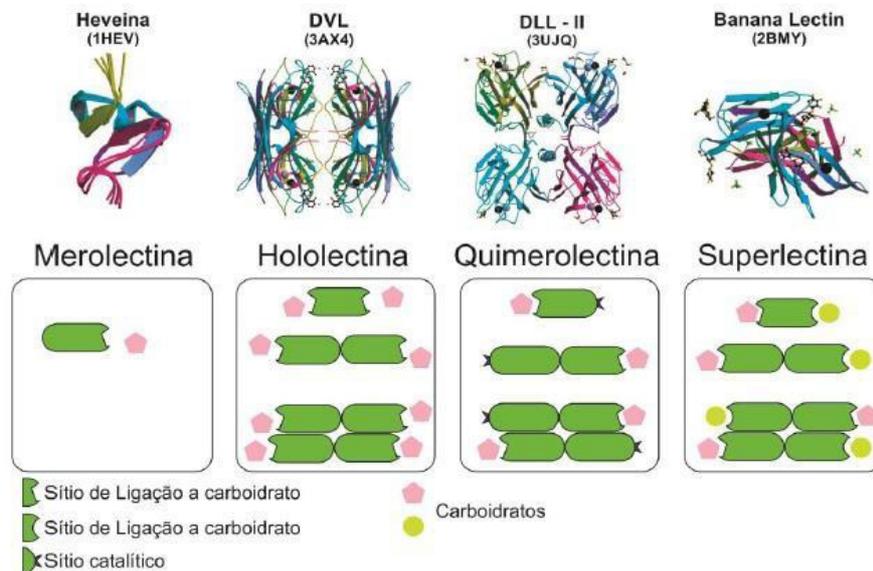
Merolectinas: proteínas com ação lectínica que apresentam em sua estrutura apenas um domínio ligante de carboidrato, sendo incapazes de aglutinar eritrócitos ou precipitar glicoconjugados, visto que, são monovalentes. Exemplo: *Hevea brasiliensis* (VAN PARIJS et al., 1991).

Hololectinas: este grupo de lectinas possuem dois ou mais domínios que interagem com carboidratos iguais ou similares. As quais podem ser divalentes ou multivalentes, apresentam ainda a capacidade de aglutinar células e precipitar glicoconjugados. Exemplo: Maioria das lectinas compreende esta classe, entre elas, as espécies da subtribo Diocleinae (CAVADA et al., 2001).

Quimerolectinas: são 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).

Superlectinas: é reconhecida como 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 os fazendo capazes de reconhecer carboidratos diferentes em sua estrutura. Exemplo: lectina do bulbo de tulipa que apresentam dois domínios de ligação a açúcar, a manose e *N*-acetil-galactosamina (VAN DAMME et al., 1996).

Figura 2: Esquematização de Merolectinas (Heveína); Hololectinas (DVL); Quimerolectinas (DLL-II) e Superlectinas (Lectina de banana).



FONTE: adaptado de Santiago (2013).

Apesar de apresentarem diferenças quanto a especificidade a carboidratos, as lectinas compartilham algumas propriedades moleculares comuns (LIS; SHARON, 1986). Em geral apresentam 2 ou 4 subunidades de massas moleculares entre 25 a 30 kDa. Uma grande parcela são glicoproteínas e metaloproteínas que contém Ca^{2+} e Mn^{2+} como cofatores. Apresentam ainda um centro de ligação a carboidratos por subunidade. Em sua maioria, as lectinas apresentam glicanos formado por carboidratos ligados ao grupamento amina, podendo ser composto por, *N*-acetil-D-glicosamina, D-manose, D-xilose e L-fucose. A presença desses carboidratos na proteína não colabora para atividade biológica, nem para a especificidade da lectina (SHARON; LIS, 1990). Além dos carboidratos, as lectinas apresentam ainda, grandes concentrações de aminoácidos ácidos e hidroxiaminoácidos, quando comparados a quantidade de aminoácidos sulfurados (SHARON; LIS, 1989).

2.4 LECTINAS DE LEGUMINOSAS

A família Leguminosae ou Fabaceae é reconhecida como um amplo grupo de angiospermas compreendendo cerca de 20.000 espécies de plantas, apresentando três subfamílias muito distintas (Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae), além de 36 tribos e aproximadamente 727 gêneros (MOURÃO et al., 2011). Diante da heterogeneidade das angiospermas várias lectinas têm sido estudadas, onde a família Leguminosae apresenta a

maior quantidade de proteínas isoladas (LORIS et al., 1998; PRAKASHKUMAR et al., 1997; SHARON, 1993).

A lectina de *Canavalia ensiformes*, denominada de Concanavalina A (ConA), foi a primeira lectina de leguminosa que teve sua estrutura tridimensional elucidada (BECKER et al., 1975; EDELMAN et al., 1972; REEKE et al., 1975) sendo considerada uma das lectinas mais bem caracterizada dentre aquelas obtidas a partir de leguminosas (SANZ-APARÍCIO et al., 1997).

A maioria das lectinas extraídas e isoladas de leguminosas são encontradas principalmente nas sementes (LORIS et al., 1998; OLIVEIRA et al., 2011; SHARON, 1993), entretanto, também são encontradas em outras partes vegetais, tais como folhas (RATANAPO et al., 2001), raízes (PEUMANS et al., 1997; SOUZA et al., 2011; VAN DAMME et al., 1997), tubérculos (SUSEELAN et al., 2002) e frutos (SAMPIETRO et al., 2001).

2.5 LECTINAS DE DIOCLEINAE

A subtribo Diocleinae ocorre em grande escala na América Latina, sendo diferenciada das demais subtribos pela presença de características primitivas, tais como hábito lenhoso ou grosso, flores grandes e a presença do aminoácido não-proteinogênico canavanina (ácido L-2-amino-4-guanidinoxibutanóico) que é encontrado em muitas leguminosas. A referida subtribo é composta por 13 gêneros (*Dioclea*, *Canavalia*, *Cymbosema*, *Cleobulia*, *Macropychanthus*, *Luzonia*, *Cratylia*, *Collaea*, *Galactia*, *Calopogonium*, *Herpyzia*, *Pachyrhizus* e *Camptosema*), dentre estes, cinco possuem lectinas purificadas de suas sementes, os quais são: *Dioclea*, *Canavalia*, *Cymbosema*, *Galactia*, *Cratylia* e *Camptosema*, (CAVADA et al., 2001; VARELA et al., 2004).

A grande maioria das lectinas de Diocleinae possuem afinidade primária a glicose e manose, mas apesar dessa característica compartilhada e da proximidade filogenética, essas proteínas podem apresentar atividades biológicas distintas (CAVADA et al., 2001).

2.6 CARACTERÍSTICAS GERAIS DO GÊNERO *Camptosema*

Segundo Queiroz (1999) *Camptosema* (Figura 3) é um gênero neotropical de trepadeiras herbáceas ou semi-lenhosas, arbustos ou lianas com folhas uni ou trifolioladas, inflorescências pseudoracemosas, flores papilionóides com pétalas vermelhas, androceu pseudomonadelfo, ovário estipitado e frutos deiscentes, entretanto os limites para este gênero

tornaram-se imprecisos devido a transferência de algumas espécies que estavam classificadas em outros gêneros, a exemplo, *Cratylia* e *Galactia* para o mesmo. Este compreende cerca de 17 espécies, sendo de ocorrência exclusiva da América do Sul. No Brasil é conhecida a ocorrência de 6 espécies e 4 variedades (QUEIROZ, 2012).

Há poucos estudos sobre as características lectínicas do gênero, contudo já é sabido que a lectina de *Camptosema ellipticum*, possui estudos de análise estrutural e funcional, destacando-se também a sua maior preferência a *N*-acetil-D-galactosamina e lactose em detrimento de outros carboidratos (BATISTA et al., 2010). Já a espécie *Camptosema pedicellatum*, apresenta estrutura tridimensional elucidada, e em contraponto a espécie supracitada apresenta maior afinidade a α -metil-D-manopiranosídeo e D-manose corroborando com os estudos reportados para outras lectinas da subtribo Diocleinae (TEIXEIRA, 2012). Esse fato evidencia que apesar do parentesco filogenético há uma heterogeneidade entre as propriedades lectínicas do gênero.

Figura 3: Flores de *Camptosema rubicundum*.



Fonte: http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=8057

3. OBJETIVO

3.1 GERAL

Extrair e caracterizar parcialmente por meio de ensaios físico-químicos a lectina das sementes de *Camptosema rubicundum*.

3.2 ESPECÍFICOS

- Determinar qual a melhor solução de extração da lectina das sementes de *C. rubicundum*;
- Determinar o título da atividade hemaglutinante;
- Caracterizar a lectina quanto à sua especificidade aos carboidratos;
- Avaliar o perfil de interação da lectina com resinas cromatográficas;
- Determinar as características físico-químicas em função dos parâmetros como pH e temperatura.

4. METODOLOGIA

4.1 PREPARAÇÃO DA FARINHA

Para a preparação da farinha, foram utilizadas sementes de *Camptosema rubicundum* adquiridas a partir da empresa Sunshine seeds (Alemanha), as mesmas foram moídas em moinho elétrico para a separação do excesso de casca, logo após foram peneiradas para obtenção de um pó fino, que foi utilizado para a extração proteica.

4.2 EXTRAÇÃO PROTEICA

As proteínas solúveis foram extraídas em três soluções de tamponamento contendo no tampão 1: Tris-HCl 0,1 M pH 7,6 + NaCl 0,15 M; tampão 2: Glicina 0,1 M pH 2,6 + NaCl 0,15 M; tampão 3: Glicina 0,1 M pH 9,0 + NaCl 0,15 M e ainda em solução salina de NaCl 0,15 M todos na proporção 1:20 (m/v). Foi pesada uma quantidade de 75 mg de farinha para 1,5 mL de solução de extração. Cada solução proteica foi colocada em microtubos eppendorf de 2 mL, que foi submetido a constante agitação durante 4 horas em temperatura ambiente. Em seguida, os diferentes extratos foram centrifugados uma única vez a uma velocidade de 1.500 rpm durante 5 minutos. Posteriormente o sobrenadante foi separado da fração precipitada, sendo obtido uma fração denominada de extrato bruto.

4.3 TRATAMENTO DOS ERITRÓCITOS

Para os ensaios da atividade hemaglutinante foram utilizadas amostras de sangue de coelho coletado no Laboratório de Biologia Estrutural e Molecular LaBEM e sangue humano (ABO) cedidos pelo Centro de Hemoterapia e Hematologia do Maranhão - HEMOMAR.

Os sangues coletados foram transferidos para tubo falcon de 15 mL, sendo lavado com NaCl 0,15 M gelado, sendo centrifugado por 9 vezes a uma velocidade de 1.500 rpm durante 5 minutos. Em cada lavagem o sobrenadante foi descartado e adicionado NaCl 0,15 M até completar 12 mL. Ao final das lavagens, foi retirada 360 µL do concentrado de hemácias que em seguida, foi diluído em 12 mL de NaCl 0,15 M, para a obtenção de eritrócitos nativos à 3%.

Além dos eritrócitos nativos, foram preparados eritrócitos previamente tratados com as enzimas tripsina e papaína. Para tanto, foi adicionado 240 µL de tripsina ou papaína 0,5 mg mL⁻¹ a 12 mL eritrócito a 3%. A solução ficou em repouso por 30 minutos à 4 °C, com

leves agitações no intervalo de 5 minutos. Em seguida, foram realizadas 6 lavagens como descrito anteriormente, no final foi obtido eritrócitos a 3% tratados com tripsina e tratados com papaína que foram conservados em geladeira e utilizados para determinação da atividade hemaglutinante.

4.4 DETERMINAÇÃO DO TÍTULO DA ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE

Foi adicionado em duplicatas nos tubos de ensaios 100 μL de Tris-HCl 0,1 M pH 7,6, em seguida, 100 μL do extrato bruto e por último 100 μL de eritrócitos nativos ou tratados com as enzimas proteolíticas. No controle positivo foi adicionado 100 μL de Tris-HCl 0,1 M pH 7,6 + 100 μL da solução da lectina das sementes de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) 0,2 mg mL^{-1} + 100 μL dos eritrócitos e para o controle negativo foi adicionado 100 μL de Tris-HCl 0,1 M com pH 7,6 + 100 μL de cada solução utilizada para a obtenção do extrato bruto (como descrito no item 4.2) + 100 μl de eritrócitos.

Os ensaios de atividade hemaglutinante seguiram os protocolos realizados através de diluições seriadas em tubos de ensaio (70 mm x 10 mm) segundo o método descrito por Moreira e Perrone (1977). Através da detecção dos extratos que aglutinaram os eritrócitos, foi determinado o título da atividade hemaglutinate, desses extratos. Para tanto, foram adicionados 50 μL de Tris-HCl 0,1 M com pH 7,6, em cada poço de uma placa de micro titulação com fundo “V”, em seguida, 50 μL do extrato bruto foi adicionado ao primeiro poço e posteriormente o extrato foi diluído seriadamente. Logo após, adicionou-se os eritrócitos a 3% em cada poço seguido de incubação a 37 °C em estufa por 30 min e a temperatura ambiente por mais 30 minutos.

Para o cálculo do título da atividade hemaglutinante foi utilizada a seguinte equação: $\text{UH} = 2^n$; onde “UH” = unidade hemaglutinante e “n” representa o número do último poço da diluição seriada que seria possível observar a aglutinação dos eritrócitos.

4.5 DOSAGEM DE PROTEÍNAS

O teor de proteínas solúveis foi determinado através do método descrito por Bradford (1976), utilizando a proteína soro albumina bovina (BSA) como padrão e espectrofotômetro com absorbância de 595 nm.

4.6 ESPECIFICIDADE A CARBOIDRATOS

A especificidade de ligação da lectina de *Camptosema rubicundum* à carboidratos foi determinada pelo ensaio de inibição da atividade hemaglutinante, onde os testes de inibição foram realizados utilizando soluções de carboidratos e glicoproteínas na concentração de 0,1 M seguindo a adaptação do protocolo descrito por Ramos et al. (1996). Os carboidratos utilizados neste procedimento foram: α -metil-D-manopiranosídeo, manose, D-glicose, N-acetil-D-glicosamina, L-raminose, D-fucose, D-galactose, α -D-lactose, β -D-lactose e as glicoproteínas, adenosina, mucina, fetuína.

Em placas de micro-titulação, foram adicionados em todos os poços 50 μ L de Tris-HCl 0,1 M pH 7,6, posteriormente 50 μ L do carboidrato ou glicoproteína no primeiro poço, diluindo 3 vezes em cada poço e passando para o seguinte até o último poço, que ficou com 100 μ L, em seguida, foi adicionado 50 μ L do extrato bruto em cada poço. Passado 1 (uma) hora, foram adicionados os eritrócitos com o qual a amostra apresentou melhor atividade, sendo 50 μ L em cada poço até o antepenúltimo poço. O resultado da inibição da atividade hemaglutinante foi definido como a menor concentração (mM ou mg.mL⁻¹) de carboidratos e/ou glicoproteínas necessária para inibir a atividade hemaglutinante (CIM), o qual foi observado 2 (duas) horas após a adição dos eritrócitos.

4.7 ENSAIOS COM RESINAS DE AFINIDADE

O extrato bruto das sementes de *Camptosema rubicundum* foi submetido ao método cromatográfico de afinidade. Nessa etapa, foram testadas diferentes resinas de afinidade adquiridas comercialmente pela (Sigma Aldrich), tais como, agarose-manose, agarose-fetuína, sephadex G-50 e G-75. As resinas foram adicionadas em um suporte para cromatografias e em seguida foram equilibradas com a solução de extração proteica, seguida da aplicação do extrato bruto e remoção da fração não retida. Após a saída da fração não retida, foi realizado a eluição da fração retida na resina com diferentes soluções, tais como, glicose 0,2 M, glicina 0,1 M pH 2,6, NaCl 1 M, glicina 0,1 M pH 9,0 e manose 0,1 M. Durante todo o processo, foram coletados amostras em tubos de ensaio com alíquotas de 1,5 mL e a absorbância de cada tubo analisado em espectrofotômetro com absorbância de 280 nm, utilizando uma cubeta de quartzo de 1cm.

4.8 EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE A ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE

O efeito da temperatura sobre a atividade hemaglutinante foi determinado através da incubação da amostra da lectina em tubos de ensaio, onde foi realizada o teste de

hemaglutinação a temperatura ambiente (25 °C) e em seguida a amostra foi submetida a diferentes temperaturas que variaram de 30 °C a 100 °C com intervalos de 10 °C, por 30 minutos.

4.9 EFEITO DO pH SOBRE A ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE

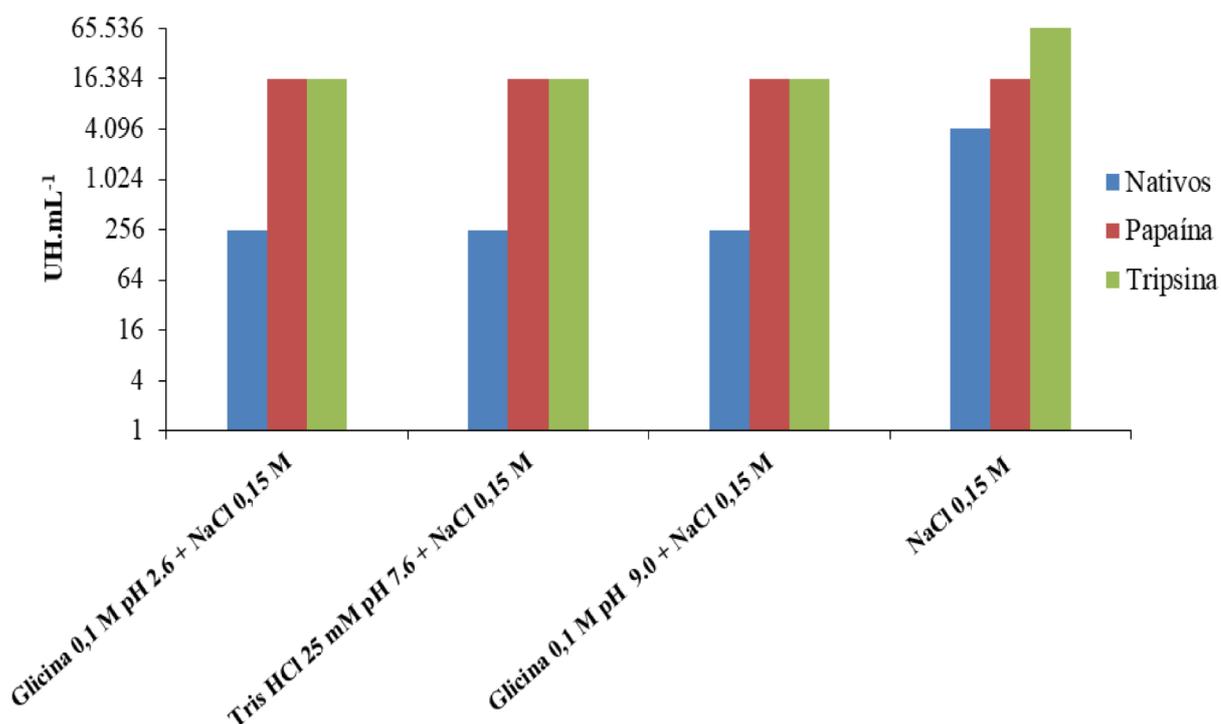
O efeito do pH sobre a atividade hemaglutinante da lectina de sementes de *C. rubicundum* foi determinado por meio de testes de atividade hemaglutinante. Logo, as amostras proteicas foram solubilizadas em NaCl 0,15 M. Em seguida foram incubadas por um período de 30 minutos e a uma temperatura de 37 °C em diferentes soluções tampão cujo o pH variou de 4,0 a 10,0. Posteriormente, foram adicionados os eritrócitos à 3% sendo incubados novamente para a observação da atividade hemaglutinante.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ESTUDO DA ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE

A partir da obtenção dos extratos brutos das sementes de *C. rubicundum* em diferentes soluções, foi observada a atividade hemaglutinante para todos os extratos com eritrócitos de coelhos a 3% nativos e tratados enzimaticamente. Quando realizado o título da atividade hemaglutinante, vimos que a lectina apresentou maior atividade hemaglutinante em eritrócitos com tratamento enzimático com os 4 extratos brutos (Gráfico 1). Além disso, observamos que o extrato obtido apenas com NaCl 0,15 M apresentou um título maior contra eritrócitos tratados com tripsina ($65.536 \text{ UH.mL}^{-1}$) em relação aos demais extratos brutos que apresentaram título de $16.384 \text{ UH.mL}^{-1}$ para eritrócitos papainado e 256 e 4.096 UH.mL^{-1} para eritrócitos nativos (Gráfico 1).

Gráfico 1- Título da atividade hemaglutinante da lectina de *C. rubicundum* para eritrócitos de coelho.



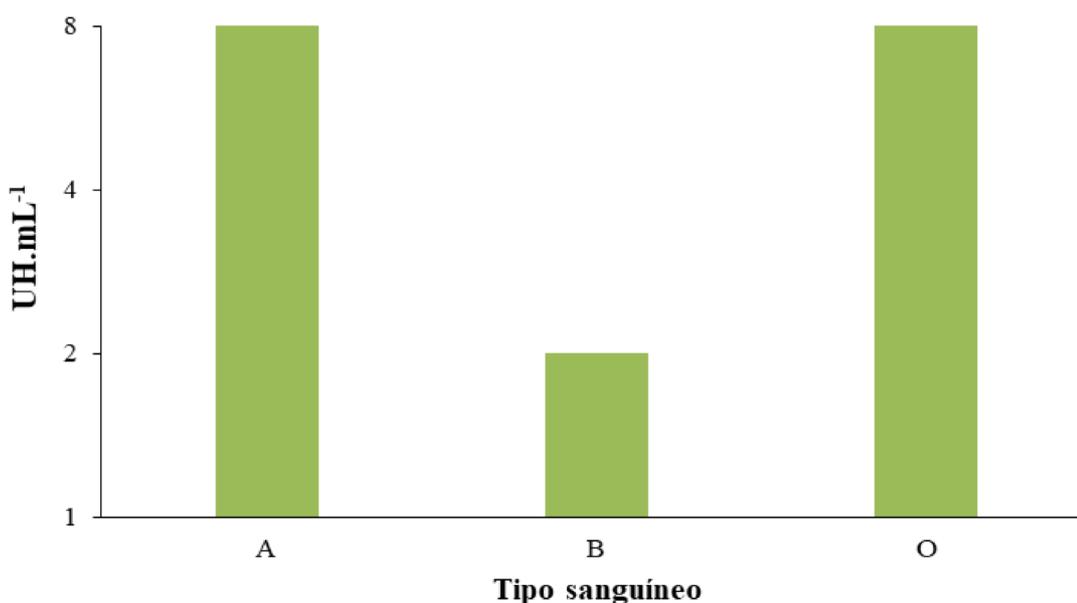
Eixo X - Soluções de extração

Acerca do teste da atividade hemaglutinante no sistema ABO, notou-se a presença de hemaglutinação em ambos os tipos sanguíneos (Gráfico 2), entretanto a interação com o sangue B revelou apenas um título de 2 UH.mL⁻¹, já para os sangues A e O o título foi de 8 UH.mL⁻¹.

Estes resultados corroboram com os de Cavada et al. (2001), onde a maioria das lectinas de Diocleinae, entre elas as descritas para as espécies *C. ensiformis*, *C. brasiliensis*, *C. marítima* e *D. violacea* apresentam menor afinidade a eritrócitos humanos em relação a sua afinidade aos eritrócitos de coelho.

Ensaio de hemaglutinação utilizando a lectina ligante a manose das sementes de *D. reflexa*, também mostraram um número de unidades hemaglutinantes similar ao de *C. rubicundum* para eritrócitos humanos (PINTO-JÚNIOR et al., 2016).

Gráfico 2 - Título da atividade hemaglutinante da lectina de *C. rubicundum* para eritrócitos humanos no sistema ABO.



Aliado ao teste da atividade hemaglutinante, foi realizada a dosagem de proteínas solúveis em cada extrato, afim de identificar qual solução apresenta maior eficiência na extração da lectina. Os extratos apresentaram concentração proteica de 0,308, 0,310, 0,645 e 1,05 mg.mL⁻¹ para NaCl 0,15 M, glicina 0,1 M pH 2,6 + NaCl 0,15 M, tris HCl 25 mM pH 7,6 + NaCl 0,15 M, glicina 0,1 M pH 9,0 + NaCl 0,15 M, respectivamente. A partir desses dados pode-se perceber que houve uma tendência ao aumento de proteínas solúveis conforme o pH do meio foi se tornando mais básico. Contudo para determinar qual a melhor solução de

extração da lectina foi calculada a atividade específica da proteína para cada solução, onde a solução contendo apenas NaCl, apresentou a maior atividade específica em relação aos tampões associados ao NaCl 0,15 M, indicando que o sistema tamponante reduz essa eficiência, além disso, podemos observar que o aumento do pH também está diretamente relacionado a ineficiência da extração da lectina como observado na redução da atividade específica como descrito na Tabela 1.

Tabela 1 - Teor de proteínas totais e atividade específica da lectina de *C. rubicundum*.

Solução de Extração	Concentração (mg.mL⁻¹)	Atividade hemaglutinante (UH*)	Atividade específica (UH.mg⁻¹)
NaCl 0,15 M	0,308	65.536	212,77
Glicina 0,1 M pH 2,6 + NaCl 0,15 M	0,310	16.348	52,85
Tris HCl 25 mM pH 7,6 + NaCl 0,15 M	0,646	16.348	25,36
Glicina 0,1 M pH 9,0 + NaCl 0,15 M	1,05	16.348	15,60

*Unidade hemaglutinante

** Unidade hemaglutinante por miligrama de proteína

5.2. ESTUDO DA INIBIÇÃO POR ESPECIFICIDADE A CARBOIDRATOS

A atividade lectínica de *C. rubicundum* foi inibida por α -metil-D-manopiranosídeo (6,25 mM), manose (50 mM) e fetuína (50 mM) em contraponto aos demais carboidratos e glicoproteínas testados (D-glicose, N-acetil-D-glicosamina, L-raminose, D-fucose, D-galactose, α -D-lactose, β -D-lactose, adenosina e mucina) que não inibiram a atividade hemaglutinante da lectina na concentração de 100 Mm (Tabela 2). Estes resultados demonstram que a lectina de *C. rubicundum* apresenta característica de hololectinas.

Tabela 2 - Inibição da atividade hemaglutinante de lectinas de sementes de *C. rubicundum* por especificidade a carboidratos.

Carboidratos	CIM*
Glicose	NI
Manose	50 mM
α -metil-D-manopiranosídeo	6,25 mM
<i>N</i> -acetil-D-glicosamina	NI
L-Raminose	NI
D-Fucose	NI
D-Galactose	NI
α -D-Lactose	NI
β -D-Lactose	NI
Glicoconjugados	
Adenosina	NI
Mucina	NI
Fetuína	50 mM

*CIM- Concentração inibitória mínima

NI- Não inibiu na concentração de 100 mM

O fato do extrato bruto contendo a lectina ter apresentado maior afinidade a α -metil-D-manopiranosídeo em relação a manose pode estar associado a presença de um substituinte hidrofóbico no derivado da manose, o que pode ter proporcionado interações adicionais com regiões hidrofóbicas do sítio de ligação da lectina (RAMOS et al., 1996).

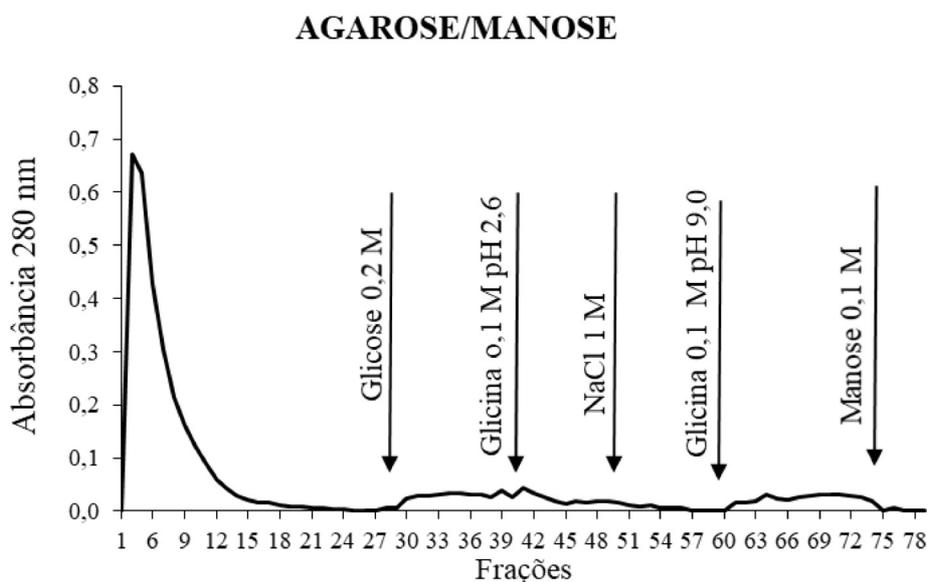
Existem na natureza outros compostos capazes de aglutinar hemácias e precipitar glicoconjugados tais como, taninos, substâncias catiônicas, alguns lipídios, entre outros, neste caso apenas a observação da hemaglutinação não pode ser considerada conclusiva para a detecção de lectinas, sendo necessário realizar outros testes de caracterização, a exemplo a inibição por especificidade a carboidratos (TRINDADE, 2005).

Teixeira (2012) também obteve resultados semelhantes para a lectina de *Camptosema pedicellatum* a qual teve sua atividade fortemente inibida por α -metil-D-manopiranosídeo, apresentando também afinidade a glicose. A lectina de *D. lasiophylla* apresentou um perfil similar ao de *C. rubicundum* em relação a sua afinidade ao carboidrato manose e à glicoproteína fetuína (PINTO-JÚNIOR et al., 2013). Outras lectinas extraídas de espécies da subtribo Diocleinae apresentam afinidade a glicose e manose, o que torna essa propriedade uma característica conservada nas lectinas deste grupo (CAVADA et al., 2001).

5.3 CROMATOGRAFIAS DE AFINIDADE A RESINAS

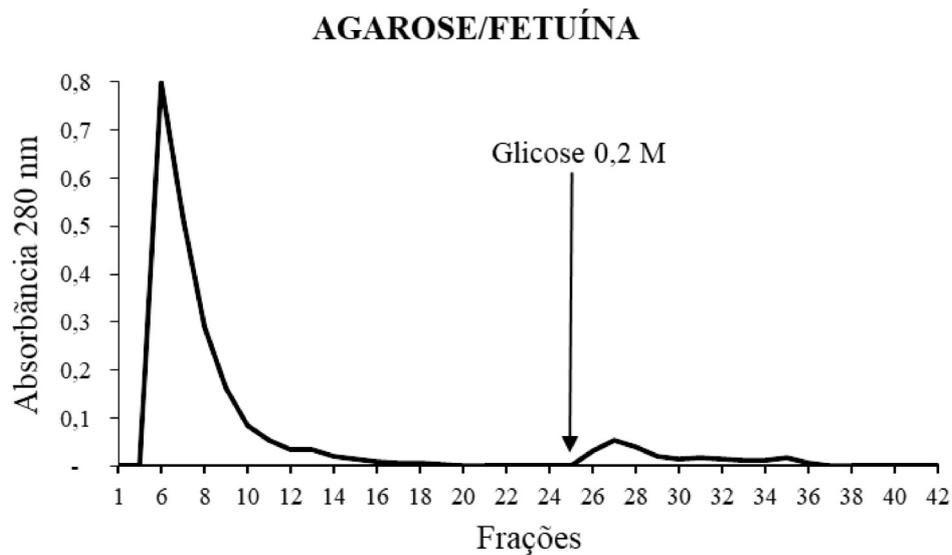
Com base nos resultados de especificidade a carboidratos do extrato bruto (tabela 2) foi possível definir as resinas para os ensaios de cromatografia de afinidade, onde a primeira a ser testada foi a de agarose-manose. Na qual, observamos que houve uma fraca interação entre a lectina e a resina, com uma absorbância máxima de (0,045 Abs) quando eluída com glicina 0,1 M pH 2,6; (0,032 Abs) quando eluída com glicina 0,1 M pH 9,0 e (0,034 Abs) quando eluída com glicose 0,2 M (Gráfico 3). Realizou-se o teste de atividade hemaglutinante com a fração não retida na coluna e a mesma apresentou atividade, subentende-se então que a lectina apresenta baixa interação com a resina.

Gráfico 3 - Cromatografia de afinidade em agarose/manose, eluída com diferentes soluções.



A cromatografia de afinidade utilizando a resina de fetuína, também não foi eficiente, entretanto revelou uma leve interação entre a lectina e a resina, sendo possível observar uma baixa absorbância (0,053 Abs) na fração 27 (Gráfico 4). A fetuína é uma glicoproteína que apresenta tanto *O*- quanto *N*-glicosilações, sendo essas últimas estruturas complexas de oligossacarídeos (NILSSON et al., 1979).

Gráfico 4 - Cromatografia de afinidade em agarose/fetuína, eluída com glicose 0,2 M



Sabe-se que geralmente as lectinas ligantes a manose também apresentam preferência a glicose (CAVADA et al., 2001), deste modo foi realizado o ensaio cromatográfico com as resinas sephadex G-50 (Gráfico 5) e sephadex G-75 (Gráfico 6), ambas são resinas utilizadas em cromatografias de exclusão molecular (PORATH; FLODIN 1959), porém por serem formadas a partir de resíduos de dextrano (polissacarídeo ligados por ligação α 1-6), é comumente utilizado em experimentos de purificação de lectinas que interagem com glicose (POHLEVEN et al., 2012). Porém, após a eluição com glicose 0,2 M não foram obtidos valores de absorbâncias significativos. Indicando que a lectina das sementes de *C. rubidundum* interage fracamente com essa resina

Gráfico 5 - Cromatografia de em gel sephadex G-50, eluída com glicose 0,2 M.

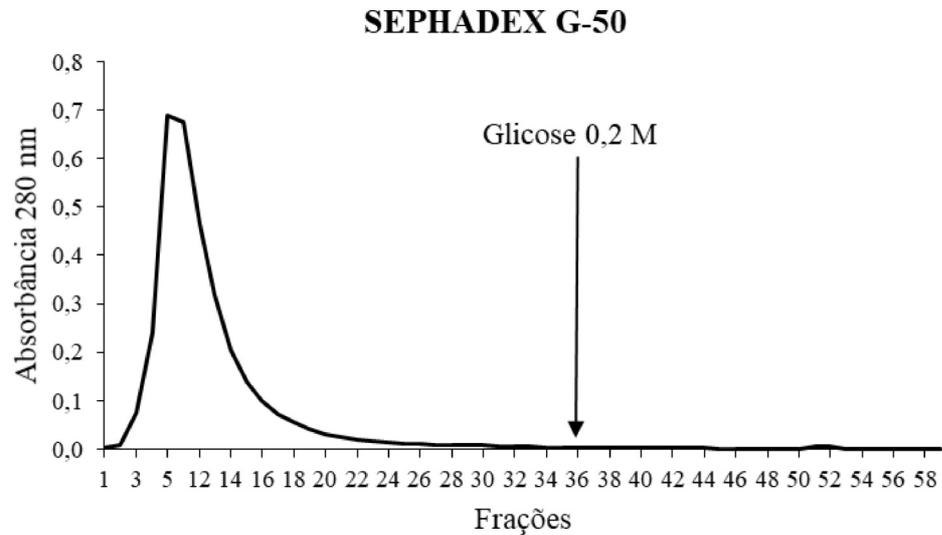
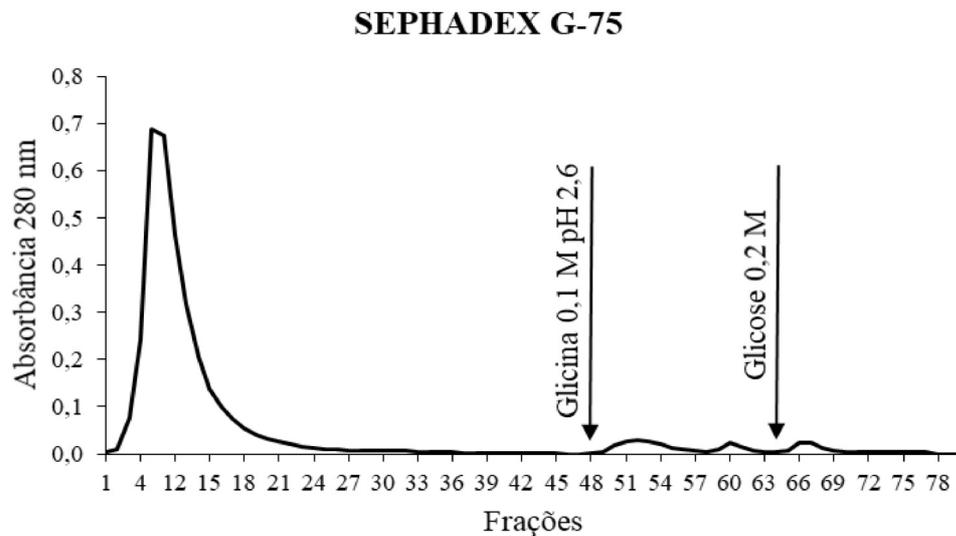


Gráfico 6 - Cromatografia de em gel sephadex G-75, eluída com glicina 0,1 M pH 2,6 e glicose 0,2 M.



Os resultados apresentaram um perfil antagônico aos descritos para a maioria das lectinas extraídas das sementes da subtribo Diocleinae, onde grande parcela destas foram purificadas em resinas de sephadex (CAVADA et al., 2001)

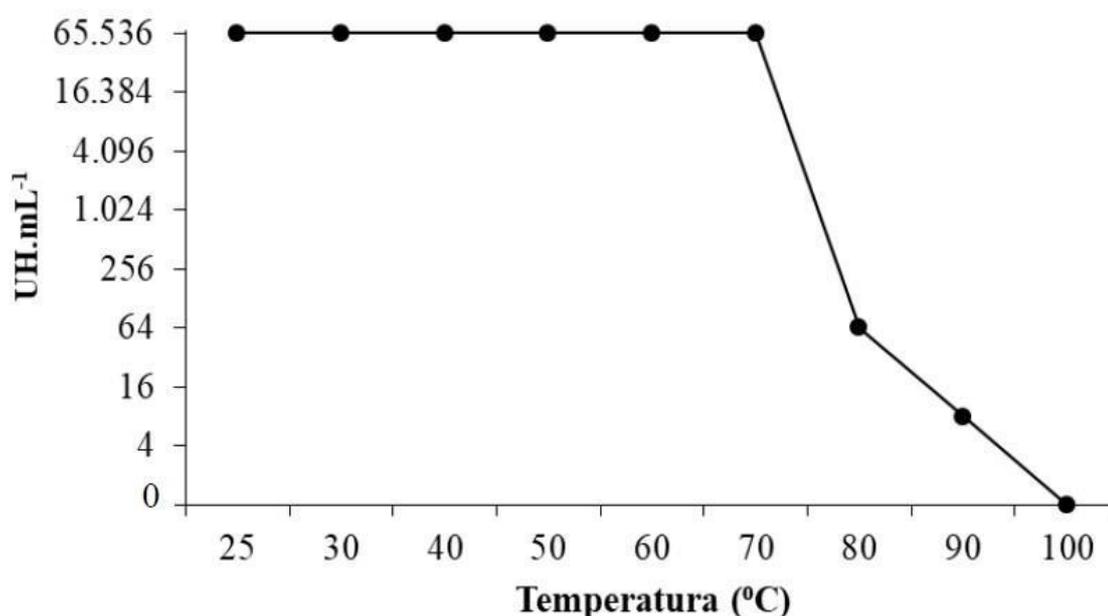
A lectina das sementes de *C. pedicellatum* foi purificada por cromatografia de afinidade na coluna de sephadex G-50 (TEXEIRA, 2012). Esse resultado é semelhante ao *C. ellipticum*, que não foi purificada em resinas do tipo sephadex, sendo que sua purificação se estendeu a outros passos cromatográficos (BATISTA et al., 2010).

5.4 ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA SOBRE A ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE

A lectina de *C. rubicundum* mostrou-se termoestática (Gráfico 7) mantendo sua atividade total ($65.536 \text{ UH.mL}^{-1}$) mesmo quando submetida a uma temperatura de $70 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 30 minutos, atividade esta que começou a diminuir aos $80 \text{ }^\circ\text{C}$ (64 UH.mL^{-1}) e foi totalmente perdida aos $100 \text{ }^\circ\text{C}$.

A dependência das lectinas bem como de proteínas no geral aos efeitos da temperatura está relacionada com o desnovelamento e conseqüentemente com a alteração da estrutura secundária destas, através do processo de desnaturação (COELHO et al., 2012). A lectina das sementes de *C. rubicundum*, mostrou um perfil mais resistente a temperatura quando comparado ao perfil apresentado pela lectina ligante a manose extraída das sementes da espécie *Dioclea reflexa*, que teve sua atividade reduzida em mais da metade quando foi submetida a uma temperatura de $60 \text{ }^\circ\text{C}$ (PINTO-JÚNIOR et al., 2016).

Gráfico 7 - Influência da temperatura sobre a atividade hemaglutinante da lectina de *C. rubicundum*.

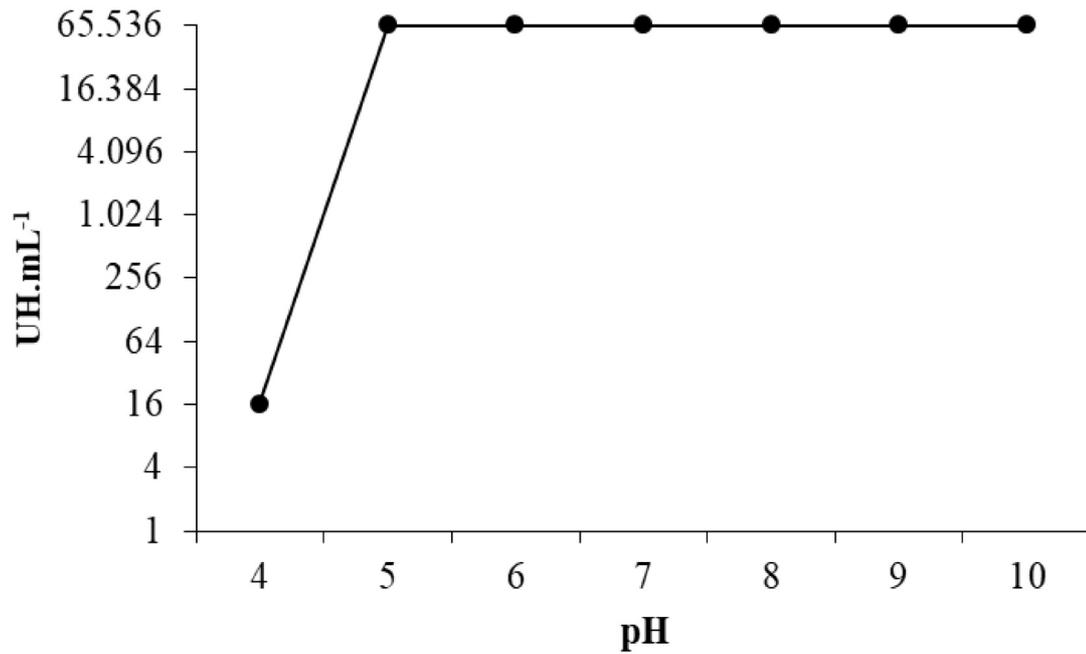


5.5 ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO pH SOBRE A ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE

A atividade lectínica também se manteve estável em uma escala de pH (Gráfico 8), exceto para o pH 4,0 onde foram demonstradas apenas 16 UH.mL^{-1} e hemólise nos demais poços da placa de microtitulação.

Quanto a resistência aos efeitos do pH, a lectina das sementes de *C. rubibundum*, mostrou maior resistência que a lectina de *D. reflexa*, haja vista que esta última necessita de meios com pH na faixa do neutro para manter sua atividade total (PINTO-JÚNIOR et al., 2016).

Gráfico 8 - Influência do pH sobre a atividade hemaglutinante da lectina de *C. rubicundum*.



6. CONCLUSÃO

O estudo da lectina da espécie *C. rubicundum* permitiu identificar uma lectina com a capacidade de reconhecer e aglutinar eritrócitos de coelhos do sistema ABO humano. Foi possível detectar a especificidade desta lectina em reconhecer e ligar-se a carboidratos principalmente com a presença de metilação e à glicoproteínas. A lectina em estudo se mostrou termoestável e independente a variações de pH. Tais informações são relevantes, visto que, ainda não há estudos na literatura relacionados às lectinas extraídas e isoladas de sementes de *C. rubicundum*.

O presente trabalho abre perspectivas de estudos mais aprofundados para esta lectina na busca por mais propriedades físico-químicas, elucidação das estruturas primária, secundária e terciária, Além do estudo em inúmeras aplicações biológicas, fornecendo dados relevantes para utilização desta e de outras lectinas vegetais do gênero *Camptosema* como ferramentas biotecnológicas necessárias para a ciência.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BATISTA, F. A. H.; GOTO, L. S.; GARCIA, W.; MORAES, D. I.; NETO, M. O.; POLIKARPOV, I.; COMINETTI, M.R.; ARAÚJO, H. S. S.; BELTRAMINI, L. M.; ARAÚJO, A. P. U. Concanavalin A, a tetrameric lectin of *Camptosema ellipticum*: structural and functional analysis. **Eur Biophys J**, v. 39, p. 1193-1205, 2010.

BECKER, J. W.; REEKE-JR., G. N.; WANG, J. L.; CUNNINGHAM, B. A.; EDELMAN, G. M.; The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. III. Structure of the monomer and its interactions with metals and saccharides. **Journal of Biological Chemistry**, v. 250, n. 4, p. 1513-1524, 1975.

BEZERRA, R. F. **Purificação e caracterização parcial da lectina presente no soro do peixe amazônico Tambaqui (*Colossoma macropomum*)**, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, 2009.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BRANDO-LIMA, A. C.; SALDANHA-GAMA, R.F.; PEREIRA, C.R.; VILLELA, C. G.; SAMPAIO, A.L.; MONTEIRO-MOREIRA, A.C.; HENRIQUES, M.D.; MOREIRA, R. A.; BARJA-FIDALGO, C. Involvement of phosphatidylinositol-3 kinase–Akt and nuclear factor kappa-B pathways in the effect of frutalin on human lymphocyte. **International Immunopharmacology**, v. 6, p. 465- 472, 2006.

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.

COELHO, L. C. B. B. Protein Purification by Affinity Chromatography. In: Rizwan Ahmad. (Org.), Rijeka, Croatia: **intech**, v. 1, p. 53-72, 2012.

EDELMAN, G. M.; CUNNINGHAM, B. A.; REEKE-JR., G. N.; BECKER, J. W.; WANG, J. L. The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 69, n. 9, p. 2580-4, 1972.

Flora do Rio Grande do Sul e Santa Catarina: *Camptosema rubicundum*. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=8057> acesso em 15 de jun de 2018.

FREIRE, M. G. M.; DESOUZA, 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.

FU, L. L.; ZHOU, C.C.; YAO, S.; YU, J.I.; LIU, B.; BAO, J.K. Plant lectins: targeting programmed cell death pathways as antitumor agents. **The international journal of biochemistry and cell biology**, v. 43, p. 1442-1449, 2011.

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

GUPTA, G. **Animal Lectins: From, Function and Clinical Applications**. Springer Science & Business Media. 2012.

HAMID, R, MASOOD A., WANI, I. H., RAFIQ S. Lectins: Proteins with Diverse Applications. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v.3, p. 93-103, 2013.

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, A.; SINGH, J.; KAMBOJ, S. S.; SEXANA, 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.

KIM, Y. J.; CARVALHO, F. C.; SOUZA, J. A.C.; GONÇALVES, P. C. G.; NOGUEIRA, A. V. B.; SPOLIDÓRIO, L. C.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; CIRELLI, J. A.; Topical application of the lectin Artin M accelerates wound healing in rat oral mucosa by enhancing TGF- β and VEGF production. **Wound Repair and Regeneration**, v. 21, n. 3, p. 456-463, 2013.

LAM, S.K.; NG, T. B. Lectins: production and practical applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 89, p. 45-55, 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.

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.

LIS, H.; SHARON, N. Lectins as molecules and as tools. **Ann Rev. Biochem.** v. 55. p 35-67, 1986.

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

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.

MITCHELL, S.W., Researches upon the venoms of the rattlesnake, Smithsonian, **Contrib. Knowl.** XII. 89-90, 1860.

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**, 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.
- NILSSON, B., NORDEN, N. E. E SVENSSON, S. Structural studies on the carbohydrate portion of fetuin. **J Biol Chem**, v. 254, p. 4545-53, 1979.
- OLIVEIRA, C. F. R.; LUZ, L. A.; PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. B. B; MARANGONI, S; MACEDO, M. L. R. Evaluation of seed coagulant *Moringa oleifera* lectin (cMoL) as a bioinsecticidal tool with potential for the control of insects. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 498-504, 2011.
- 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. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiol**, v. 109, p. 347-352. 1995.
- 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-JÚNIOR, V. R.; CORREIA, J. L. A.; PEREIRA, R. I.; PEREIRA-JUNIOR, F. N.; SANTIAGO, M. Q.; OSTERNE, V. J. S.; MADEIRA, J. C.; CAJAZEIRAS, J. B.; NAGANO, C. S.; DELATATORRE, P.; ASSREUY, A. M. S; NASCIMENTO, K. S.; CAVADA, B. S. Purification and molecular characterization of a novel mannose-specific lectin from *Dioclea reflexa* hook seedes with inflammatory activity. **Journal molecular recognition**, v. 26, p.134-141, 2016.
- PINTO-JÚNIOR, V.R.; DE SANTIAGO, M.Q.; OSTERNE, V.J.S.; CORREIA, J.L.A.; PEREIRA-JÚNIOR, F.N.; CAJAZEIRAS, J.B.; DE VASCONCELOS, M.A.; TEIXEIRA, E.H.; DO NASCIMENTO, A.S.F.; MIGUEL, T.B.A.R.; MIGUEL, E.C.; SAMPAIO, A.H.; DO NASCIMENTO, K.S.; NAGANO, C.S.; CAVADA, B.S. Purification, Partial Characterization and Immobilization of a Mannose-Specific Lectin from Seeds of *Dioclea lasiophylla* Mart. **Molecules**, 18, 10857-10869 2013.
- POHLEVEN, J.; STRUKELJ, B.; KOS, J. **Affinity chromatography of lectins**, 2012.
- PORATH, J.; FLODIN, P. Gel filtration: a method for desalting and group separation. **Nature**, v. 183, p. 1657-1659, 1959.
- PORTO, C. S.; MELO, C. M. L; CORIOLANO M.; LIMA-FILHO, J. L.; COELHO, L. C. B. B.; CORREIA, M. T. S.; PORTO, A. L. F.; CARNEIRO-LEÃO, A. M. A. Avaliação da atividade cicatrizante da lectina de *Parkia pendula* em feridas isquêmicas experimentais. **Caminhos da Ciência**, v. 1, p. 133, 2006.
- PRAKASHKUMAR, R.; PUSHANGADAN, P.; VIJAYAKUMAR, T. Search for lectins in seeds of tropical trees of Kerala, India. **Biologia Plantarum**, v. 40, n. 1, p. 155-158, 1997.
- PUSTZAI, A. **Plant Lectins**. Cambridge University Press, 1991.

QUEIROZ, L. P. **Camptosema in Lista de Espécies da Flora do Brasil, Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB029502>> acesso em 15 de Jun de 2018.

QUEIROZ, L. P. D. **Sistemática e Filogenia do Gênero Camptosema W.J. Hook e Arn (Leguminosae: Papilionoidea: Phaseoleae)**. Tese de Doutorado. São Paulo, SP: Universidade de São Paulo, 1999.

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, 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.

REEKE, G. N.; BECKER, J. M.; EDELMAN, G. M. The Covalent and Three-Dimensional Structure of Concanavalin A. **Journal of Biology Chemical**, v. 250, p. 1525-1547, 1975.

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

RÜDIGER, H.; GABIUS, H. J. Plant lectins: occurrence, biochemistry, functions and applications. **Glycoconj J**, v. 18, n. 8, p. 589-613, 2001.

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.

SANTIAGO, M.Q.; LEITÃO, C.C.F.; PEREIRA-JUNIOR, F.N.; PINTO-JUNIOR, V.R.; OSTERNE, V.J.S.; LOSSIO, C.F.; CAJAZEIRAS, J.B.; SILVA, H.C.; ARRUDA, F.V.S.; PEREIRA, L.P.; ASSREUY, A.M.S.; NASCIMENTO, K.S.; NAGANO, C.S.; CAVADA, B.S. Purification, characterization and partial sequence of a pro-inflammatory lectin from seeds of *Canavalia oxyphylla* Standl. & L. O. Williams. **Journal of Molecular Recognition**, v. 27, p. 1099-1352, 2013.

SANZ-APARÍCIO, J.; GRANJEIRO, T. B.; CALVETE, J. J.; CAVADA, B.S. The crystal structure of *Canavalia brasiliensis* lectin suggests a correlation between its quaternary conformation and its distinct lectin biological properties from Concanavalin A. **FEBS Letters**, v. 405, p. 114-8, 1997.

SÁ, R. A.; SANTOS, N. D. L.; SILVA, C. S. B.; NAPOLEÃO, T. H.; GOMES, F. S.; CAVADA, B.S.; COELHO, L. C. B. B.; NAVARRO, D. M. A. F.; BIEBER, L.W.; PAIVA, P. M. G. Larvicidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* on *Aedes aegypti*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C, Toxicology & Pharmacology**, v. 149, p. 300-306, 2009.

SCHIRATO G. V.; MONTEIRO F. M. F.; SILVA, F.O.; LIMA FILHO J. L.; CARNEIRO LEÃO A. M. A.; PORTO, A. L.; O polissacarídeo do *Anacardium occidentale* L. na fase inflamatória do processo cicatricial de lesões cutâneas. **Ciência Rural**, v. 149, p. 154-36, 2006.

SHARON, N; LIS, H. **Lectins**, Chapman and Hall, London, 1989.

SHARON, N.; LIS, H. Legume lectins – a large family of homologous proteins. **Faseb Journal**, v. 14, n. 4, 3198-3208, 1990.

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

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

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

SHARON, N. Lectins: Carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, p. 2753- 2764, 2007.

SOUZA, J. D; SILVA, M. B. R; ARGOLO, A. C. C; NAPOLEÃO, T. H; SÁ, R. A; CORREIA, 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 and Biodegradation**, v. 65, p. 696-702, 2011.

STILLMARK, H. Uber Ricin, eines giftiges ferment aus den samen von *Ricinus communis* L. und anderson Euphorbiacen, Inaugural Disseration, University of Dorpat, Estonia. 1888.(German) IV. A fate of orally administered ricin in rats. **Journal of Pharmacobiodyn**, v. 15, p. 147-56, 1992.

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.

TEIXEIRA, C. S. **Determinação da estrutura tridimensional de uma lectina das sementes de *Camptosema pedicellatum* BENTH por cristalografia de raios X**, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

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. J. Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. **Planta**, v. 183, p. 258-262, 1991.