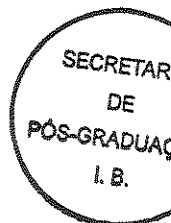


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS – UNICAMP

Daniela Carla da Silva Damico



PURIFICAÇÃO, PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E
ESTUDO DAS ATIVIDADES INSETICIDA, FUNGICIDA
E CITOTÓXICA DE UMA LECTINA PRESENTE EM
SEMENTES DE *Koelreuteria paniculata*

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a)	DANIELA CARLA DA SILVA
	DAMICO
e aprovada pela Comissão Julgadora.	<i>Maria Lígia Rodrigues Macedo</i>

*Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas para
obtenção do título de mestre em Biologia
Funcional e Molecular – Área de Bioquímica*

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Lígia Rodrigues Macedo

CAMPINAS – SP
2002

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	T/UNICAMP
	D184p
V	
TOMBO BC	48944
PROC.	16-837/02
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$11,00
DATA	10/05/02
Nº CPD	

CM00167265-5

IB ID 239964

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

D184p

Damico, Daniela Carla da Silva

Purificação, propriedades físico-químicas e estudo das atividades inseticida, fungicida e citotóxica de uma lectina presente em sementes de *Koelreuteria paniculata* / Daniela Carla da Silva Damico.—

Campinas, SP: [s.n.], 2002

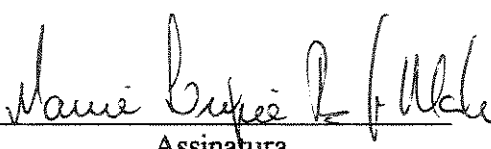
Orientadora: Maria Lígia Rodrigues Macedo

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1. Lectina. 2. Inseticida. 3. Sapindaceae. 4. Fungicida. 5. Citotóxica.
I. Macedo, Maria Lígia Rodrigues. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Campinas, 25 de fevereiro de 2002

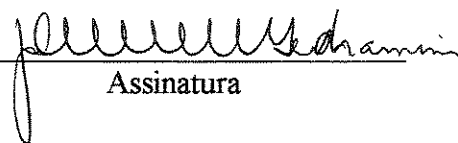
BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Lígia Rodrigues Macedo (Orientadora) 
Assinatura

Profa. Dra. Alba Regina Monteiro Souza Brito


Assinatura

Prof. Dr. José Djair Vendramim


Assinatura

Prof. Dr. Sérgio Marangoni


Assinatura

1070280

À minha mãe Adelina, que nunca mediu esforços para que eu pudesse realizar meus sonhos e objetivos, me apoiando e me incentivando em todas as circunstâncias da minha vida.

Ao meu amor André, pelo apoio, compreensão, paciência e amor dispensados durante toda a realização deste trabalho. Obrigada por tudo, te amo!!...

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Maria Lígia Rodrigues Macedo, pela orientação e ensinamentos passados e principalmente por me fazer acreditar e mostrar que, com muito trabalho e dedicação podemos vencer até os mais difíceis obstáculos.

Ao Prof. Dr. Sérgio Marangoni e ao Prof. Dr. José Camillo Novello, pela oportunidade, colaboração e apoio.

À Profa. Dra. Denise Vaz Macedo, ao Prof. Dr. Hiroshi Aoyama e ao Prof. Dr. Tomomasa Yano, pela participação no exame de qualificação onde puderam apresentar valiosas sugestões e observações importantes para revisão deste trabalho.

Aos professores Alba Regina Monteiro Souza Brito e José Djair Vendramim, por participarem da banca examinadora desta dissertação, valorizando assim o meu trabalho.

Aos demais professores do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia/Unicamp, pelos ensinamentos e cooperação.

À amiga Maria das Graças Machado Freire, pela valiosa ajuda que muito contribuiu para a realização deste trabalho.

A todos os colegas de laboratório, em especial à Silvana Pando, Gláucia C. de Mello, Daniela Beghini e Ana Paula Boleti, pela convivência e troca de experiências durante estes anos.

Aos demais colegas e funcionários do Departamento de Bioquímica, pelo agradável convívio e que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Paulo Baldasso e Marino, pelo apoio técnico constante e muitos "galhos quebrados".

As minhas queridas irmãs Karina e Paula, e aos meus sobrinhos Matheus, Ruan e Thiago, por serem simplesmente minhas irmãs e sobrinhos, os quais amo muito.

À Capes, pelo apoio financeiro.

ABREVIações	x
ABREVIações PARA AMINOácIDOS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
I. INTRODUÇÃO	1
1. Propriedades gerais das lectinas de plantas	3
2. Perdas na produção causadas por insetos	5
3. Classificação das Lectinas	7
3.1. Classificação Estrutural	7
3.2. Ocorrência	9
4. Propriedades e aplicações das lectinas vegetais	20
4.1. Atividade antiviral das lectinas de plantas	20
4.2. Atividade bactericida das lectinas de plantas	21
4.3. Atividade fungicida das lectinas de plantas	22
4.4. Atividade inseticida das lectinas vegetais	24
4.5. Efeito das lectinas na agregação plaquetária	27
II. OBJETIVOS	30
III. MATERIAIS E MÉTODOS	31
1. Material vegetal	31
2. Preparação da Farinha	33
3. Extração de proteína	33
4. Determinação da concentração de proteína	33
5. Determinação da concentração de proteína por densitometria	34
6. Determinação de carboidrato total	34
7. Atividade hemaglutinante sobre hemáceas humanas e de animais	34
7.1. Coleta e preparação dos eritrócitos	35
7.2. Determinação da atividade hemaglutinante	35
8. Métodos de Purificação	36
8.1. Cromatografia de Exclusão Molecular em coluna de Sephadex G-100	36
8.2. Cromatografia de Afinidade em coluna de Sepharose-tripsina	36

8.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência/ Fase reversa	37
9. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS	37
10. Determinação da massa molecular relativa	38
11. Análise de aminoácidos	39
12. Determinação da Estrutura N-terminal	40
12.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida e transferência	40
12.2. Procedimento da Seqüência	40
13. Caracterização Físico-Química de KpLec	41
13.1. Ensaio de inibição da atividade hemaglutinante por Carboidratos	41
13.2. Inibição da Atividade hemaglutinante por Agentes quelantes	42
13.3. Inibição da atividade hemaglutinante por Agentes redutores	42
13.4. Inibição da atividade hemaglutinante por enzimas proteolíticas	43
13.5. Efeito do pH na atividade hemaglutinante	43
13.6. Efeito da temperatura na atividade hemaglutinante	43
13.7. Tratamento com Metaperiodato de sódio (NaPIO ₄)	44
13.8. Tratamento com TFMS (ácido Trifluormetanosulfônico) e Anisol	44
14. Efeito na agregação plaquetária	45
14.1. Medida da Agregação Plaquetária	45
15. Efeito da lectina no crescimento de fungos	46
16. Criação dos insetos	46
16.1 Criação do inseto <i>C. maculatus</i> e preparação das sementes artificiais	46
16.2. Criação do inseto <i>A. kuehniella</i> e preparação da dieta artificial	47
17. Preparação das culturas celulares	48
17.1. Teste de Citotoxicidade	49
IV. RESULTADOS	50
1. Cromatografia em coluna de Sephadex G-100	51
2. Cromatografia em coluna de afinidade Sepharose-tripsina	51
3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência/ Fase reversa	52
4. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS	53
5. Determinação da massa molecular relativa	54

6.	Análise densitométrica	55
7.	Análise de aminoácidos	56
8.	Determinação da Estrutura N-terminal	57
9.	Dosagem de Carboidrato	57
10.	Atividade heamglutinante sobre hemáceas humanas e de animais	58
11.	Ação inibitória de açúcares sobre a atividade hemaglutinante	59
12.	Efeito do DTT e Uréia na atividade hemaglutinante	60
13.	Efeito do EDTA e EGTA na atividade hemaglutinante	60
14.	Estabilidade térmica de KpLec	61
15.	Estabilidade de KpLec em relação ao pH	62
16.	Efeito das enzimas proteolítica na atividade hemaglutinante	63
17.	Efeito do Metaperiodato de sódio (NaPIO ₄)	63
18.	Efeito do TFMS e Anisol	64
19.	Efeito na agregação plaquetária	64
20.	Efeito de KpLec no desenvolvimento de fungos	65
21.	Citotoxicidade em culturas celulares	66
22.	Atividade inseticida de KpLec sobre <i>C. maculatus</i>	67
23.	Atividade inseticida de KpLec sobre <i>A. kuehniella</i>	69
V.	DISCUSSÃO	72
VI.	CONCLUSÕES	86
VII.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

ÍNDICE DE FIGURAS

1.	Fêmeas de <i>Callosobruchus maculatus</i> infestando grãos de feijão	6
2.	Anagasta kuehniella adulta sobre grãos de milho	7
3.	Árvore, flores, fruto e sementes de <i>Koeleria paniculata</i>	32
4.	Cromatografia em coluna de Sephadex G-100	50
5.	Cromatografia em coluna de Sepharose-Tripsina	51
6.	Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa (HPLC)	52
7.	Eletroforese em PAGE-SDS das frações obtidas das etapas de purificação	53
8.	Determinação do peso molecular de KpLec em coluna de Superdex G-75	54
9.	Análise densitométrica de KpLec	55
10.	Efeito da temperatura na atividade hemaglutinante de KpLec	61
11.	Efeito do pH na atividade hemaglutinante de KpLec	62
12.	Perfil da agregação plaquetária	64
13.	Fotomicrografia após 60 h de incubação de KpLec com os fungos	65
14.	Efeito de KpLec sobre o crescimento dos fungos após 60 horas de incubação	66
15.	Fotomicrografia do efeito biológico produzido por KpLec em células Vero	67
16.	Porcentagem de larvas sobreviventes de <i>C. maculatus</i> alimentadas com KpLec	68
17.	Efeito sobre o peso médio de larvas de <i>C. maculatus</i> alimentadas com KpLec	68
18.	Efeito de KpLec no desenvolvimento de larvas de <i>C. maculatus</i> após 20 dias	69
19.	Porcentagem de larvas sobreviventes de <i>A. kuehniella</i> alimentadas com KpLec	70
20.	Efeito sobre o peso médio de larvas de <i>A. kuehniella</i> alimentadas com KpLec	71
21.	Efeito de KpLec no desenvolvimento de larvas de <i>A. kuehniella</i> após 24 dias	71

ÍNDICE DE TABELAS

1.	Composição de aminoácidos de KpLec	56
2.	Seqüência N-terminal de KpLec	57
3.	Atividade hemaglutinante de KpLec sobre diferentes eritrócitos	58
4.	Efeito de carboidratos sobre a atividade hemaglutinante	59

ABREVIACÕES

- ^{14}C -CM-Cys – carboximetilcisteína marcada radioativamente com carbono 14
- ADP – adenosina difosfato
- CAPS – 3-ciclohexil-amino-1-ácido propanosulfônico
- CRD – domínio de reconhecimento de carboidrato
- DTT – ditioneitol
- EDTA – ácido etilenodiamino tetracético
- EGTA – ácido etilenoglicol tetracético
- FPLC – cromatografia líquida rápida
- HPLC – cromatografia líquida de alta pressão
- KpLec – lectina de *Koelreuteria paniculata*
- MEM – meio mínimo essencial
- PAG – polinucleotídeo adenosina glicosidase
- PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida
- PHA – aglutinina de *Phaseolus vulgaris*
- PPP – plasma pobre em plaquetas
- PRP – plasma rico em plaquetas
- PSA – persulfato de amônio
- PTC – feniltiocarbamil
- PTH – feniltioidantina
- PVDF – polivinildileno difluoreto
- RIP – proteína inativadora de ribossomos
- SDS – dodecil sulfato de sódio
- SFB – soro fetal bovino
- TFA – ácido trifluoroacético
- TFMS – ácido trifluormetanosulfônico
- TEMED – N-N-N'-N'-tetrametilenodiamina
- WGA – aglutinina de germe de trigo
- VWF – fator de von Willebrand

ABREVIACÕES PARA AMINOÁCIDOS

Aminácidos	Abreviação	Símbolo
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Glutamina	Gln	Q
Ácido glutâmico	Glu	E
Glicina	Gly	G
Histina	Hys	H
Isoleucina	Iso	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

RESUMO

Neste trabalho, uma lectina presente em sementes de *Koelreuteria paniculata* (família: Sapindaceae), conhecida como “flor-da-china”, foi isolada e purificada a partir de extração em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,6), cromatografia de exclusão molecular (Sephadex G-100), cromatografia de afinidade (Sepharose-tripsina) e coluna de fase reversa C-18 μ -Bondapack (sistema HPLC). A pureza da lectina de *K. paniculata* (KpLec) foi verificada por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS, que revelou que esta lectina apresenta duas subunidades de massa molecular aparente de 22 e 44 kDa. Quando submetida ao tratamento com DTT, a lectina se encontra predominantemente em sua forma monomérica de 22 kDa. A massa molecular relativa estimada por gel filtração foi de 22 kDa. O extrato bruto de KpLec hemaglutinou todas as hemáceas humanas do sistema ABO e hemáceas de alguns animais como camundongo, rato, carneiro, boi e coelho. A atividade hemaglutinante de KpLec mostrou ser estável a diferentes pHs e temperaturas. Dentre os carboidratos testados, a atividade hemaglutinante foi melhor inibida por N-acetil-glicosamina. O tratamento de KpLec com EDTA mostrou que esta lectina requer cátions divalentes para sua atividade hemaglutinante. A determinação da seqüência N-terminal de KpLec mostrou que ela apresenta homologia com outras lectinas de plantas, principalmente com a *Urtica dioica* aglutinina. A lectina não inibiu o crescimento dos fungos *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum lindemuthianum* e *Saccharomyces cerevisiae* e nem inibiu ou estimulou a agregação plaquetária. Entretanto, KpLec foi capaz de causar efeitos citotóxicos em células Vero (células de rim de macaco verde Africano) e apresentou atividade inseticida contra duas espécies de insetos, *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera:Bruchidae) e *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera:Pyralidae).

ABSTRACT

A lectin from *Koelreuteria paniculata* (Sapindaceae) seeds, commonly known as "Goldenrain tree", was isolated and purified by 0,1 M phosphate buffer, pH 7,6, gel filtration chromatography (Sephadex G-100), affinity column (trypsin-sepharose) and reverse phase column C-18 μ -Bondapack (HPLC system). *K. paniculata* lectin's was assayed by polyacrylamide gel electrophoresis yielding two bands of 22 e 44 kDa. In reduced conditions, one main polypeptide chain of 22 kDa was obtained. A molecular weight of 22 kDa was estimated by gel filtration on Superdex G-75 column (FPLC system). The crude extract of KpLec agglutinated all human (ABO) system and animal erythrocytes from mice, rats, sheep, cow and rabbit. The hemagglutination activity of Kplec showed stability to distincts pHs and temperatures. Of the various sugars tested, the lectin was best inhibited by N-acetil-glucosamine. The treatment of KpLec with EDTA shows that this lectin need metal ions for its hemagglutination activity. Determination of the lectin N-terminal sequence showed that KpLec present homology with plant lectins, mainly with *Urtica dioica* agglutinin. The lectin did not inhibit the growth of the fungi *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum linndemuthianum* and *Saccaromyces cerevisiae*. KpLec didn't induce nor inhibited the platelet aggregation. However, KpLec showed citotoxical effects in Vero cells and presented insecticidal activity against two insects pests, *Callosobruchus maculatus* and *Anagasta kuehniella*.

I. INTRODUÇÃO

A primeira descrição de uma lectina data de antes de 1888, quando Stillmark publicou sua dissertação intitulada "Ricina, um fermento tóxico de sementes de *Ricinus communis* L. e algumas outras espécies de euforbiáceas". Embora, agora esteja evidente que a ricina de Stillmark era uma complexa mistura de moléculas tóxicas de ricina e aglutininas não tóxicas, seu trabalho pioneiro foi um marco na biologia, porque foi o primeiro a unir a toxicidade da mamona à ocorrência de um fator protéico hemaglutinante. Além disso, sua descoberta foi também um marco na bioquímica de plantas porque "ricina" foi a primeira proteína vegetal cuja atividade biológica pôde ser determinada. Logo após, substâncias tóxicas similares a ricina foram identificadas em sementes de *Croton tiglium* (crotina), *Abrus precatorius* (abrina) e em casca de *Robinia pseudoacacia* (robina). Em 1898, Elfstrand introduziu pela primeira vez o termo "hemaglutinina" como um nome comum a todas as proteínas vegetais que causam aglutinação de células. Este novo termo foi claramente inspirado na similaridade entre a visível atividade macroscópica das proteínas vegetais e a das aglutininas do soro humano e animal, primeiramente descrito por Landois em 1875.

A idéia de que a toxicidade é uma propriedade intrínseca das lectinas foi abandonada no começo do século XX, depois que Landsteiner e Raubitschek (1907) relataram pela primeira vez a presença de uma lectina não tóxica nos legumes *Phaseolus vulgaris* (feijão), *Pisum sativum* (ervilha), *Lens culinaris* (lentilha), e *Vicia sativa*. Após o trabalho de Landsteiner e Raubitschek, muitas outras hemaglutininas vegetais não tóxicas foram descobertas. Tornou-

se, a partir de então, evidente que lectinas estão difundidas no reino vegetal e que a toxicidade atribuída às mesmas, é exceção, e não regra.

O próximo marco na história das lectinas vegetais foi a descoberta de que algumas hemaglutininas exibem uma clara preferência a eritrócitos de um grupo particular de tipo sanguíneo humano dentro do sistema ABO (Renkonen, 1948; Boyd & Reguera, 1949). A descoberta da especificidade a grupos sanguíneos foi o motivo direto da introdução do termo "lectina" (do verbo latino *"legere"*, que significa selecionar).

A confusão atual na terminologia "lectina" se deve, em grande parte, ao fato de que diferentes nomes foram introduzidos antes que o mecanismo causador da atividade aglutinante, visível macroscopicamente, fosse entendido em termos moleculares (Van Damme et al., 1998). Embora Summer & Howell (1936) já tivessem observado que o açúcar de cana inibia a atividade aglutinante da concanavalina A (ConA), somente em 1952 foi demonstrado que a propriedade de aglutinação das lectinas estava baseada numa atividade específica de ligação com açúcar (Watkins & Morgan, 1952). Assim que as lectinas foram reconhecidas como proteínas ligantes de carboidratos elas puderam ser distinguidas de outras proteínas com base num critério funcional bem definido. Por esta razão, atualmente as lectinas são consideradas como proteínas ligantes de carboidratos ao invés de (hem) aglutininas.

Lectinas são definidas como proteínas de origem não imune, que aglutinam células e glicoconjugados e são capazes de se ligar reversível e especificamente a carboidratos e substâncias que contenham açúcar, sem alterar a estrutura covalente de nenhum ligante glicosil (Peumans and Van Damme, 1995).

1. Propriedades gerais das lectinas de plantas

O passo inicial na purificação de lectinas de diferentes fontes envolve preparação de extratos em solução salina ou em uma solução tampão (Kennedy et al., 1995). Muitos extratos contendo lectinas ainda são parcialmente purificados por exaustiva diálise (Sage & Green, 1972), fracionamento dependente de pH (Suzuki et al., 1979) ou fracionamento com sais; um dos mais utilizados é o sulfato de amônio, que garante alta força iônica (Moreira & Oliveira, 1983).

Várias técnicas convencionais contribuem para a purificação de lectinas, baseadas na carga ou tamanho da proteína. Para purificar lectinas, colunas de troca-iônica, DEAE celulose, CM-celulose, DEAE-Sephadex e DEAE Sepharose, tem sido sucessivamente usadas (Kolberg & Sletten, 1982). Cromatografias de exclusão molecular, principalmente as Sephadex, também são muito usadas como matrizes de exclusão molecular na purificação de lectinas (Kennedy et al., 1995).

A aplicação de cromatografia de afinidade na purificação de lectinas é baseada principalmente na habilidade de estas proteínas se ligarem a carboidratos de maneira específica e reversivelmente. As lectinas têm a vantagem de não modificarem os componentes com as quais elas interagem e a ligação é reversível (Lis & Sharon, 1981). Lectinas específicas para glicose/manose ou seus derivados podem usar Sephadex, como G-50, G-100, G-200 (Borreback & Rougé, 1986). Lectinas com especificidade para N-acetilglicosamina e seus oligossacarídeos, podem usar quitina como matriz de afinidade (Kochibe & Matta, 1989). Já aquelas específicas para galactose e seus derivados podem ser

purificadas usando agarose (Nicolson & Blaustein, 1972) ou Sepharose (Shet & Madaiah, 1989).

As lectinas de plantas são usualmente glicoproteínas, com variável conteúdo de carboidratos; entretanto, podemos citar dois exemplos que fogem a esta regra, como a lectina de *Dioclea guianensis* (Vasconcelos et al., 1990) e a lectina de *Canavalia brasiliensis* (Moreira & Cavada, 1984), que não são glicoproteínas.

As lectinas de leguminosas são geralmente ricas em ácido glutâmico, glutamina, ácido aspártico, asparagina, serina e treonina, mas pobres em aminoácidos que contém enxofre (Sharon & Lis, 1990). Entretanto, o aminoácido predominante nas lectinas de Solanaceae é a hidroxiprolina e nas lectinas de Graminaceae são glicina e cisteína (Gabijs, 1997).

O peso molecular das lectinas de plantas é muito variado; em geral elas são oligômeros, e a estrutura tetramérica é comumente encontrada, como nas lectinas de *Canavalia ensiformis* (Goldstein & Poretz, 1986) e *Dioclea grandiflora* (Moreira et al., 1983).

Lectinas vegetais apresentam alta estabilidade a variações de temperatura e pH, e resistem a uma grande variedade de enzimas proteolíticas, característica comum à maioria das proteínas que estejam diretamente envolvidas no mecanismo de defesa de plantas (Peumans & Van Damme, 1995). Muitas proteínas relatadas como de defesa, como por exemplo, quitinases e glucanases (Linthorst, 1991), inibidores de protease (Ryan, 1990), proteínas fungicidas (Broekaert et al., 1992), inibidores de α -amilase (Huesing et al., 1991), tioninas (Bohlmann et al., 1988) e proteínas inativadoras de ribossomo (Barbieri et al., 1993) sobrevivem a tratamentos que inativariam proteínas celulares normais.

2. Perdas na produção causadas por insetos

Existe uma contínua necessidade de aumentar a produção agrícola mundial para satisfazer a demanda progressiva da população. Para que este aumento ocorra é fundamental melhorar o rendimento das colheitas (Hilder & Boulter, 1999).

Milho (*Zea mays*), trigo (*Triticum aestivum*), soja (*Glycine max*), e principalmente variedades de feijão (*Vigna unguiculata* e *Phaseolus vulgaris*) são os grãos que representam uma grande parte da fonte protéica na alimentação humana e de animais (Duranti et al., 1997). Uma grande quantidade da produção destes grãos é perdida durante o armazenamento por causa de danos causados por diversas pragas, como pequenos roedores, fungos e, principalmente, por insetos (Hilder & Boulter, 1999).

Dentre as espécies de insetos responsáveis por tais danos encontramos as que pertencem às ordens Coleoptera e Lepidoptera. Os coleópteros da família Bruchidae são de maior importância em relação à infestação de feijões, sendo mencionadas as principais espécies de grãos estocados: *Acanthoscelides obtectus* (Say), *Zabrotes subfasciatus* (Boh.) e *Callosobruchus maculatus* (Fabr.) (Singh et al., 1985). Este último representa a principal praga de *V. unguiculata* durante o seu armazenamento (fig. 1). Em períodos severos de infestação, a perda destes feijões armazenados após colheita, pode atingir até 100% em um período de 6 meses, devido ao ataque do bruquídeo *C. maculatus* (Hall et al., 1997).



Figura 1- Fêmeas de *Callosobruchus maculatus* infestando grãos de feijão (Foto de J. W. Stewart).

O lepidóptero *Maruca vitrata* (Fabr.), da família Pyralidae, é responsável por 20-80% das perdas de vagens de caupi em condições de campo na África, Ásia e América Latina (Machuka et al., 1999). Entretanto, os insetos *Chilo partellus* (Law & Kfir, 1997) e a traça-da-farinha, *Anagasta kuehniella* (Locatelli & Biglia, 1995) são pragas tanto de grãos armazenados quanto de campo.

A. kuehniella é encontrada amplamente pelo mundo. Dependendo da temperatura e umidade, uma fêmea pode colocar até 562 ovos. A temperatura favorável é de 26 a 28°C, onde o tempo de desenvolvimento de uma geração varia de 43 a 72 dias, e de 140 a 243 dias à temperatura de 10 °C. Os ovos são depositados próximo aos produtos dos quais se alimentam. As larvas movem-se rapidamente, alimentando-se e lançando fios de seda que formam teias. Estes fios de seda formam massas compactas que podem chegar a obstruir tubos e condutos de moinhos de trigo, além de servirem como refúgio a outros insetos que danificam grãos e produtos armazenados (Habib & Fagundes, 1996).

Estas larvas crescem e se transformam em pupas nos próprios produtos que estão infestando. Quando adultas, param de se alimentar e têm vida curta, aproximadamente 14 dias (fig. 2).

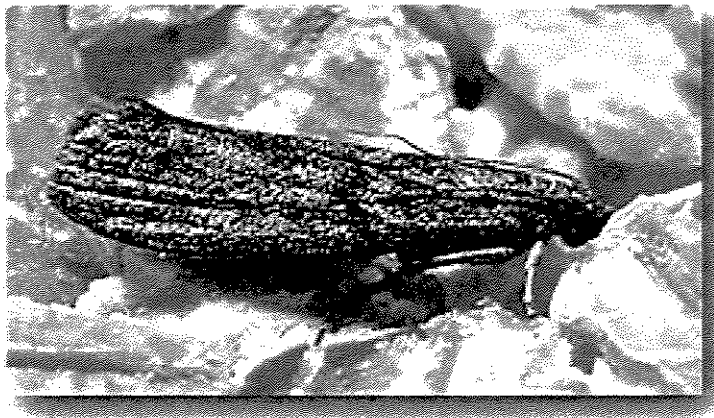


Figura 2 - *Anagasta kuehniella* adulta sobre grãos de milho (Foto de Van Waters & Rogers).

3. Classificação das lectinas

3.1. Classificação estrutural

Devido a uma ampla variedade de proteínas com diferentes propriedades hemaglutinantes e/ou de precipitação de glicoconjugados, que se enquadravam dentro da definição de lectinas, elas foram subdivididas em:

- a) **Merolectinas**: apresentam um único domínio de ligação a carboidratos. Por definição elas são monovalentes, e conseqüentemente, incapazes de precipitar glicoconjugados ou

aglutinar células. Heveína, uma pequena proteína do látex de seringueira (*Hevea brasiliensis*), que se liga à quitina, é uma típica merolectina (Van Parijs et al., 1991).

- b) **Hololectinas**: são também compostas de domínio de ligação a carboidratos, mas contém pelo menos dois desses domínios que são idênticos ou muito similares, e ambos se ligam ao mesmo açúcar ou a açúcares estruturalmente similares. Hololectinas são por definição bivalentes ou multivalentes e, por isso, aglutinam células e/ou precipitam glicoconjugados. A maioria das lectinas vegetais pertence ao subgrupo das hololectinas. A concanavalina A (ConA) é um exemplo de lectina deste grupo (Peumans and Van Damme, 1998).
- c) **Quimerolectinas**: são lectinas compostas de um ou mais domínios de ligação a carboidratos e um domínio relacionado à atividade catalítica, que atua independentemente do(s) domínio(s) de ligação de carboidratos. Dependendo do número de sítios de ligação a carboidratos, as quimerolectinas se comportam como merolectinas ou como hololectinas. Um representante deste grupo é a proteína inativadora de ribossomos (RIP tipo 2), como por exemplo a ricina (toxina da mamona), a qual possui dois domínios de ligação para carboidratos comportando-se como uma hololectina (Peumans and Van Damme, 1998).
- d) **Superlectinas**: como as hololectinas, as superlectinas consistem exclusivamente de pelo menos dois domínios de ligação para carboidratos. Entretanto, diferentemente das hololectinas, os domínios de ligação para carboidratos das superlectinas reconhecem açúcares estruturalmente diferentes. As superlectinas podem também ser consideradas um grupo especial de quimerolectinas compostas de dois domínios de ligação para carboidratos independentes estrutural e funcionalmente. Esta natureza quimérica é

exemplificada pela lectina de tulipa (TxLC-I) que consiste de um domínio de ligação a manose N-terminal, seguido por um domínio não relacionado de ligação a N-acetilgalactosamina (Van Damme et al., 1996).

3.2. Ocorrência

3.2.1. Lectinas encontradas em bactérias

Sabe-se que várias bactérias produzem lectinas e proteínas lectina-like (Mirelman et al., 1986). Estas incluem exotoxinas, proteínas de superfície e pequenos apêndices como pili, que estão envolvidos na adesão específica de células bacterianas à superfície de células eucarióticas (Sharon, 1987). Depierreux et al. (1991) mostraram que no caso do *Agrobacterium tumefaciens*, a lectina reside na superfície bacteriana e o carboidrato da planta hospedeira atua como seu receptor.

Microcystes aeruginosa, uma cianobactéria, apresenta uma lectina de 57 kDa (MAL) com atividade hemaglutinante contra eritrócitos de coelho, cavalo e de humanos do sistema ABO (Yamaguchi et al., 1998). MAL é uma glicoproteína, e é inibida principalmente por N-acetilgalactosamina e por glicoproteínas.

Meng et al. (1998) também verificaram a presença de lectinas na superfície de *Escherichia coli* k 88, *Salmonella choleraesuis* e *Bifidobacteria pseudolongum* presentes no sistema gastrointestinal de porcos. Embora a função exata de lectinas bacterianas ainda não esteja clara, acredita-se que elas desenvolvam um papel chave na mediação da adesão da bactéria às suas células hospedeiras (Mirelman & Okek, 1986).

Estudos de adesão bacteriana, realizados por Ko et al. (1987) com *Pseudomonas aeruginosa* vieram a comprovar o envolvimento de lectinas. A adesão *in vitro* e *in vivo* de *P. aeruginosa* foi mediada pelo ácido N-acetilneurâmico (carboidrato específico da lectina). C bloqueio dos sítios de ligação da lectina na superfície bacteriana com o carboidrato específico preveniu completamente o processo de adesão da bactéria *in vitro*. *In vivo*, o número de organismos aderidos em vários órgãos, diminuiu drasticamente na presença do ácido N-acetilneurâmico. Entretanto, carboidratos não específicos mostraram apenas efeitos desprezíveis (Ko et al., 1987).

A administração intratraqueal de N-acetilglicosamina inibe completamente a adesão de *Streptococcus pneumoniae* aos pulmões de camundongos Balb-C (Beth et al., 1987) e similarmente, a adesão de *Helicobacter pylori* ao epitélio gástrico é mediada por interação específica com o receptor de ácido siálico (Logan, 1996).

3.2.2. Lectinas encontradas em protozoários

A presença de lectinas tem sido documentada na ameba patogênica *Entamoeba histolytica*, que causa disenteria em humanos pela invasão e rompimento da mucosa intestinal (Mirelman and Ravdin, 1987; Ravdin, 1989). A lectina amebiana, não somente facilita a adesão da ameba às células do epitélio intestinal (Mirelman, 1987) como, durante estágios posteriores à infecção, facilitam a ligação do parasita a outras células/tecidos ou a bactérias, aumentando assim esta virulência. *In vitro*, vários sacarídeos inibem a adesão da ameba aos enterócitos e outras células alvo de mamíferos, o que sugere que a adesão da ameba seja mediada pela interação lectina-carboidrato (Singh et al., 1999).

3.2.3. Lectinas encontradas em fungos

A descoberta de lectinas presentes em fungos se iniciou através de pesquisas na toxicologia de fungos superiores, seguindo descobertas de toxinas de sementes com propriedades coagulantes do sangue, por exemplo, a ricina encontrada em *Ricinus communis* e a Abrina encontrada em *Abrus precatorius*, sendo que se buscava encontrar em fungos, moléculas com propriedades semelhantes às encontradas em plantas.

A primeira hemaglutinina presente em fungos foi descoberta em *Amarita muscaria* (Ford, 1910), seguido por pesquisas com fungos tradicionalmente comestíveis como *Boletus edulis* (Friedberger & Brossa, 1912) e *Lactarius deliciosus* (Galli-Vallerio & Bornand, 1916).

Certas espécies que apresentam parentesco possuem em comum alto conteúdo de lectinas; entretanto, nenhuma relação clara existe entre a ocorrência de lectinas e grupos sistemáticos (Guillot & Kanska, 1997). Certos gêneros, famílias e ordens são, porém notáveis para a porcentagem alta de espécies ativas; eles incluem, por exemplo, *Lactarius*, *Russula*, *Boletus*, *Phallus* e *Hygrophoraceae*. Ao contrário, outros como os heterobasidiomicetos, apresentam poucas espécies que contêm lectinas. A presença de lectinas pode estar relacionada com a fisiologia e ecologia dos fungos (Guillot & Kanska, 1997).

Algumas espécies mostraram conter não apenas uma, mas várias lectinas; estas lectinas podem estar relacionadas, diferindo apenas em seus pontos isoelétricos (isoelectinas), como aquelas isoladas de *Agaricus bisporus* (Sueyoshi et al., 1985), ou uma pequena variação no peso molecular e mudança de alguns aminoácidos por subunidade, como no caso das lectinas PCL-a, PCL-b e PCL-c de *Pleurotus cornucopiae* (Yoshida et al., 1994). Elas também podem diferir mais amplamente, exibindo especificidades diferentes,

como observado em *Laccaria amethystea*, onde uma lectina (LAF) se liga em fucose, enquanto a outra (LAL) é inibida por lactose (Guillot et al., 1983). Neste último caso, as duas lectinas são estruturalmente relacionadas, apesar de sua diferença na especificidade.

Nos últimos anos, várias lectinas têm sido purificadas de fungos como *Ganoderma lucidum* (Kawagishi et al., 1995), *Amanita pantherina* (Zhuang et al., 1996), do comestível *Lentinus edodis* (Wang et al., 1999) e do cogumelo *Mycoleptodonoides aitchisonii* (Kawagishi et al., 2001).

3.2.4. Lectinas encontradas em algas

Muitas algas marinhas liberam flúidos de suas glândulas, quando são perturbadas. Esta reação sugere que estes flúidos contenham fatores bioativos, no qual muitos atuam contra inimigos potenciais, já que os mecanismos de defesa destas algas marinhas diferem dos mecanismos de defesa altamente desenvolvidos pelos vertebrados (Cooper, 1980).

Entre as espécies pesquisadas, pode ser citado *Pilota plumosa*, *Agardhelia tenera*, *Cystoclonium purpureum*, *Gracilaria verrucosa*, *Palmaria palmata*, *Fucus vesiculosus*, *Codium fragile* (Rogers et al. 1988) e *Codium tomentosum* (Fabregus & Carracedo, 1989).

Recentemente, Ozeki (1998) purificou uma lectina da alga marinha *Aplysia kurodai* específica para galactose, que foi capaz de promover a adesão de células sarcoplasmáticas humanas e na presença do açúcar específico, a atividade da lectina foi completamente inibida. Outras lectinas do gênero *Aplysia* foram purificadas, como por exemplo, a lectina de gônadas da *A. depilans* (Wu et al., 2000) e a lectina de *A. dactylomela* (Melo et al., 2000), o

qual mostrou apresentar atividade bacteriostática principalmente contra *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris* e *P. aeruginosa*.

3.2.5. Lectinas encontradas em vírus

As lectinas de vírus têm sido discutidas em detalhes por Sharon & Lis (1989). O vírus da gripe possui uma molécula de glicoproteína na membrana que media a ligação. O mais velho, e talvez o melhor, sistema caracterizado, de reconhecimento lectina-carboidrato é aquele que governa a interação do vírus da gripe às suas células alvo (Paulson, 1985; Wiley & Skehel, 1987). Embora a habilidade do vírus em aglutinar eritrócitos seja conhecida desde 1941, mais de uma década se passou antes que fosse mostrado que o vírus humano se liga a eritrócitos e outras células pelo reconhecimento do ácido N-acetilneuramínico presente na superfície da célula, e que esta ligação é um pré-requisito para o início da infecção. Descobriu-se que a lectina presente na superfície do vírus da gripe, é composta de dois polipeptídeos, HA1 e HA2 (com pesos moleculares de 36 e 26 kDa, respectivamente), covalentemente ligados por pontes dissulfeto; quando associados não covalentemente, formam trímeros que se localizam na superfície viral.

3.2.6. Lectinas encontradas em plantas

3.2.6.1. Lectinas de leguminosas

Mais de 70 lectinas de leguminosas, pertencentes a diferentes subordens e espécies tem sido isoladas e caracterizadas, principalmente de sementes (Sharon & Lis, 1990).

Embora elas difiram em suas especificidades para carboidratos, elas são muito semelhantes em suas propriedades físico-químicas. Consistem usualmente de 2 ou 4 subunidades (25-30 kDa), cada subunidade com um sítio de ligação para carboidrato (Sharon & Lis, 1990). A primeira lectina de legume a ser completamente caracterizada foi a Concanavalina A (Con A) isolada de *Canavalia ensiformis*. Con A é uma proteína tetramérica, composta de 4 subunidades idênticas, onde cada uma contém 237 resíduos de aminoácidos e tem um peso de aproximadamente 26 kDa (Cunningham et al., 1975). O sítio de ligação para carboidrato da Con A foi bem definido, e é específico para glicose e manose (Becker et al., 1976).

Outras lectinas de legumes, que se ligam a manose e glicose, também foram caracterizadas. Estas incluem favina de *Vicia faba* L. (Hemperley et al., 1979) e as lectinas de *Lens culinaris* (Loris et al., 1993), *Pisum sativum* (Einspahr et al., 1986) e *Castanea crenata* (Nomura et al., 1998)

Várias lectinas de leguminosas já têm suas estruturas cristalográficas depositadas nos bancos de proteínas, como PHA-L (Hamelryck et al., 1995), a lectina de *Lathyrus ochrus* (Rougé & Cavada, 1984), a lectina de amendoim (Banerjee et al., 1994), a lectina de soja (Dessen et al., 1995), e a lectina de *Griffonia simplicifolia* (Delbaere et al., 1993).

Muitas lectinas de leguminosas apresentam atividades biológicas importantes, como a lectina isolada de *Abrus pulchellus* (Ramos et al., 1998), que se mostrou extremamente tóxica quando injetada na cavidade peritoneal de camundongos ou quando testada com o crustáceo *Artemia salina*. Outros exemplos são o efeito inflamatório e antiinflamatório desempenhado pela lectina de soja (Benjamin et al., 1997), e a atividade inseticida da lectina de *L. ochrus* sobre larvas de *Drosophila melanogaster* (Triguéros et al., 2000).

3.2.6.2. Lectinas ligantes de quitina

São encontradas em cinco famílias não relacionadas taxonomicamente: *Gramineae*, *Solanaceae*, *Urticaceae*, *Papaveraceae* e *Amaranthaceae*.

Por definição, a família das lectinas que se ligam à quitina compreende todas as proteínas que contenham pelo menos um domínio heveína. O termo “domínio heveína” refere-se a uma pequena proteína, de 43 aminoácidos, extraída do látex da seringueira, a *Hevea brasiliensis* (Waljuno et al., 1975). Apesar de serem moléculas pequenas, as heveínas possuem um sítio bastante ativo para ligação à quitina.

Todas unidades estruturais de aproximadamente 40 resíduos de aminoácidos que exibem seqüência similar à heveína e que possuem capacidade de se ligar à quitina, são consideradas “domínio heveína”. Deve-se ressaltar que há também lectinas que se ligam à quitina sem apresentarem esse domínio heveína. Por exemplo, as lectinas de *Cucurbitaceae* (família Leguminosea) que não mostram seqüência similar ao domínio heveína (Van Damme et al., 1998).

3.2.6.3. Proteínas inativadoras de ribossomos tipo 2

Proteínas que inativam ribossomos (RIP) são comumente conhecidas como proteínas que cataliticamente inativam ribossomos eucarióticos (Barbieri et al., 1993). O mecanismo de ação delas é baseada na remoção enzimática de um resíduo adenina específico de uma região altamente conservada (A.4324 de RNAr de ratos) na subunidade maior do RNA ribossomal. A clivagem deste resíduo específico de adenina causa uma mudança conformacional, impedindo a ligação do fator de alongação 2-(EF2) ao ribossomo. Como resultado, a síntese de proteína é impedida e as células morrem.

Durante os últimos anos, evidências convincentes têm sido apresentadas de que a atividade enzimática das RIP não é restrita a simples resíduos de adenina de ribossomos eucarióticos ou RNAr. A maioria das RIP são realmente capazes de remover múltiplos resíduos de adenina, de vários polinucleotídeos como RNA, DNA e polimerase (A). Consequentemente, o termo polinucleotídeo adenosina glicosidase (PAG) seria mais apropriado (Barbieri et al., 1996).

Várias proteínas inativadoras de ribossomo do tipo 2 têm sido isoladas de plantas pertencentes a famílias não relacionadas taxonomicamente. Todas as RIP-tipo 2 são proteínas quiméricas, compostas de uma cadeia A cataliticamente ativa, que é ligada covalentemente através de pontes dissulfeto à cadeia B, que possui um ou mais sítios de ligação a carboidratos (Van Damme et al., 1998). Muitas podem entrar em células intactas por endocitose, depois que sua cadeia B se ligar a glicoreceptores na superfície da célula. Uma vez dentro da célula, a cadeia A pode então chegar ao citosol e inativar os ribossomos, resultando na morte da célula. A RIP-tipo 2 é uma típica lectina da família das

quimerolectinas e como exemplo podemos citar a ricina, uma lectina isolada de *R. communis* e a abrina de *Abrus precatorius*, que exercem atividade antitumoral, baseado na inibição de síntese protéica (Lin & Li, 1980).

3.2.6.4. Lectinas de monocotiledôneas ligantes de manose

O termo "lectinas de monocotiledôneas ligantes de manose" refere-se à superfamília das lectinas estritamente específicas a manose, o qual até agora tem sido exclusivamente encontrada no subgrupo das plantas monocotiledôneas (Peumans & Van Damme, 1996).

Todas as lectinas de monocotiledôneas ligantes de manose consistem de subunidades com seqüência similar e estrutura tridimensional semelhante. Elas ocorrem em pelo menos cinco famílias diferentes: *Amaryllidaceae*, *Alliaceae*, *Araceae*, *Liliaceae* e *Orchidaceae* (Van Damme et al., 1998).

Duas lectinas classificadas neste grupo exercem atividade inseticida sobre o lepidóptero *Maruca vitrata*, a aglutinina purificada de *Listera ovata* (Orchidaceae) e a aglutinina de bulbos de *Galanthus nivalis* (Amaryllidaceae) (Machuka et al., 1999a).

Uma lectina purificada de bulbos de alho (*Allium sativum*) é um outro exemplo clássico de lectinas deste grupo; esta proteína exerce atividade antitumoral e induz células tumorais a apoptose (Karasaki et al., 2001).

3.2.6.5. Lectinas relacionadas à jacalina

Jacalina, uma lectina específica para galactose, de sementes de jaca (*Artocarpus integrifolia*) é uma clássica lectina de plantas não leguminosas (Peumans & Van Damme, 1998). Atualmente, o termo “lectinas relacionadas à jacalina” é usado como um nome comum a todas as lectinas que são estruturalmente e evolutivamente relacionadas à lectina da jaca. A família das jacalinas compreende dois subgrupos de lectinas. O primeiro subgrupo compreende as lectinas de semente da família *Moraceae*, específicas para N-acetilgalactosamina, as quais são muito similares a lectina de jaca.

O segundo subgrupo compreende as lectinas da família *Convolvulaceae*, que apresentam sequência similar à da lectina de *Moraceae*, mas exibem especificidade para manose/maltose (Van Damme et al., 1996).

Como exemplo de lectinas relacionadas à jacalina, pode ser citado três lectinas da família das *Moraceae*, a lectina de sementes de *A. incisa* (Moreira et al., 1998), a lectina de sementes de *A. lakoocha* (Wongkham et al., 1995) e a lectina de folhas de amora branca (*Morus alba*), que é capaz de induzir à aglutinação da bactéria fitopatogênica *Phaseolus syringae* pv *mori* (Ratanapo et al., 2001).

3.2.7. Lectinas encontradas em animais

As lectinas isoladas de animais foram divididas em dois grupos principais: lectinas do tipo C e lectinas do tipo S. As lectinas tipo C requerem íons Ca^{2+} para sua atividade; seus resíduos de cisteína estão ligados formando pontes dissulfeto; possuem solubilidade variável

e são localizadas principalmente no ambiente extracelular. As lectinas tipo S, não requerem Ca^{2+} para sua atividade; suas cisteínas encontram-se como grupos tióis livres; são solúveis em tampão, sendo localizadas tanto extracelularmente como intracelularmente e apresentam maior especificidade para açúcares que contêm β -galactosídeos (Drickamer, 1988).

Também chamadas de lectinas solúveis ligantes de β -galactosídeos, as lectinas tipo S são ácidas, têm baixa massa molecular e, geralmente, são compostas de subunidades de 14 kDa a 16 kDa. Requerem grupos tióis livres para sua ligação a carboidratos, tanto que, quando oxidadas, perdem sua atividade (Drickamer, 1988). Quanto à estrutura primária, sua sequência é altamente conservada (66 a 92%) em diversos tecidos e organismos, sugerindo que estas proteínas derivam de um gene ancestral comum (Ali, 1991).

As galectinas fazem parte das lectinas tipo S e possuem uma sequência característica e uma massa molecular de 14 kDa por subunidade (Barondes et al., 1994b). Em mamíferos, as galectinas parecem estar envolvidas na regulação do crescimento e da adesão celular, assim como na migração de células. Têm também papel importante na neoplasia e nas respostas imunes (Barondes et al., 1994a).

Quanto ao papel desempenhado pelas lectinas na resposta imune, Powell & Vark (1995) descreveram uma família de lectinas tipo 1, que seriam originadas da superfamília das imunoglobulinas. As lectinas tipo 1 são proteínas integrais de membrana e possuem amplos domínios citosólicos com potenciais sítios de fosforilação. Estas proteínas hemaglutinantes que não necessitam de cálcio para sua atividade, possuem um domínio de reconhecimento de carboidratos: CRD-Tipo S. Este CRD é definido entre 36 resíduos de aminoácidos conservados e 19 invariantes. Nenhum resíduo de cisteína é invariante neste tipo de CRD, já

que estas proteínas possuem estes resíduos como grupamentos tióis livres (Drickamer e Taylor, 1993).

Nas lectinas tipo C, o CRD é caracterizado por um domínio constituído de cerca de 100 a 130 resíduos de aminoácidos. Este CRD-Tipo C foi identificado em várias proteínas ligantes a carboidratos, através de um grupo de resíduos invariantes que se localiza em posições distintas, dependendo da proteína, sendo que, em média, 15 resíduos são conservados e estão nas mesmas posições relativas (Drickamer, 1988).

Apesar do CRD estar associado com a ligação da lectina ao açúcar específico, a sua presença não implica que a proteína que o possua tenha necessariamente atividade de ligação a carboidratos (Drickamer, 1993).

Estas regiões da cadeia polipeptídica, onde estão os resíduos conservados do CRD, não devem ser vistas como entidades independentes, pois a capacidade da lectina de se ligar a carboidratos é modulada também por vários outros domínios presentes na molécula (Gabijs, 1994). As interações do CRD com outros domínios adicionais determinam muitas das funções das lectinas (Drickamer e Taylor, 1993).

4. Propriedades e aplicações das lectinas vegetais

4.1. Atividade antiviral das lectinas de plantas

Com exceção das já descritas proteínas inativadoras de ribossomos tipo 2 (RIP-Tipo 2), nenhuma outra lectina de planta tem sido descrita como inibidora da infecção viral, replicação, ou propagação sistêmica (Peumans & Van Damme, 1995). Apesar disso, esta

falta de evidência não impede um possível efeito antiviral das lectinas de plantas. Devem ser mencionados neste contexto que, várias lectinas de plantas são potentes inibidoras *in vitro* de vírus animais e humanos, que apresentam glicoproteínas (Balzarini et al., 1992). Algumas lectinas de planta desempenham um papel antiviral indireto, como por exemplo, lectinas com função inseticida podem prevenir e ou reduzir a propagação de insetos que transmitem a infecção viral.

4.2. Atividade bactericida das lectinas de plantas

A parede das bactérias não somente previne qualquer interação entre glicoconjugados de suas membranas e proteínas que se ligam a carboidratos, mas também evita que estas proteínas penetrem no citoplasma. Desta maneira, lectinas de plantas não podem alterar a estrutura e/ou permeabilidade da membrana, ou alterar o processo intracelular normal de invasão destes micróbios. Entretanto, se as lectinas desenvolveram um mecanismo de defesa de plantas contra bactérias, deve ser indiretamente, baseando-se na interação com carboidratos da parede celular ou glicanos extracelulares (Peumans & Van Damme, 1995).

Isto tem sido sugerido, por exemplo, para a lectina de batata, que imobilizou cepas avirulentas de *Pseudomonas solanacearum* na parede da célula do vegetal (Sequeira & Graham, 1977). Interações entre lectinas e bactérias, que são patogênicas para o homem, têm sido estudadas extensivamente com o objetivo de se buscar um potencial diagnóstico (Calderon et al., 1997). Uma lectina N-acetilglicosamina específica de *Cyphomandra*

betaceaea mostrou inibir o crescimento de algumas bactérias fitopatogênicas (Nieva- Morenc et al., 1997).

Um outro mecanismo de defesa indireto é o bloqueio dos movimentos normais de motilidade da bactéria pelas lectinas (Broekaert and Peumans, 1986). Recentemente foram descobertas duas lectinas ácido N-glicolilneurâmico específicas, de folhas de amora capazes de aglutinar especificamente a bactéria patogênica *P. syringae pv mori*. Da mesma forma, outras lectinas vegetais têm efeito sobre esta bactéria, como a lectina de *G. simplicifolia* (GS I), Con A, WGA, a lectina de amendoim (*Arachis hypogaea*), e a lectina de lentilha (*Lens culinaris*) (Ratanapo et al., 2001).

4.3. Atividade fungicida das lectinas de plantas

Visto que lectinas de plantas não podem se ligar a glicoconjugados na membrana dos fungos ou penetrar no citoplasma das células por causa da presença de uma compacta e rígida parede celular, uma interferência no crescimento e desenvolvimento desses organismos parece improvável. Entretanto, efeitos indiretos, baseados na ligação das lectinas a carboidratos expostos na superfície da parede celular dos fungos são possíveis (Peumans & Van Damme, 1995).

Pela natureza de sua especificidade, lectinas que se ligam à quitina parecem provavelmente ter um papel na defesa de plantas contra fungos. Estudos *in vitro* demonstraram que WGA inibe a germinação de esporos e crescimento de hifas de *Trichoderma viride*, hipótese fortemente sustentada, até ser mostrado que a inibição do

crescimento do fungo foi devido à contaminação por quitinases nas preparações da lectina (Schlumbaum et al., 1986). Embora esta revelação tenha comprometido a proposta da atividade fungicida das lectinas de plantas, uma prova mais definitiva foi obtida quando se demonstrou que lectinas de urtiga (*Urtica dioica* aglutinina), livre de quitinases, inibiram o crescimento de *Botrytis cinerea*, *Trichoderma hamatum* e *Phycomyces blakesleeana* (Broekaert et al., 1989). O mecanismo exato de ação da lectina de urtiga (UDA) ainda não foi elucidado, mas somente a síntese da parede celular parece ser afetada, como resultado do distúrbio da síntese e/ou deposição de quitina (Van Parijs et al., 1992).

Várias outras proteínas de plantas que se ligam à quitina apresentam propriedades fungicidas. O primeiro grupo é o das merolectinas, que se ligam à quitina, constituído de pequenas proteínas compostas de um domínio simples de ligação à quitina. A heveína, uma pequena proteína purificada do látex da seringueira (*Hevea brasiliensis*) apresentou atividade fungicida comparável a lectina de urtiga, sendo proposto que as propriedades fungicidas da UDA e da heveína estejam relacionadas com o pequeno tamanho destas moléculas (Van Parijs et al., 1991).

Outras proteínas do mesmo grupo, como, por exemplo, as tioninas que se ligam à quitina, foram capazes de inibir o crescimento de bactérias gram positivas e negativas, fungos, células de mamíferos e insetos (Florack & Stiekema, 1994). Recentemente, outro peptídeo antimicrobiano, com domínio de ligação à quitina, foi purificado de folhas de *Ginkgo biloba* (Huang et al., 2000). Este peptídeo mostrou inibir o desenvolvimento de quatro fungos fitopatogênicos, *Pellicularia sasakii*, *Alternaria alternata*, *Fusarium graminearum* e *Fusarium moniliforme*.

WGA também inibiu o crescimento de fungos do gênero *Fusarium*. A ligação de WGA à parede celular de *F. oxysporum* e *F. graminearum*, além de causar inibição do crescimento destes fungos, foi capaz de afetar a integridade da parede celular (Ciopraga et al., 1999).

Santiago et al. (2000) purificaram um lectina de sementes de milho (galactose-específica), que foi capaz de inibir a germinação e crescimento celular do fungo *Ustilago maydis*, enquanto Con A (manose/glicose específica) ativou o crescimento e a germinação de esporos, sugerindo que receptores contendo sacarídeos específicos participem na regulação do crescimento e maturação de esporos de *U. maydis*.

4.4. Atividade inseticida das lectinas vegetais

As células epiteliais, ao longo do trato digestivo de insetos fitófagos, estão diretamente expostas para que retenham ao máximo o alimento, tornando-se assim possíveis alvos para proteínas de defesa de plantas. Como as glicoproteínas são os principais constituintes dessas membranas, o lado luminal do intestino é literalmente envolto por sítios potenciais de ligação a lectinas presentes na dieta alimentar do inseto. Quando a lectina se liga a um receptor de glicoproteína provoca um efeito deletério local ou sistêmico no inseto que pode ter seu crescimento retardado ou mesmo morrer (Peumans et al., 1995).

A PHA (fitohemaglutinina) foi a primeira lectina a mostrar propriedade inseticida com base nos seus efeitos deletérios sobre larvas do bruquídeo *C. maculatus* (caruncho do feijão). Ironicamente, esta primeira indicação do papel protetor das lectinas contra insetos foi baseado num resultado falso-positivo, visto que os efeitos observados foram devido à

contaminação com inibidor de α -amilase (Huesing et al., 1991). Outros estudos indicam que a lectina de gérmen de trigo (*Triticum aestivum*), de tubérculo de batata (*Solanum tuberosum*), de sementes de amendoim (*Arachis hypogea*), de sementes de *Datura stramonium*, de arroz (*Oryza sativa*), de rizoma de urtiga (*U. dioica*) e de sementes de *Maclura pomifera*, tem um efeito inibitório no desenvolvimento de larvas de *C. maculatus* (Murdock et al., 1990; Huesing et al., 1991). Outros insetos como, as larvas da broca-do-milho (*Ostrinia nubilalis*) e as larvas de *Diabrotica undecimpunctata*, parecem ser mais sensíveis às lectinas do que carunchos que se alimentam de grãos de caupi (Czapla and Lang, 1990). A lectina de gérmen de trigo (WGA) e a lectina de sementes de *Bauhinia purpurea* (BPL) foram letais para larvas neonatas de *Ostrinia nubilalis* quando incorporadas na dieta na concentração de 2% (Peumans & Van Damme, 1998). Resultados promissores têm sido obtidos com algumas lectinas ligantes de manose de monocotiledôneas. Dietas com lectinas purificadas de bulbos de *Galanthus nivalis* e alho (*Allium sativum*) indicaram que elas são moderadamente ativas contra insetos pragas, como o caruncho *C. maculatus* e o inseto do tabaco, a *Spodoptera litoralis* (Peumans et al., 1995). Mais importante, entretanto, a lectina de bulbos de *G. nivalis*, mostrou uma alta toxicidade a insetos sugadores, não somente em experimentos com dietas artificiais, mas também com plantas transgênicas (Hilder et al., 1995).

Estudos ultra-estruturais têm mostrado lectinas com atividade inseticida por ligação às células epiteliais do intestino médio de uma variedade de insetos (Powell et al., 1998). Técnicas como a microscopia eletrônica e a imunofluorescência foram usadas para elucidar o efeito letal, tecidos alvos e sítios de ligação da PHA (fitohemaglutinina) no intestino do

inseto *Lygus hesperus* (heteróptero), mostrando uma drástica ruptura do intestino médio e completo fechamento do lúmen (Habibi et al., 2000).

Harper et al. (1998) verificaram que larvas de *O. nubilalis* alimentadas com 0,05% (p/p) de WGA por 72 horas tiveram a formação e estrutura da membrana peritrófica alteradas, o que parece ser devido ao rompimento desta membrana, permitindo assim, um contato físico do alimento ingerido com as bordas das microvilosidades e eventual cessação da alimentação pela larva.

Law & Kfir (1997), no estudo comparativo dos efeitos de duas lectinas manose-específicas (lectina de amendoim e a lectina de ervilha) sobre o desenvolvimento do lepidóptero *Chilo partellus*, verificaram que as larvas deste inseto, quando alimentadas com 0,5% (p/p) da lectina de amendoim (*Arachis hypogaea*) tiveram uma redução de 46,2% no número de indivíduos. Nesta mesma concentração, nenhum efeito foi observado para a lectina de ervilha (*Pisum sativum*).

Várias lectinas, na concentração de 2%, como BDA (*Bryonia dioica* aglutinina), GNA (*G. nivalis* aglutinina), IRA (*Iris hybrid* aglutinina), LOA (*Listera ovata* aglutinina), e NPA (*Narcissus pseudonarcissus* aglutinina) mostraram reduzir em pelo menos 25% a pupação e emergência de adultos de *Maruca vitrata*, um lepidóptero que, na fase larval, é responsável por perdas de 20 a 80% de grãos de feijão, em condições de campo na África (Machuka et al., 1999).

Plantas de batata transgênica, expressando GNA (*G. nivalis* aglutinina) em níveis de 0,08% do total de proteínas solúveis, mostrou conferir resistência ao lepidóptero *Lacanobia oleracea* (Bell et al., 1999). GNA também reduziu a sobrevivência de ninfas de duas

importantes pragas do arroz (*Nephotettix virescens* e *Nilaparvata lugens*), quando alimentadas com arroz transgênico que expressava esta lectina (Foissac et al., 2000).

Embora seja muito provável que essa toxicidade seja baseada na ligação específica de glicoconjugados em algum lugar do intestino médio dos insetos, o mecanismo exato da ação das lectinas não é totalmente conhecido. Três tipos de interação são possíveis: (a) ligação lectina-quitina da membrana peritrófica; (b) ligação da lectina a glicoconjugados das células epiteliais ao longo do trato digestivo; e (c) ligação de lectinas a enzimas digestivas glicosiladas (Peumans et al., 1995).

4.5. Efeito das lectinas na agregação plaquetária

Plaquetas do sangue humano podem ser estimuladas por uma variedade de agentes, entre eles colágeno, trombina e adenosina difosfato (ADP). A consequência da ativação pela maioria desses agentes é a mesma e consiste na mudança de forma, na transformação de discóide para esférica, lançamento do conteúdo armazenado na organela, presença de íons cálcio, agregação, síntese de prostaglandinas e outras manifestações intracelulares (Shattil & Bennett, 1981). A maioria destes indutores não penetra na célula, mas é conhecido que a membrana plasmática é capaz de transmitir um sinal para o interior das plaquetas. Isto envolve a combinação do agente indutor com um receptor específico na superfície da plaqueta (Berndt & Phillips, 1981).

Glicoproteínas da membrana da plaqueta têm sido propostas como receptores para os agentes indutores (Phillips, 1980). A identificação e caracterização destes receptores

representa, portanto, um importante passo na elucidação de eventos na qual estas estruturas estão implicadas.

Uma das maiores glicoproteínas de membrana, a glicoproteína IIb (GPIIb), tem sido sugerida ser o receptor para o fator protéico von Willebrand (vWF), presente no plasma (Nurden & Caen, 1980; Jenkins et al., 1976; Cooper et al., 1979). vWF humano induz *in vitro* a agregação de plaquetas na presença do antibiótico ristocetina (Howard and Firkin, 1971) da mesma forma que o fator de origem bovina (fator VIII), sem ristocetina (Kirby, 1977).

As lectinas são potentes indutores da atividade plaquetária. A aglutinina de germe de trigo (WGA) atua nas plaquetas de uma maneira similar a muitos estímulos fisiológicos (Ganguly et al., 1979). Assim, WGA imobilizada pode ser usada no isolamento do receptor GPIIb. Experimentos mostram, entretanto, que o material isolado mostra contaminação de GPIIb com outras glicoproteínas de membrana, em particular a glicoproteína Ia (GPIa) (Clemetson et al., 1977). A relação entre a ligação da WGA a GPIIb e o efeito produzido ainda não está totalmente esclarecido. Foi mostrado claramente que a aglutinina de amendoim (PNA) a aglutinina de soja (SBA) induzem diferentes respostas em plaquetas tratadas com neuraminidases (Patscheke et al., 1977).

Outras lectinas têm sido analisadas, quanto à sua capacidade de se ligarem a plaquetas. A lectina de lentilha (*Lens esculenta*) se liga às plaquetas, mas não estimula a agregação plaquetária (Ganguly & Fossett, 1980). A Fitohemaglutinina (PHA) (Majerus & Brodie, 1972) e a aglutinina de germe de trigo (WGA) (Ganguly & Fossett, 1980) não somente se ligam às superfícies das plaquetas, mas ambas mediam a secreção e agregação plaquetária.

Uma proteína chamada convulxina, isolada e purificada por Prado-Franceschi & Vital Brazil, em 1981, constituinte do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (cascavel) é uma potente proteína que causa agregação plaquetária. Ela é muito similar e apresenta homologia com a botrocetina, uma proteína purificada de veneno de *Bothrops jararaca* (Andrews et al., 1989) e com a lectina de veneno da serpente *Crotalus atrox*, ambas sendo classificadas entre a família das lectinas do tipo C.

II. OBJETIVOS

Este trabalho teve por objetivo, fazer um estudo das sementes de *Koelreuteria paniculata* (Flor-da-china), com ênfase em seu conteúdo protéico, no que diz respeito às lectinas. Logo, pretendeu-se:

- Isolar e purificar a lectina presente em sementes de *Koelreuteria paniculata*;
- Realizar a caracterização físico-química desta lectina;
- Determinar a sequência do N-terminal e composição de aminoácidos;
- Realizar um estudo do papel biológico desta lectina:
 - a) analisando o possível envolvimento desta lectina na atividade fungicida;
 - b) verificar se esta proteína exerce algum efeito no processo de agregação plaquetária;
 - c) seu papel como uma lectina inseticida em relação aos insetos *Callosobruchus maculatus* e *Anagasta kuehniella*;
 - d) e sua citotoxicidade em relação a células Vero.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Material vegetal

Koelreuteria paniculata, conhecida também como Flor-da-china, é uma espécie pertencente à família *Sapindaceae* (Figura 3). É uma planta decídua, capaz de se adaptar a secas, requer pouca água, apresenta um crescimento rápido, tolera solos com baixa fertilidade, calor e poluição.

K. paniculata é de origem Oriental, sendo encontrada em abundância nos países como China, Coréia e Japão. Por suas características de fácil adaptação, é amplamente empregada em vários países do mundo, inclusive no Brasil, como uma árvore ornamental urbana. A árvore pode atingir alturas entre 6 a 12 metros; apresenta folhas alternas bipinadas e sua madeira não é considerada muito resistente. Sua florescência normalmente inicia-se em junho e prolonga-se até agosto. As vagens das sementes se assemelham a lanternas de coloração marrom-dourado. As sementes são pequenas, arredondadas, revestidas por uma casca de cor marrom e são encontradas em número de seis por fruto.

Neste trabalho foram utilizadas sementes de *K. paniculata*, coletadas no município de Campinas – São Paulo.



Figura 3 - Árvore, flores, fruto e sementes de *Koelreuteria paniculata*

2. Preparação da Farinha

As sementes de *K. paniculata*, após serem retiradas dos frutos, foram trituradas em moinho e peneiradas, até se obter uma farinha com granulação fina. Para se retirar o excesso de óleo contido nestas sementes, foi realizado um processo de delipidação utilizando hexano. Após secar a farinha, esta foi então submetida ao processo de extração.

3. Extração de proteína

Proteínas presentes nas sementes de *Koeleria paniculata* foram extraídas com tampão fosfato 0,1M, pH 7,6, na relação de 1:10 (p/v), sob agitação constante durante 12 horas à 4 ° C. Após a homogeneização, o material foi centrifugado a 3.000 x g durante 30 minutos, obtendo assim um precipitado que foi descartado, e um sobrenadante denominado por extrato bruto (E. B.), que foi utilizado nas etapas posteriores de purificação da lectina.

4. Determinação da concentração de proteína

A concentração de proteína foi determinada pelo método descrito por Bradford (1976). A concentração protéica foi avaliada utilizando albumina sérica bovina como padrão. O método consiste de 100 µl da amostra e 2,5 ml do reagente de Bradford. A leitura foi feita após 10 minutos de reação em espectrofotômetro a uma absorbância de 595 nm.

5. Determinação da concentração de proteína por densitometria

A análise densitométrica foi feita utilizando "Sharp-Scanner" para obtenção da imagem e programa Image Máster 1D-Elite (Amersham Pharmacia, Upsala, Suécia). O gel corado com Coomassie Blue teve a área e intensidade de cada banda quantificada usando-se os mesmos parâmetros de intensidade, resolução, luz, além de possuir uma amostra como padrão interno, para que fosse possível obter valores expressos em unidades arbitrárias.

6. Determinação de carboidrato total

O conteúdo de carboidrato total foi determinado pelo método descrito por Dubois et al. (1956). Usou-se glicose como padrão.

7. Atividade hemaglutinante sobre hemáceas humanas e de diferentes espécies animais

A detecção da existência de lectinas nas sementes de *K. paniculata* foi determinada através de ensaios de hemaglutinação. A atividade hemaglutinante foi testada sobre eritrócitos humanos e de animais (camundongo, rato, carneiro, boi, coelho, cavalo e hamster).

7.1. Coleta e preparação dos eritrócitos

O sangue foi coletado assepticamente e homogeneizado no dobro do volume de solução de Alsever (Bukantz et al., 1946) e centrifugado à 1.000 rpm por 5 minutos, à temperatura ambiente. Os eritrócitos foram lavados 4 vezes com solução NaCl 0,15 M (1:10 v/v). Foi preparado então, uma suspensão de eritrócitos a 2% (v/v) em NaCl 0,15 M.

7.2. Determinação da atividade hemaglutinante

Os testes de atividade hemaglutinante foram realizados em microplacas de 96 orifícios, os quais foram preenchidos com 50 µl de salina 0,15 M e, em seguida, acrescidos 50 µl da amostra nos primeiros poços das fileiras. A amostra foi então diluída serialmente, com agitação e transferência de 50 µl para o poço seguinte até o penúltimo poço da fila. Terminadas as diluições, foram adicionados 50 µl da suspensão de eritrócitos a 2 % (v/v).

As placas foram mantidas em repouso por aproximadamente 1 hora em estufa a 37 °C. A concentração mínima (ou maior diluição) que permite visualização dos eritrócitos hemaglutinados foi determinada.

Os poços que continham somente a suspensão de eritrócitos serviram como controle.

8. Métodos de Purificação

8.1 Cromatografia de Exclusão Molecular em coluna de Sephadex G-100

O extrato bruto (400 mg) das sementes de *K. paniculata* foi dissolvido em 5 ml de tampão fosfato 0,1M, NaCl 0,1M, pH 7,6, centrifugado e então aplicado em uma coluna (60 x 3,0 cm) de Sephadex G-100 previamente equilibrada com tampão fosfato 0,1M / NaCl 0,1M, pH 7,6. Foram coletadas frações de 3,0 ml por tubo, num fluxo de 30 ml/h, efetuando-se a leitura das mesmas em espectrofotômetro, a 280 nm. As frações protéicas obtidas foram analisadas quanto à sua atividade hemaglutinante, através de ensaios de hemaglutinação e perfil eletroforético.

8.2 Cromatografia de Afinidade em coluna de Sepharose-tripsina

A fração PII, obtida na cromatografia de exclusão molecular, que apresentou atividade hemaglutinante, foi dialisada, liofilizada e aplicada em uma coluna de afinidade Sepharose-tripsina. Esta resina foi equilibrada com tampão fosfato de potássio 0.1M, NaCl 0.1M, pH 7,6 e montada em coluna de vidro (2 x 15 cm). A eluição das frações proteicas foi feita com o mesmo tampão de equilíbrio, e a eluição do material retido na coluna foi feita com HCl 0,1 M, num fluxo de 40 ml/hora. A absorbância foi acompanhada em 280 nm.

8.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência/ Fase reversa

Para verificar a pureza do pico eluído da coluna de afinidade, bem como o grau de hidrofobicidade desta lectina, foi utilizado o sistema de HPLC Waters e coluna C-18 μ -Bondapak analítica. O gradiente utilizado foi um gradiente linear de 0 a 100%, por 60 minutos, de solução de acetonitrila 66% em 0,1% de ácido trifluoroacético sob fluxo constante de 1ml/min. As amostras foram monitoradas a 280nm e em seguida liofilizadas.

9. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS

A eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (PAGE-SDS) foi desenvolvida segundo o método de Laemmli (1970). A concentração utilizada para o gel de corrida (gel de separação) foi de 12,5% de poliacrilamida (proporção 30:0,8 de acrilamida:bisacrilamida) preparada em tampão Tris-HCL 0,4M, pH 8,8, contendo 0,2% de SDS, 0,025% de PSA (100 mg/ml) e 0,05% de TEMED, em volume final de 8 ml para cada gel. Após a polimerização do gel de corrida, foi preparado o gel superior (gel de aplicação) para aplicação das amostras. Para sua preparação foram utilizados 5% de acrilamida em 0,1M de tampão Tris-HCl, pH 6,8, contendo 0,5% de SDS, 0,025% de PSA (100 mg/ml) e 0,1% de TEMED, em um volume final de 2 ml.

Preparados os géis, a eletroforese em SDS-PAGE foi realizada em um sistema duplo de placas SE 250 Mighty Small (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA).

As amostras foram dissolvidas em tampão de amostra (tampão Tris/HCl 0,08 M, pH 6,8, contendo 10 % de glicerol, 0,002 % de bromofenol e 2 % de SDS). Para a preparação

das amostras reduzidas foi empregada uma solução de 1,0 M de ditioneitol no mesmo tampão. A corrida eletroforética foi realizada em temperatura ambiente, em tampão Tris/HCl 0,025M, glicina 0,18M, pH 8,3, contendo 0,1% (m/v) de SDS, com duração de aproximadamente 2 horas, sob corrente de 30 mA.

A coloração da placa, após a corrida foi feito em uma solução de Coomassie Blue R-250 0,25 % dissolvido em metanol, ácido acético e água destilada (4:1:5; v:v:v) durante duas horas. A remoção do excesso de corante para melhor visualização das bandas de proteínas foi efetuada por lavagem numa solução descorante, contendo metanol, ácido acético e água destilada (4:1:5; v:v:v).

10.Determinação da massa molecular relativa

A massa molecular relativa da lectina foi determinada usando-se uma coluna de Superdex G-75 (sistema de FPLC), equilibrada com tampão bicarbonato de amônio 0,1 M, pH 8,0, num fluxo constante de 0,3 ml/min. A coluna foi previamente calibrada com proteínas de massa molecular conhecidas, como: β -amilase (200 kDa), álcool desidrogenase (150 kDa), albumina sérica bovina (66 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), tripsina (24 kDa) e citocromo C (12,4 kDa), sendo possível assim, obter uma curva de calibração. Através desta curva foi possível determinar a massa molecular relativa de KpLec. As amostras foram monitoradas a uma absorbância de 280 nm.

11. Análise de aminoácidos

A análise de aminoácidos foi feita em um analisador Pico-Tag (Waters system), onde a identificação dos aminoácidos das proteínas foi feita através da cromatografia em HPLC do derivado feniltiocarbamil (PTC) do aminoácido, proveniente da derivatização com fenilisotiocianato dos aminoácidos, obtidos através de hidrólise ácida. Um nanomol da lectina purificada foi hidrolizada em HCl 6 M, fenol 1% à 106 °C por 24h. Os hidrolizados foram incubados com 20 µl de solução fresca de derivatização (metanol: água: trietilamina (2: 2: 1, v/v) por 1 hora à temperatura ambiente. Depois da derivatização, os PTC aminoácidos foram identificados em sistema de HPLC, usando coluna C 18-µ Bondapack em cromatografia de fase reversa com gradiente linear de 20,5 minutos de 0 a 100% de acetonitrila (60%). A identificação de cada aminoácido foi feita em relação à uma corrida padrão de PTC aminoácidos.

12. Determinação da Estrutura N-terminal

12.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida e transferência

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada em condições desnaturantes, de acordo com o descrito por Laemmli (1970). O material foi separado em um gel PAGE-SDS à 12,5%, sendo a separação eletroforética realizada a 15 mA em sistema de miniplacas Hoefer SE 250. Após a corrida, foi realizado a eletrotransferência de KpLec para uma membrana de PVDF(polivinildifenilfluoreto), usando uma corrente de 400 mA por 60 minutos sob resfriamento à 10 °C. O tampão de transferência foi preparado com 2,2 g de 3-ciclohexil-amino-1-ácido propanosulfônico (CAPS) em 900 ml de água, sendo titulado a pH 11 com NaOH 2 N e o volume final elevado a 1 L com 100 ml de metanol. Ao final da transferência, a membrana foi corada com Comassie blue R-250 por 2 minutos e descorada em solução descorante, para evidenciamento das bandas protéicas. O material de interesse foi selecionado para posterior seqüência.

12.2. Procedimento da Seqüência

A seqüência direta do N-terminal foi feita com a transferência da proteína da membrana de PVDF para o seqüenciador automático Procise. Os aminoácidos fenildantoína (PTH) foram identificados pela comparação de seus tempos de retenção com aqueles 20 aminoácidos padrões. Peptídeos contendo ¹⁴C-CM-cisteína foram monitorados para detectar a radioatividade usando um cintilador (Beckman model L-250).

13. Caracterização Físico-Química de KpLec

13.1. Ensaio de inibição da atividade hemaglutinante por Carboidratos

Os carboidratos utilizados para o ensaio de inibição da atividade hemaglutinante foram: D-Fructose, D-Galactose, D-Galactosamina, D-Glicose, D-Glicosamina, D-Lactose, D-Maltose, D-Manose, D-Sacarose, D-Rafinose e N-acetil-D-glicosamina, todos adquiridos da Sigma Chem. Co., USA.

Em placas de microtitulação foram adicionados aos poços da coluna1; 50 µl do carboidrato em concentrações iniciais de 100 mM. Aos poços da segunda coluna, foram acrescentados 50 µl de NaCl 0,15 M e 50 µl da solução de carboidrato. Em seguida foi feita a diluição serial dos carboidratos, a partir da segunda coluna, até o último poço.

Acrescentou-se, logo após, 50 µl de KpLec em uma concentração de 100 µg/ml em todos os poços. A placa foi deixada em repouso por 30 minutos e, em seguida, adicionou-se 50 µl de uma suspensão de eritrócitos de rato a 2% (v/v). As placas foram incubadas a 37°C por 1 hora. O controle negativo constou de 50 µl da suspensão de eritrócitos e 50 µl da solução de carboidrato 100 mM. O controle positivo continha 50 µl de KpLec e 50 µl de suspensão de eritrócitos.

13.2. Inibição da Atividade hemaglutinante por Agentes quelantes

O requerimento de cátions divalentes para a atividade da lectina foi primeiramente investigado acrescentando-se EDTA (quelante inespecífico de Ca^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+}) ao ensaio de hemaglutinação. EGTA foi utilizado depois para verificar se a atividade da lectina é dependente especificamente de íons cálcio.

Na placa de microtitulação 50 μl de EDTA ou EGTA (25 mM) foram acrescentados aos primeiros poços e diluídos serialmente em salina 0,15 M. A lectina foi adicionada na concentração de 100 $\mu\text{g/ml}$. Incubou-se por 30 minutos e em seguida foi colocado 50 μl de hemáceas de rato a 2% (v/v).

13.3. Inibição da atividade hemaglutinante por Agentes redutores

A lectina foi incubada com uma solução de uréia (8 M) ou DTT (10 mM) durante a noite, a 25 °C. Foram feitos os controles da hemaglutinação (lectina sem tratamento, salina e hemácea), das soluções de uréia e DTT (50 μl da solução de uréia 8 M ou DTT 10 mM, 50 μl de salina e 50 μl de hemáceas a 2%) e do sangue (50 μl de salina e 50 μl de hemáceas a 2%).

13.4. Inibição da atividade hemaglutinante por enzimas proteolíticas

A lectina foi incubada com Proteinase K (100 µg/ml) ou tripsina (500 µg/ml) à 37 °C por 1 hora. Logo após, realizou-se o teste de hemaglutinação para se verificar se a proteína manteve sua atividade. Foram feitos os controles das enzimas (50 µl da solução de proteinase ou tripsina, 50 µl de salina e 50 µl de hemáceas à 2 %), do sangue (50 µl de salina e 50 µl de hemáceas à 2 %) e da hemaglutinação (50 µl da lectina sem tratamento, 50 µl de salina e 50 µl de hemáceas à 2 %).

13.5. Efeito do pH na atividade hemaglutinante

Para verificar-se o efeito do pH sobre a atividade hemaglutinante, a lectina foi tratada com diferentes pHs, variando de 2 a 14, a 37 °C por 1 hora. Após incubação, os pHs foram ajustados para as condições do ensaio de hemaglutinação. Foram feitas triplicatas para cada valor de pH, sendo determinado à média dos valores obtidos e o desvio padrão para cada um deles.

13.6. Efeito da temperatura na atividade hemaglutinante

A lectina foi submetida a uma variação de temperatura (37 à 100 °C), com o objetivo de avaliar o efeito da temperatura na atividade hemaglutinante. Após incubação por 30 minutos em cada temperatura, a eficiência da atividade hemaglutinante foi avaliada através

de ensaio de hemaglutinação. Foram feitas 3 repetições para cada temperatura, sendo determinado o desvio padrão para cada temperatura.

13.7. Tratamento com Metaperiodato de sódio (NaIO₄)

A lectina (100 µg) foi dissolvida em 1 ml de tampão acetato de sódio pH 5,5, e junto a esta solução foi adicionado o metaperiodato de sódio 10 mM (2,45 mg). Incubou-se por 10 min, no escuro, à temperatura ambiente. Esta solução, lectina e metaperiodato, foi então dialisada contra salina 0,15 M por 24 horas. Após a diálise, ajustou-se o pH e então se realizou o ensaio de hemaglutinação. O experimento foi realizado em triplicata.

13.8. Tratamento com TFMS (ácido Trifluormetanosulfônico) e Anisol

Inicialmente, foi preparado a mistura dos reagentes TFMS (740 µl) e Anisol (370 µl) responsáveis pela deglicolização. A lectina foi então adicionada a esta mistura (100 µg) e incubada em banho de gelo, durante 2 horas. Após este período, este material foi dialisado contra salina por 24 horas. Ajustou-se o pH e então foi feito o ensaio de hemaglutinação em triplicata.

14. Efeito na agregação plaquetária

Para este ensaio foi coletado sangue de voluntários sadios, que não tomaram medicamentos por 15 dias. O sangue foi colocado em tubos plásticos contendo citrato de sódio 3,8% (1:10 v/v), e centrifugado a 200 x g por 15 minutos a 25 °C para obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP), enquanto que o plasma pobre em plaquetas (PPP) foi obtido centrifugando-se o sangue remanescente a 900 x g por 15 minutos, a 25 °C.

Após a centrifugação, as plaquetas (50µl) foram incubadas em tubos de eppendorf, com 950 µl de oxalato de amônio 1% por 10 minutos (para fixação) e a contagem de plaquetas foi feita em câmara de Neubauer, e foram ajustadas para 3×10^8 plaquetas/ml.

14.1. Medida da Agregação Plaquetária

A medida da agregação foi realizada usando agregômetro de dois canais. Para o PRP o aparelho foi calibrado contra PPP, que apresenta 100% de agregação, determinando um pico máximo de agregação. O PRP representa 0% de agregação, determinando uma linha de base, sendo possível determinar uma amplitude para o registro de agregações deste plasma.

Uma suspensão de PRP (500 µl) foi mantida sob agitação constante (900 rpm) no agregômetro em cubetas a 37 °C, e então foram estimuladas por colágeno (8 µg/ml) ou ristocetina (1mg/ml).

Após o registro da agregação estimulada por estes agonistas, a solução de lectina foi adicionada a uma outra suspensão de plaquetas, na ausência e presença destes agonistas.

15. Efeito da lectina no crescimento de fungos

Saccharomyces cerevisiae foi obtido do Departamento de Biologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE. *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum lindemuthianum* foram fornecidos pela CNPF/EMBRAPA, Goiânia, Góias.

Para examinar o efeito da lectina no desenvolvimento dos fungos, 200 µl de células de *S. cerevisiae* e 2×10^4 esporos de *F. oxysporum* e *C. lindemuthianum* em meio Sabouraud foram colocados em placas de microtitulação a 28 °C e em seguida adicionou-se a solução de lectina (100 µg/ml). O experimento foi monitorado por leitura óptica em espectrofotômetro a 660 nm, no tempo zero e a cada 6 horas, seguindo até 60 horas. Um controle, sem a adição da proteína, também foi usado. As leituras foram feitas contra um branco contendo somente meio de cultura. Depois de 60 horas, as células foram separadas do meio de crescimento por centrifugação (3.000 x g), lavadas uma vez em Tris-HCl 100 mM, pH 8,0 para remover o excesso de meio e observadas em microscópio (400 X). Todo o experimento foi feito em triplicata e a avaliação das leituras, os erros padrões e coeficientes de variação foram calculados.

16. Criação dos insetos

16.1. Criação do Inseto *Callosobruchus maculatus* e preparação das sementes artificiais

O inseto *C. maculatus* é uma espécie pertencente à ordem Coleoptera, da Família Bruchidae, cuja cultura é mantida no Departamento de Ciências Naturais, do Centro

Universitário de Três Lagoas, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, no Laboratório de Purificação de Proteínas e suas Funções Biológicas (LPPFB).

Esta cultura é realizada da seguinte maneira: os bruquídeos são mantidos em frascos de vidro transparentes, de boca larga, fechados com tampas metálicas perfuradas contendo sementes de *Vigna unguiculata* (feijão-de-corda). Estes frascos são mantidos em uma câmara incubadora com umidade relativa de 65-75% e temperatura de 28-30°C. A cada geração faz-se a infestação de novas sementes com fêmeas de dois dias de idade após a emergência, com um período de postura de 1 dia. Após um período de aproximadamente 30 dias, uma nova geração de insetos é obtida.

As sementes artificiais foram preparadas pela mistura de farinha de feijão (*V. unguiculata*) e diferentes concentrações da lectina. Estas incorporações foram empregadas nas concentrações de 0,25%, 0,5% e 1,0% de proteína. A mistura da farinha com as frações foi comprimida em prensa manual e oferecida às fêmeas de *C. maculatus* com dois dias de emergência, para oviposição. Após 24 horas de infestação, os insetos e os ovos que excediam a quatro foram retirados. Para cada concentração de proteína, foram feitas 6 repetições, com 4 ovos em cada. Depois de 20 dias, os ovos foram abertos e analisados quanto ao número de larvas e seu peso médio.

16.2. Criação do inseto *Anagasta kuehniella* e preparação da dieta artificial

O inseto *A. kuehniella* é uma espécie pertencente à ordem Lepidoptera, da Família Pyralidae, cuja cultura também é mantida no LPPFB.

Esta cultura é realizada da seguinte maneira: as mariposas são mantidas em caixas plásticas, fechadas com tampas plásticas perfuradas, contendo 8 partes de farinha de trigo integral, 2 partes de germe de trigo integral, 1,9 partes de farelo de trigo integral e 0,1 parte de levedo. Estas caixas são mantidas em uma sala de criação com umidade relativa (65 - 75%) e temperatura (28 °C) controladas.

A dieta artificial foi preparada pela mistura de farinha de trigo integral, germe de trigo integral, farelo de trigo integral e levedo (8: 2: 1,9: 0,1) a duas diferentes concentrações de lectina (0,5% e 1,0%). Foi feita também uma farinha controle, sem a presença de lectina. Para cada concentração de proteína, foram feitas 6 repetições, com 5 ovos em cada.

Após 24 dias, os experimentos foram analisados quanto ao número de larvas e seu peso médio.

17.Preparação das culturas celulares

Células Vero (células de rim de macaco verde africano) foram rapidamente descongeladas em banho a 37 °C e transferidas para uma garrafa contendo MEM (meio mínimo essencial e Eagle) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de solução de antibióticos (penicilina 1.000 U/ml – estreptomicina 250 µg/ml), mantidas em estufa a 37 °C até a confluência da monocamada. Após este período, foi descartado o meio de cultura das garrafas. A monocamada foi lavada com solução de Hank's e desfeita com adição de ATV (associação tripsina-Versene). As células foram ressuspensas em MEM acrescido de 10% de SFB e 1% de antibióticos, para uma concentração de $2,5 \times 10^5$ células/ml

e transferida para placa de 96 orifícios, adicionando 0,1 ml da suspensão celular/orifício. A placa foi incubada a 37 °C em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ durante 24 horas.

17.1. Teste de Citotoxicidade

A atividade citotóxica da lectina foi avaliada em células Vero, segundo a metodologia descrita por O'Brien et al. (1987). Após formação da monocamada celular o meio de cultura da placa foi dispensado. KpLec (500 µg) foi diluída em 0,1 ml de meio MEM contendo 1% de solução de gentamicina (10 mg/ml) e adicionada ao orifício da placa contendo a monocamada celular e a partir daí diluída serialmente. A placa foi incubada em estufa a 37 °C com 5% de CO₂. Foram realizadas leituras diárias em microscópio invertido (Axiosvert–Zeiss) por 24 horas. Foi considerado como positivo a recíproca da maior diluição da amostra que provocou citotoxicidade. Foi utilizado como controle negativo, células vero sem a incubação com a lectina.

IV. RESULTADOS

1. Cromatografia em Coluna Sephadex G-100

O perfil cromatográfico do extrato bruto (E.B.), que foi submetido à cromatografia de exclusão molecular em coluna Sephadex G-100, mostra três picos de proteína bem distintos (Figura 4). Após ensaios de hemaglutinação foi verificado que somente o segundo pico apresentou atividade hemaglutinante, o qual foi denominado por PII.

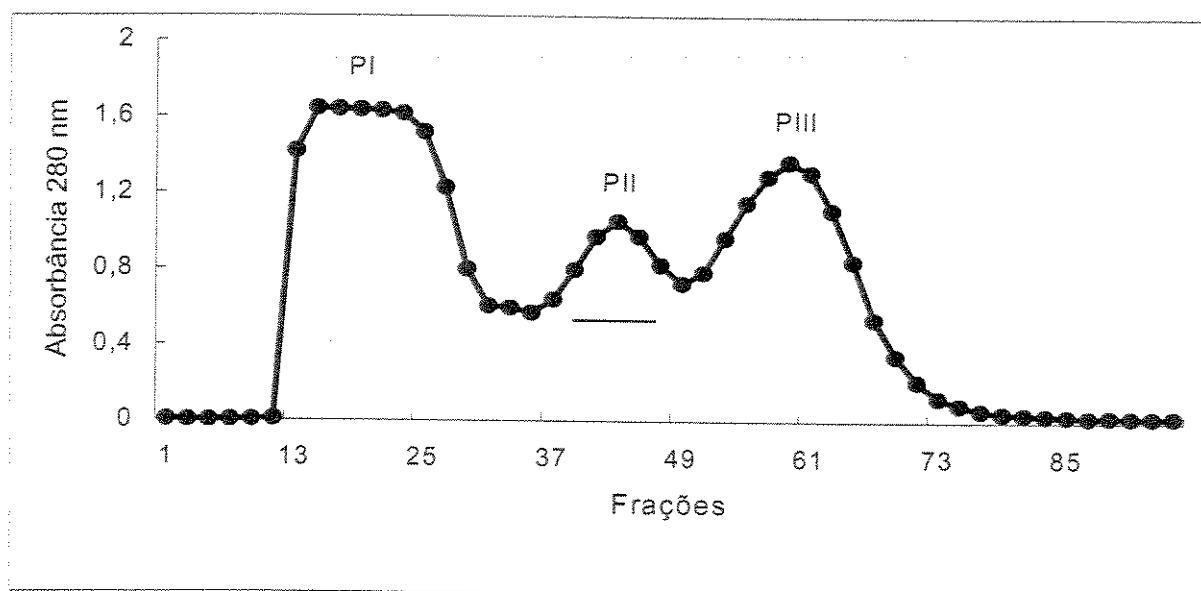


Figura 4 - Cromatografia em Sephadex G-100 do extrato bruto das sementes de *K. paniculata*. Coluna (3 x 60 cm) equilibrada com tampão fosfato 0,1 M, NaCl 0,1 M, pH 7,6. Frações de 3 ml/tubo num fluxo de 30 ml/hora à temperatura ambiente. (—), fração com atividade hemaglutinante.

2. Cromatografia em coluna de afinidade – Sepharose-tripsina

A fração PII foi dialisada, liofilizada e submetida a uma cromatografia de afinidade em uma coluna de Sepharose-tripsina (2 x 15 cm). Três picos de proteínas foram observados em seu perfil cromatográfico, dois picos antes e um terceiro após a eluição com HCl 0,1 N. Somente o segundo pico apresentou atividade hemaglutinante, sendo denominado Lec-ST.

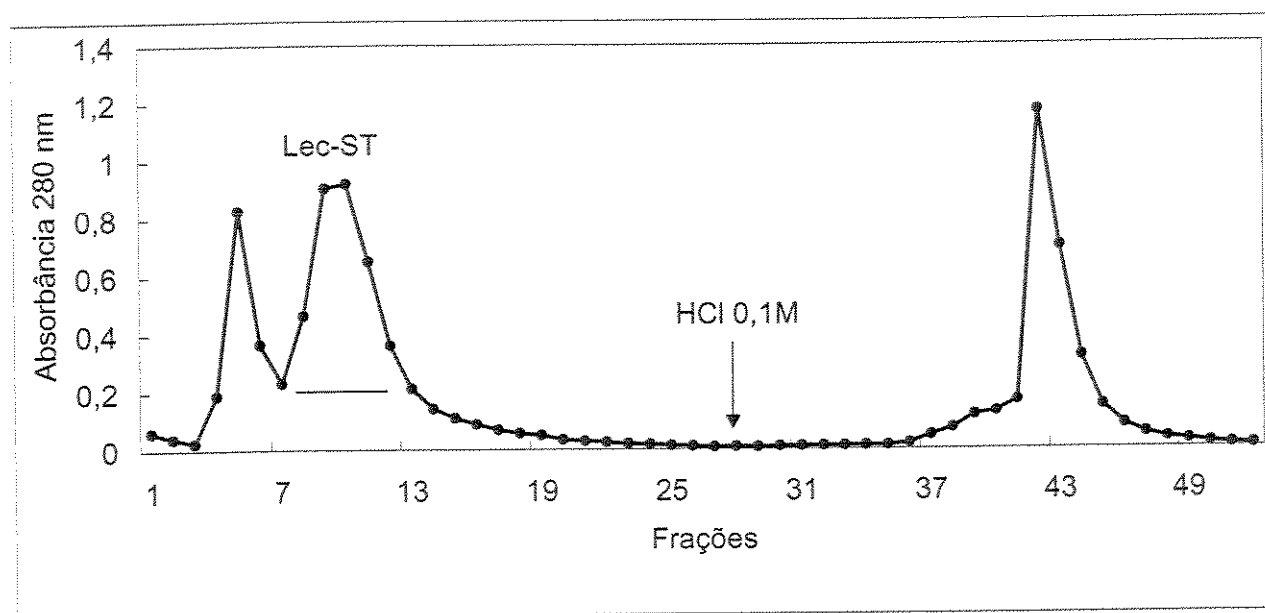


Figura 5 - Cromatografia em Sepharose-Tripsina da fração PII. Coluna (3 x 60 cm) equilibrada com tampão fosfato 0,1 M, NaCl 0,1 M, pH 7,6. Frações de 3 ml/tubo num fluxo de 30 ml/hora à temperatura ambiente. (—), fração com atividade hemaglutinante.

3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência/ Fase Reversa

A fração denominada Lec-ST foi dialisada, liofilizada e submetida a uma coluna C-18 μ -Bondapak analítica em sistema de HPLC (Waters). Foi observado somente um pico principal com atividade hemaglutinante, eluído com aproximadamente 75% de acetonitrila, o qual foi denominado KpLec.

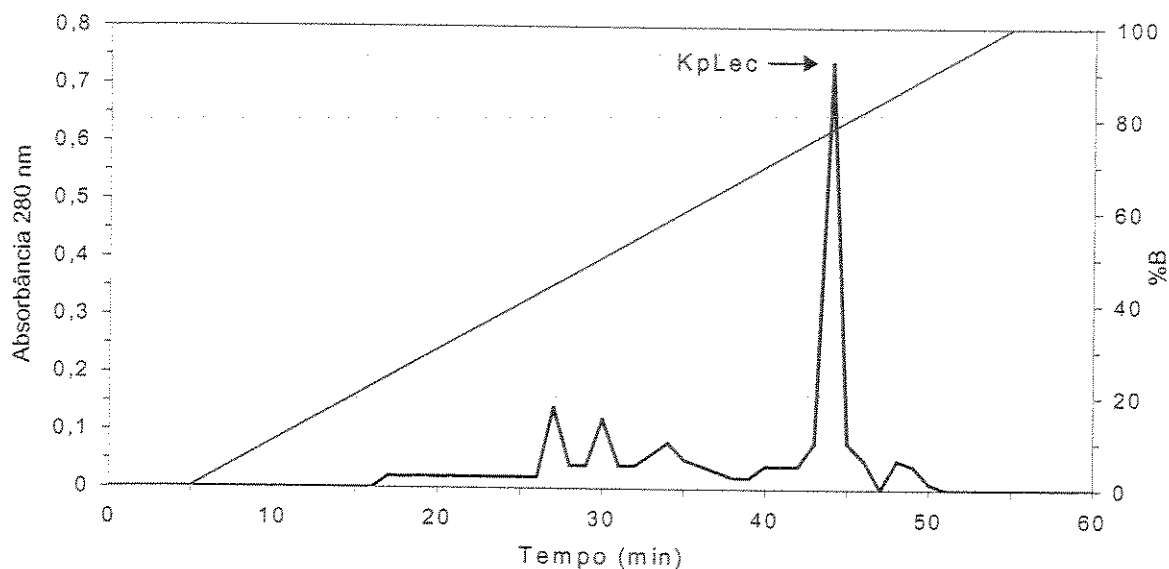


Figura 6 - Perfil cromatográfico em HPLC de fase reversa da fração Lec-ST da coluna de Sephorose-Tripsina. Coluna C-18 μ Bondapack (7,8 x 300 mm, 125 Å) equilibrada com TFA 0,1% (solvente A). Eluição feita com um gradiente linear de 0 a 100% de Acetonitrila 80% (solvente B) a um fluxo de 2 ml/minuto. O pico indicado pela seta apresentou atividade hemaglutinante, sendo eluído aproximadamente aos 44 minutos em 75% do solvente B.

4. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida na presença de SDS

A figura 7 ilustra um gel de eletroforese em poliacrilamida 12,5%, na presença de SDS, que mostra as frações obtidas nas etapas de purificação e isolamento da lectina de *K. paniculata*. A lectina (KpLec) apresenta duas subunidades de peso molecular aparente de 22 e 44 kDa. Quando submetida a tratamento com DTT, a subunidade de 44 KDa praticamente desaparece, indicando que grande parte desta subunidade ficou na sua forma monomérica (22 kDa).

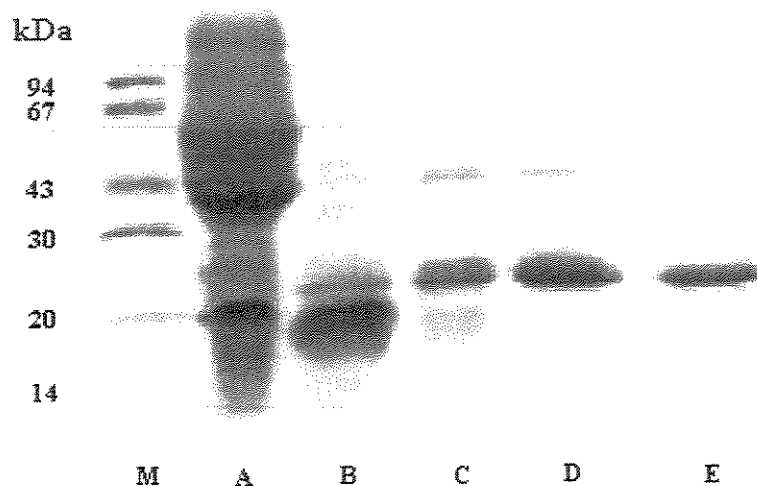


Figura 7 – Eletroforese em PAGE-SDS (12,5%) das frações obtidas das etapas de purificação. (M) Marcadores de peso molecular; (A) Extrato Bruto; (B) Fração PII; (C) LEC-ST; (D) KpLec; (E) KpLec na presença de DTT.

5. Determinação da massa molecular relativa

Através da curva de calibração com proteínas de massas moleculares conhecidas, foi possível determinar a massa molecular relativa de KpLec. O cálculo da massa relativa (M_r) foi realizado através do gráfico de $\log M_r \times V_e/V_o$, onde V_e é o volume de eluição da proteína e V_o (Void) é o volume de exclusão do azul de dextrano (Figura 8). Assim, o tempo de retenção da lectina foi correspondente a uma massa molecular de 22 kDa.

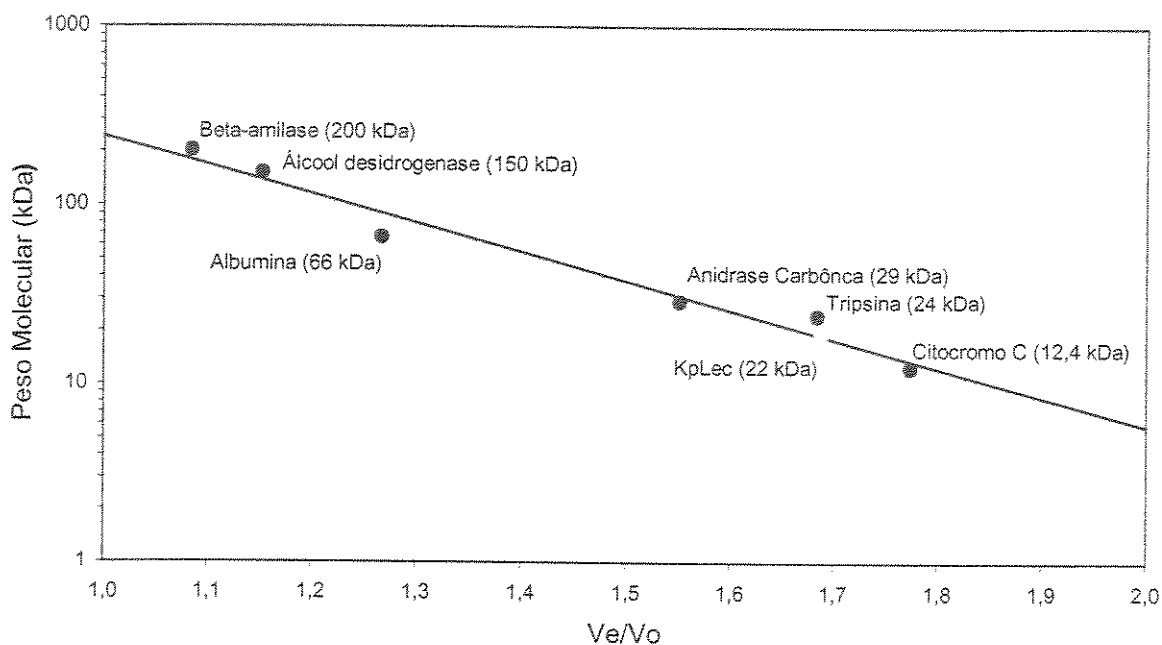


Figura 8 – Determinação da massa molecular de KpLec em coluna de Superdex G-75 (1 x 60 cm), sistema FPLC, equilibrada com tampão bicarbonato de amônio 0,2 M pH 8,0, sob um fluxo de 0,3 ml/minuto.

6. Análise densitométrica

De acordo com os resultados da densitometria (Fig. 9), podemos observar que a concentração protéica da subunidade de 22 kDa (pista 1) perfaz 94,52% do total da proteína, e que a concentração restante, somente 5,48% faz parte da subunidade maior (44 kDa). A pista 2, mostra KpLec na presença de 0,1M de DTT. Pode-se perceber que houve uma redução de 88% da subunidade maior em sua forma monomérica.

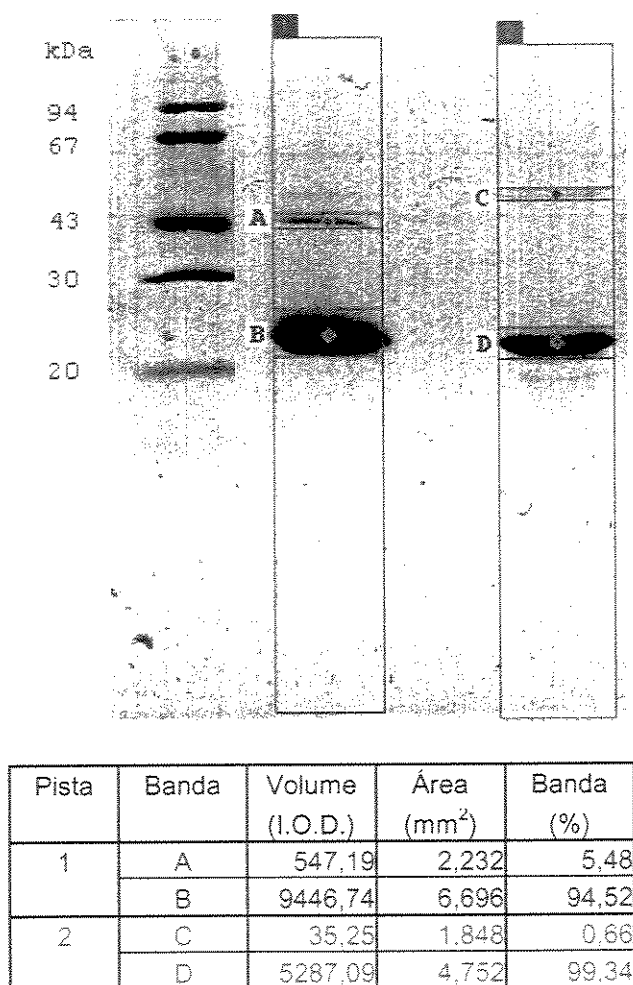


Figura 9 – Análise densitométrica de KpLec sem a presença de DTT (Pista 1) e com a presença de DTT (Pista 2).

7. Análise de Aminoácidos

Os resultados da análise da composição de aminoácidos são apresentados na Tabela 1. A metodologia empregada não detecta resíduos de triptofano. A análise dos aminoácidos evidenciou uma maior ocorrência de aminoácidos hidrofóbicos.

Tabela 1 - Composição de aminoácidos de KpLec.

Aminoácidos	Mol de AA / Mol de proteína	Resíduo (%)
Asx	51	11,19
Glx	37	9,50
Ser	22	5,26
Gly	38	10,06
His	5	1,17
Arg	14	3,76
Thr	21	5,19
Ala	20	5,14
Pro	23	7,72
Tyr	13	3,84
Val	26	6,86
Met	9	2,59
Cys	5	0,89
Ile	25	5,95
Leu	33	8,21
Fhe	27	5,87
Lys	26	6,78

8. Determinação da Estrutura N-terminal

A Tabela 2 ilustra a seqüência N-terminal de KpLec. A pesquisa no banco de dados das proteínas com seqüências já determinadas mostrou homologia da proteína KpLec com outras lectinas vegetais, como: *Urtica dioica* aglutinina (UDA) (Lerner & raikhel, 1992); a lectina da casca de *Robinia eudoacacia* (LECRPA1 α) (Van Damme et al., 1995); a lectina de *Cladrastis lutea* (LecCIA α) (Van Damme et al., 1995) e a lectina de sementes de *Laburnum alpinum* (LEC1-LABAL) (Konami et al., 1991).

Tabela 2 – Seqüência N-terminal de KpLec

Lectina	Seqüência															
KpLec	Q	K	K	C	S	Q	Q	C	K	I	T	I	C	Q	P	N - F C C S K I - G
UDA	Q	R	-	C	G	S	Q	G	G	G	G	T	C	-	P	A L W C C S I W - G
LECRPA1 α	T	G	S	L	S	F	S	F	P	K	F	A	-	-	P	N Q P Y L I F Q R D
LecCIA α	S	D	S	L	S	F	T	F	N	N	F	P	-	-	P	N S E D L I F Q K D
LEC1-LABAL	L	N	E	L	S	F	N	F	D	K	F	V	-	-	P	N Q N N I L F Q G V

9. Dosagem de Carboidrato

De acordo com o método descrito por Dubois et al. (1956), verificou-se que KpLec é uma glicoproteína, e que apresenta aproximadamente 14% de carboidrato.

10. Atividade hemaglutinante sobre hemáceas humanas e de diferentes espécies animais

A atividade hemaglutinante do extrato bruto (1mg/ml) de *K. paniculata* foi avaliada utilizando-se suspensões de hemáceas humanas (sistema ABO) e de diferentes grupos animais (camundongo, rato, carneiro, bovino, hamster e coelho).

O extrato bruto (E.B.) hemaglutinou todas as hemáceas humanas do sistema ABO em títulos variados, mostrando não apresentar especificidade somente para um determinado grupo (Tabela 3).

O E.B. também hemaglutinou as hemáceas de roedores, ovinos, bovinos e eqüinos, mas mostrou-se incapaz de hemaglutinar as hemáceas de hamster (Tabela 3)

Tabela 3 - Atividade hemaglutinante de KpLec sobre diferentes eritrócitos.

Eritrócitos	Título*
Humano tipo A	8
Humano tipo B	6
Humano tipo AB	5
Humano tipo O	3
Camundongo	6
Rato	6
Carneiro	6
Cavalo	4
Bovino	6
Hamster	0
Coelho	2

* Título é definido como a recíproca da maior diluição capaz de apresentar hemaglutinação.

11. Ação inibitória de açúcares sobre a atividade hemaglutinante

A Tabela 4 mostra o efeito da ação de vários carboidratos sobre a atividade hemaglutinante de KpLec, em eritrócitos de ratos.

N-acetilglicosamina (0,09 mM) foi o que mais exerceu atividade inibitória. glicose, glicosamina, lactose e galactosamina também inibiram a hemaglutinação numa concentração de 0,19 mM.

Tabela 4 - Efeito de carboidratos sobre a atividade hemaglutinante.

Carboidrato	CMI_c (mM)*
N-acetilglicosamina	0,09
Glicose	0,19
Glicosamina	0,19
Lactose	0,19
Galactosamina	0,19
Galactose	0,78
Manose	0,78
Rafinose	0,78
Sacarose	0,78
Maltose	1,56
Frutose	3,12

* CMI_c é a concentração mínima de carboidrato capaz de inibir a atividade hemaglutinante

12. Efeito do DTT e Uréia na atividade hemaglutinante

Amostras de KpLec (100 µg/ml) foram incubadas com DTT e uréia por 12 horas à 25 °C, nas concentrações de 10 mM e 8 M, respectivamente. Verificou-se que o DTT, nestas condições, não afetou a atividade da lectina. Quando submetida ao tratamento com uréia, a atividade hemaglutinante foi completamente perdida.

13. Efeito do EDTA e EGTA na atividade hemaglutinante

Amostras de KpLec (100 µg/ml) foram incubadas com EDTA (25 mM) e EGTA (25 mM) como descrito anteriormente. Quando incubada com EDTA (queela Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+}) a lectina teve sua ação inibida completamente a partir de 12,5 mM. Na presença de EGTA (queela Ca^{2+}), não houve inibição da atividade hemaglutinante.

14. Estabilidade térmica de KpLec

A Figura 10 mostra o efeito das diferentes temperaturas na atividade hemaglutinante de KpLec (100 $\mu\text{g/ml}$), incubada por 30 minutos às temperaturas de 37, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100°C. Verificou-se que esta lectina é bastante estável, e somente a partir de 90°C a atividade sofreu um decréscimo considerável, perdendo totalmente a atividade a 100°C.

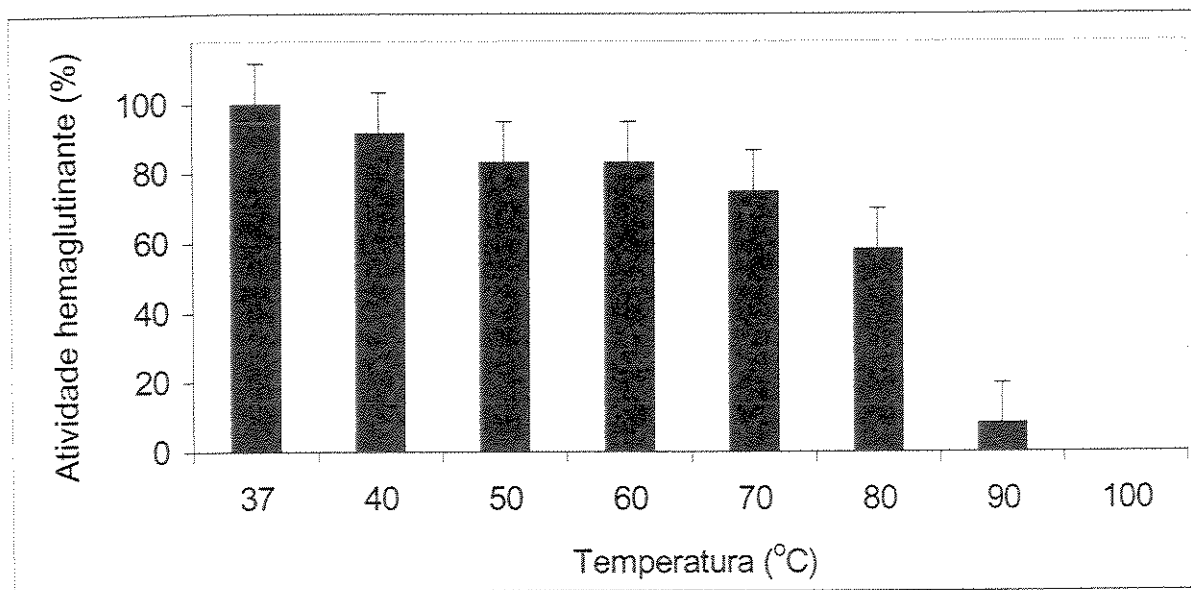


Figura 10 - Efeito da temperatura na atividade hemaglutinante de KpLec (100 $\mu\text{g/ml}$). Atividade hemaglutinante determinada após 30 minutos de incubação nas referidas temperaturas.

15. Estabilidade de KpLec em relação ao pH

A lectina (100 $\mu\text{g/ml}$) foi submetida a diferentes valores de pH (2 à 14), de acordo com o método descrito anteriormente. Esta proteína mostrou-se estável em uma ampla faixa de pH (5-10), sendo muito sensível a valores extremos (pH 2; 3; 4; 12 e 14), onde a atividade é completamente perdida (Figura 11).

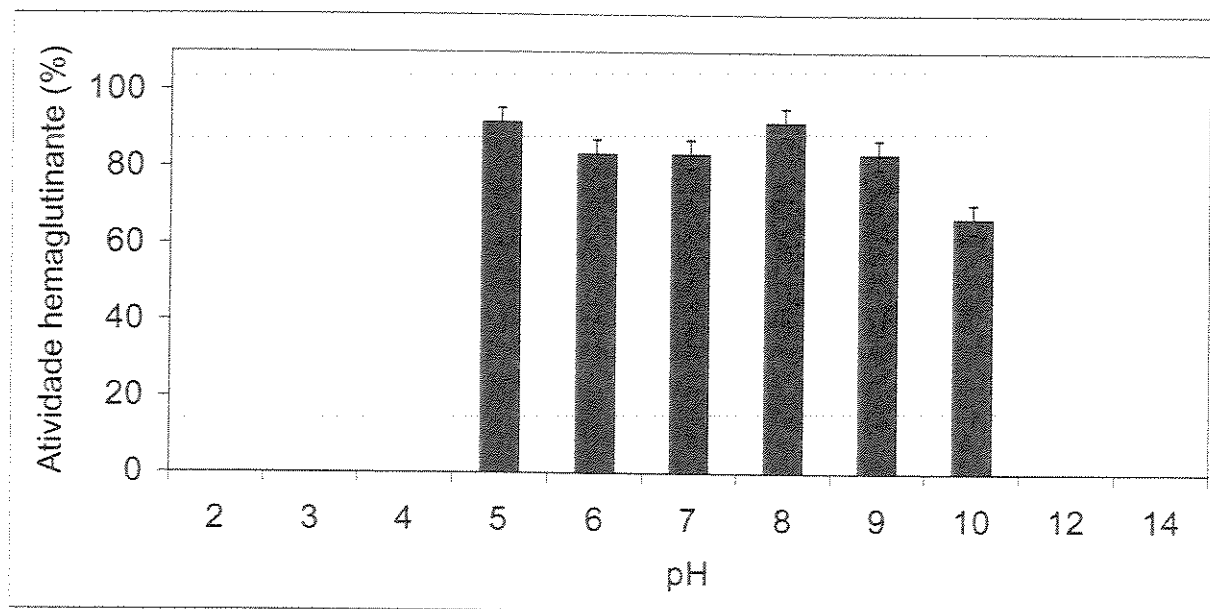


Figura 11 - Efeito do pH na atividade hemaglutinante de KpLec (100 $\mu\text{g/ml}$). Atividade hemaglutinante da lectina verificada após 30 minutos de incubação com pHs variando de 2-14. A atividade de KpLec foi mantida entre os pHs 5 e 10.

16. Efeito das enzimas proteolíticas na atividade hemaglutinante

O tratamento de KpLec (100 µg) com 100 µl de proteinase K (100 µg/ml) à 37°C por 30 minutos, fez com que lectina perdesse completamente sua atividade hemaglutinante. O mesmo resultado foi observado quando KpLec (100 µg) foi incubada com 100 µl de tripsina (500 µg/ml) por 30 minutos, a 37 °C. Assim, podemos concluir que 10 µg de proteinase K e 50 µg de tripsina foram suficientes para fazer com que KpLec (100 µg) perdesse sua atividade.

17. Efeito do Metaperiodato de sódio (NaIO₄)

Metaperiodato de sódio é um agente oxidante que destrói açúcares que contenham grupos hidroxilas não substituídos (Rupp et al., 1995). Seguindo o método descrito anteriormente, a lectina foi tratada com metaperiodato e depois foi feito o ensaio de hemaglutinação. De acordo com o ensaio, foi possível verificar que o metaperiodato de sódio (10 mM), incubado com KpLec (100 µl) por 10 minutos, no escuro, à temperatura ambiente, não foi capaz de exercer efeito inibitório na atividade hemaglutinante.

18. Efeito do TFMS e Anisol

Da mesma forma que o Metaperiodato de sódio, a incubação dos reagentes deglicosilantes, TFMS (740 μ l) e Anisol (370 μ l) com KpLec (100 μ g), por duas horas, em banho de gelo, não afetou a atividade hemaglutinante.

19. Efeito na agregação plaquetária

Inicialmente foram inseridos 10 μ l de KpLec (50 μ g) em PRP e não foi observada nenhuma atividade agregante da lectina. Foi então dobrada a concentração de KpLec (100 μ g) em PRP, e mesmo assim, não houve agregação (canal 2). Aos 4 minutos, quando foi adicionado a este canal o agonista ristocetina (8 μ g), houve a agregação plaquetária, mostrando que a lectina isolada, não é capaz de induzir ou inibir a agregação. O canal 1 representa um controle, PRP sem KpLec, contendo somente o agonista (Figura 12).

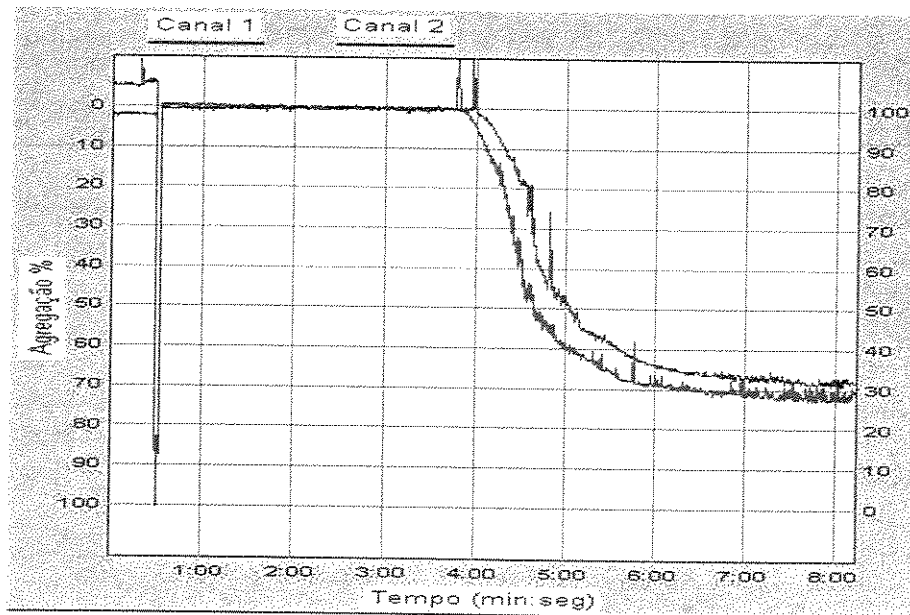


Figura 12 - Perfil da agregação plaquetária. Canal 1: PRP sem KpLec. Canal 2: PRP com KpLec (100 μ g). O agonista ristocetina (8 μ g) foi inserido nos canais após 4 minutos de observação.

20. Efeito de KpLec no desenvolvimento de fungos

De acordo com a metodologia descrita anteriormente, verificou-se que esta lectina não exerceu atividade inibitória no crescimento e desenvolvimento dos fungos testados, *C. lindemuthianum*, *F. oxysporum* e *S. cerevisiae*, como mostra as Figuras 13 e 14.

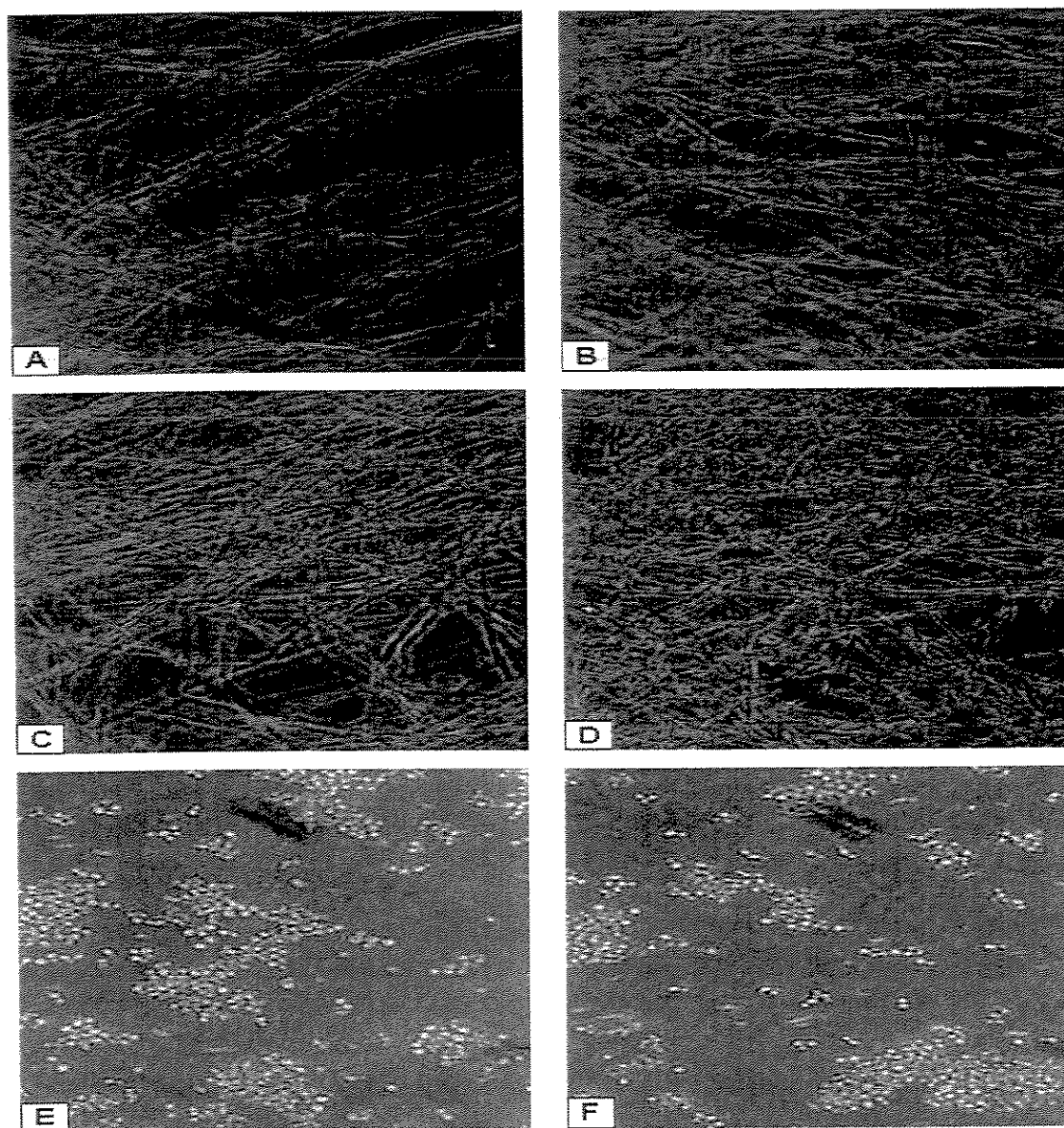


Figura 13 – Fotomicrografia após 60 h de incubação de KpLec com os fungos. Aumento de 400X para os fungos filamentosos (*C. lindemuthianum* e *F. oxysporum*) e 630X para levedura (*S. cerevisiae*). (A) *C. lindemuthianum* + KpLec; (B) *C. lindemuthianum*; (C) *F. oxysporum* + KpLec; (D) *F. oxysporum*; (E) *S. cerevisiae* + KpLec; (F) *S. cerevisiae*

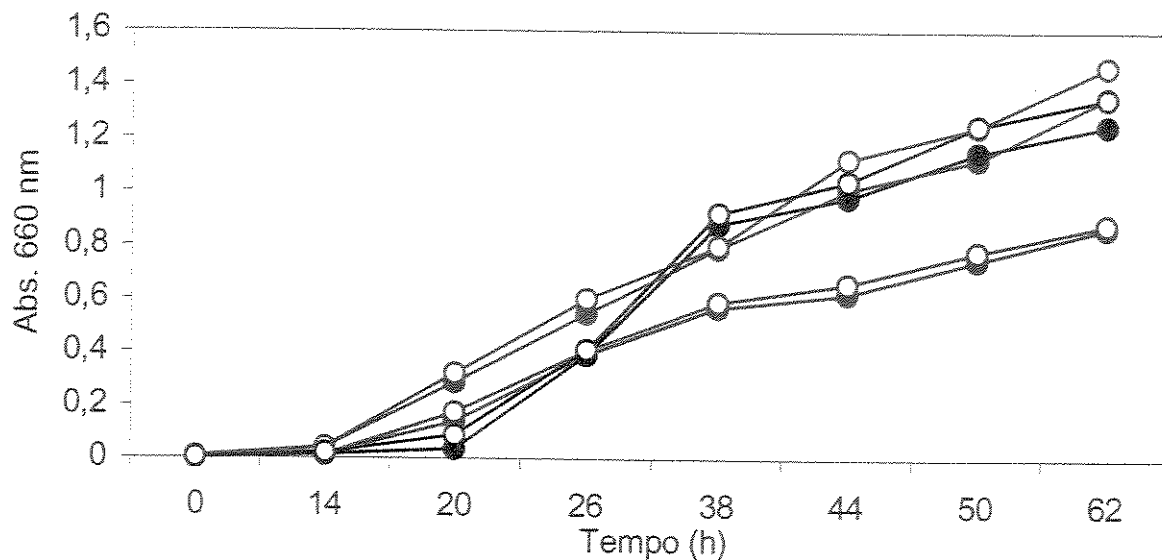


Figura 14 - Efeito de KpLec (100 µg/ml) sobre o crescimento dos fungos após 60 horas de incubação. —●— *C. lindemuthianum*, —○— *C. lindemuthianum* + KpLec, —●— *F. oxysporum*, —○— *F. oxysporum* + KpLec, —●— *S. cerevisiae*, —○— *S. cerevisiae* + KpLec.

21. Citotoxicidade em culturas de células

A citotoxicidade de KpLec foi examinada frente às células Vero (provenientes do rim de macaco verde africano), o qual demonstrou elevada sensibilidade ao teste de atividade citotóxica. Os resultados mostraram alterações morfológicas características, tais como arredondamento celular e descolamento do tapete celular (figura 15). Foi possível observar o efeito citopático até a concentração de 62,5 µg de proteína, em um tempo mínimo de 4 horas. Até o final das 24 horas (tempo máximo observado), não havia sido observado morte total das células.

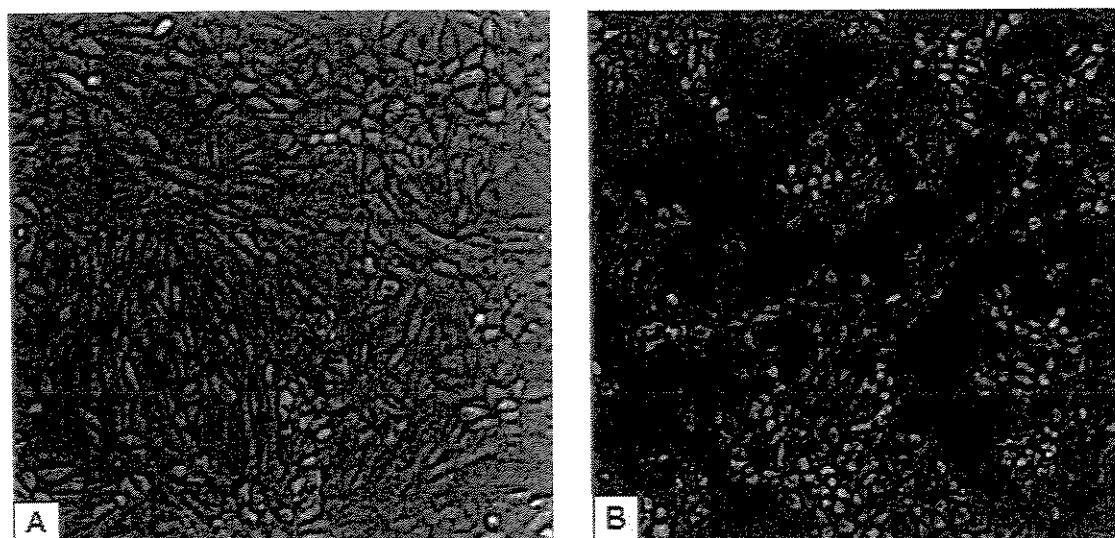


Figura 15 - Fotomicrografia do efeito biológico produzido por KpLec em células Vero. Aumento 200x. (A) Controle Celular (células Vero); (B) Efeito produzido por KpLec após 4 horas de incubação.

22. Atividade inseticida de KpLec sobre *C. maculatus*

Para se investigar o efeito de KpLec no crescimento e desenvolvimento de larvas de *C. maculatus*, nós examinamos larvas de 20 dias, que se desenvolveram em sementes artificiais contendo somente farinha de feijão (*V. unguiculata*) e larvas que se desenvolveram em sementes artificiais contendo três diferentes concentrações da lectina (0,1%, 0,5% e 1,0%). O número de indivíduos de *C. maculatus* foi mais efetivamente reduzido com 1% de KpLec, onde podemos observar uma redução de 55% na população do bruquídeo (Fig. 16).

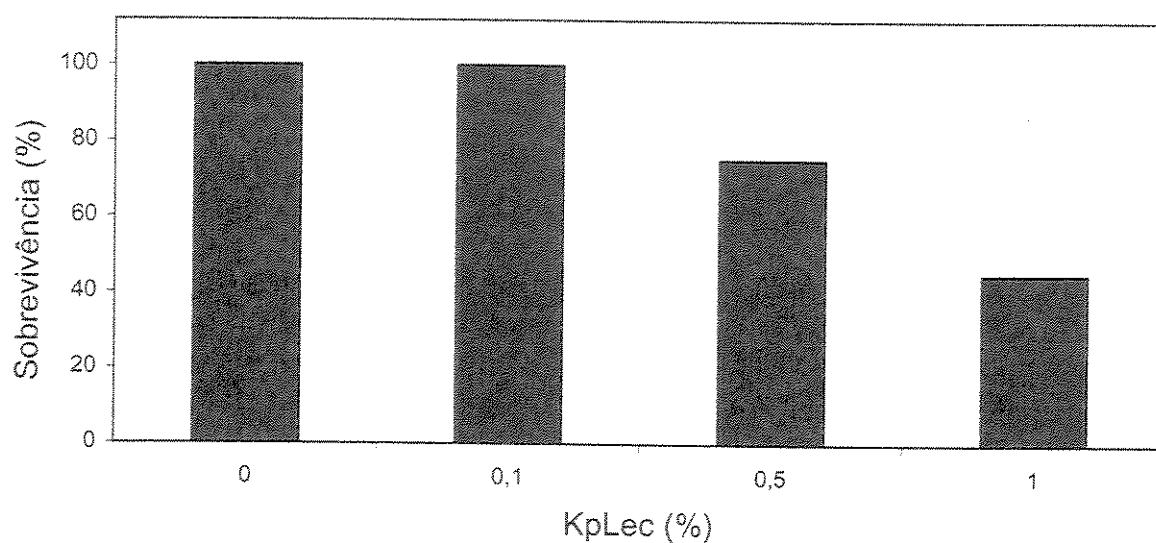


Figura 16 – Porcentagem de larvas sobreviventes de *C. maculatus* após 20 dias de desenvolvimento, alimentadas com sementes artificiais contendo 0%, 0,1%, 0,5% e 1% de KpLec.

Proporcionalmente, também houve decréscimo de 22% e 56% no peso médio das larvas mantidas em dietas contendo 0,5% e 1% de KpLec (Fig 17).

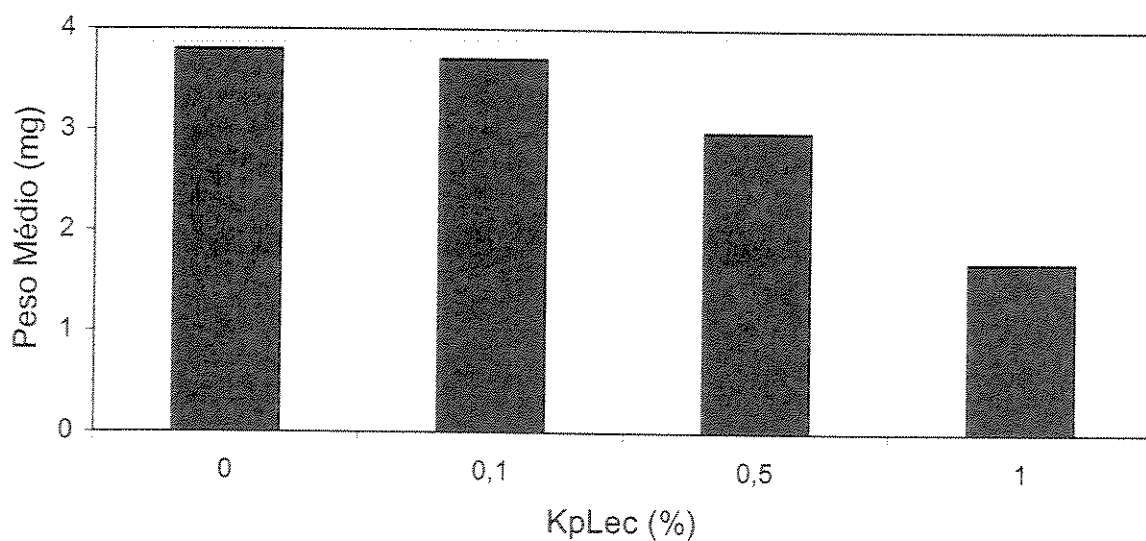


Figura 17 –Peso Médio de larvas de *C. maculatus* após 20 dias de desenvolvimento em sementes artificiais contendo 0%, 0,1%, 0,5% e 1,0% de KpLec.

A Figura 18 ilustra o efeito inibitório produzido por KpLec no desenvolvimento das larvas de *C. maculatus* após 20 dias de desenvolvimento.

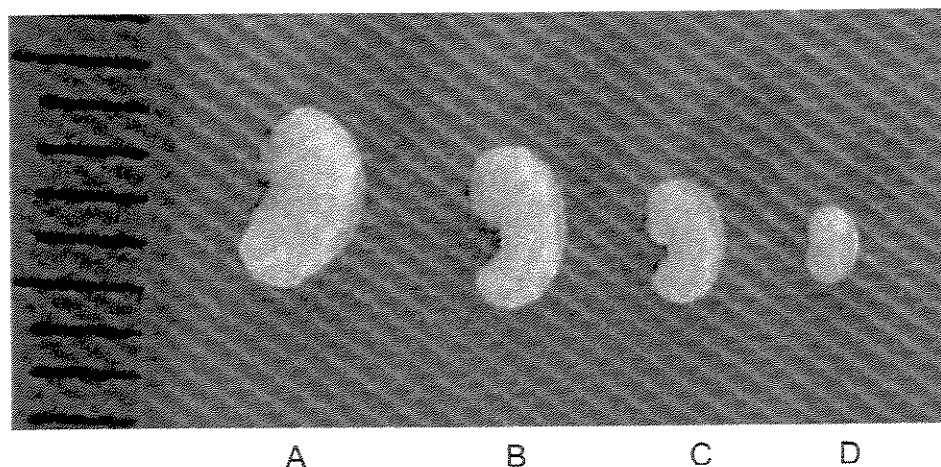


Figura 18 – Efeito de KpLec no desenvolvimento de larvas de *C. maculatus* após 20 dias de desenvolvimento. (A) Larva controle; (B) 0,1% de KpLec; (C) 0,5% de KpLec e (D) 1% de KpLec.

23. Atividade inseticida de KpLec sobre *A. kuehniella*

KpLec também exerceu atividade inseticida sobre o lepidóptero *A. kuehniella*. Larvas com 24 dias foram analisadas quanto ao número de indivíduos, e pode ser verificado assim que, a mortalidade das larvas alimentadas com a dieta que continha 0,5% e 1,0% da lectina, foi de 43% e 55%, respectivamente. Isto mostra um significativo aumento da mortalidade larval, comparado com número de larvas mantidas na dieta controle (Fig 19).

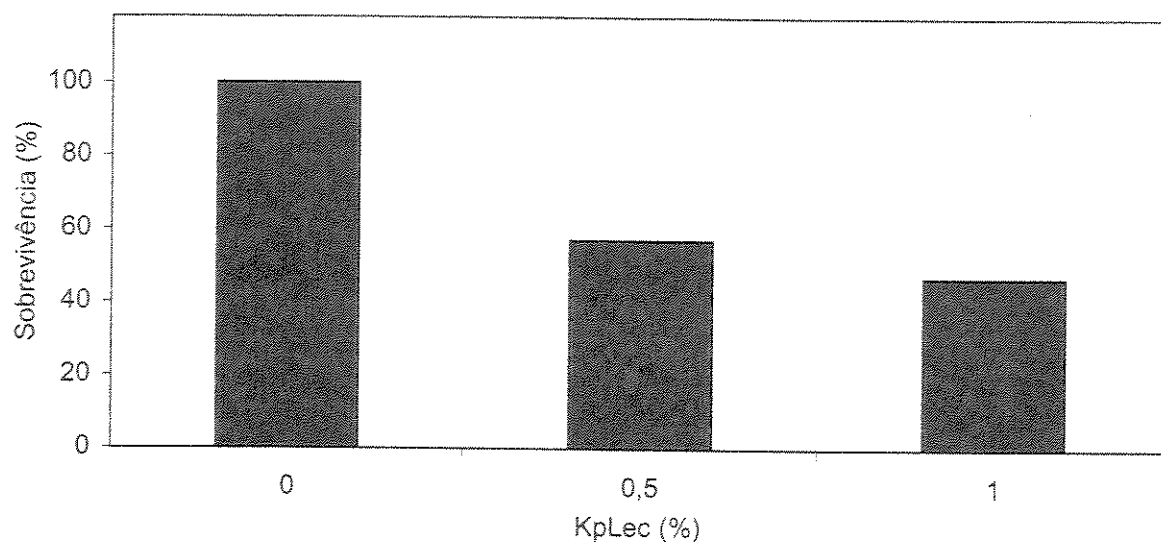


Figura 19 – Porcentagem de larvas sobreviventes de *A. kuehniella* após 24 dias de desenvolvimento em dietas contendo 0%, 0,5% e 1,0% de KpLec.

Observou-se que, além de reduzir a sobrevivência destas larvas, KpLec teve um efeito mais significativo ainda em relação ao peso médio destes indivíduos. A 0,5% e 1,0% de KpLec, houve uma diminuição do peso, em aproximadamente 85% e 92%, respectivamente (Fig 20).

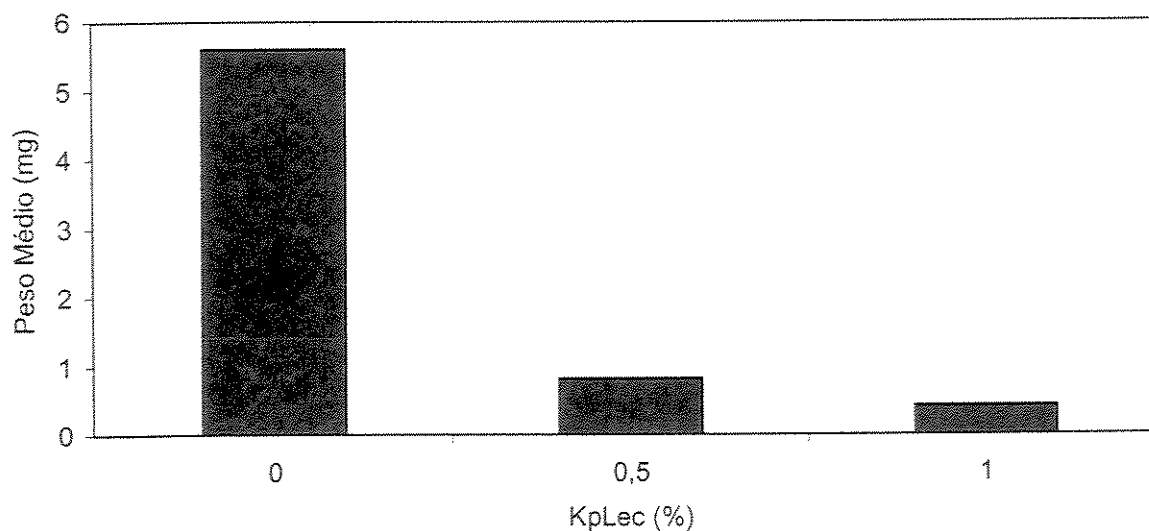


Figura 20 – Efeito produzido sobre o Peso Médio de larvas de *A. kuehniella* após 24 dias de desenvolvimento em dietas artificiais contendo 0%, 0,5% e 1,0% de KpLec.

A Figura 21 ilustra o efeito inibitório produzido por KpLec no desenvolvimento das larvas de *A. kuehniella* após 24 dias de desenvolvimento.

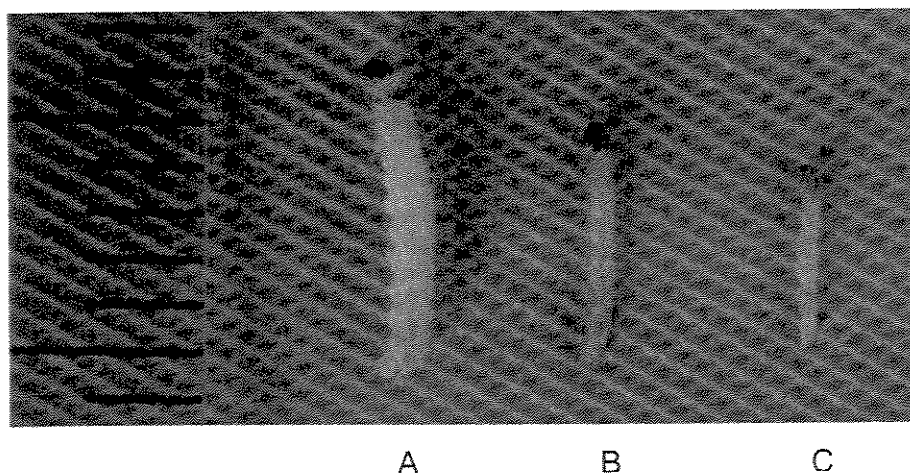


Figura 21 – Efeito de KpLec no desenvolvimento de larvas de *A. kuehniella* após 24 dias de desenvolvimento. (A) Larva controle; (B) 0,5% de KpLec e (D) 1,0% de KpLec.

V. DISCUSSÃO

Lectinas vegetais foram primeiramente encontradas e estudadas por Stilmark (1888) pela descoberta de uma proteína tóxica, ricina, isolada de *Ricinus communis*, com propriedades hemaglutinantes. Muitas outras lectinas, localizadas em diferentes tecidos nas plantas, têm sido relatadas (Etzer, 1986). Como por exemplo, a aglutinina de gérmen de trigo, WGA (Burger & Goldberg, 1967), lectinas presentes nas famílias Amaryllidaceae e Alliaceae (Van-Damme & Peumans, 1991), a lectina de sementes de *Artocarpus heterophyllus* (Pineau et al., 1990) e várias outras.

Os dados apresentados nesse trabalho mostram a purificação da lectina de *Koeleria paniculata* (Flor-da-china) e a caracterização de suas propriedades físico-químicas e biológicas.

Os métodos utilizados para a extração e purificação da lectina de *K. paniculata* foram aqueles comumente usados para proteínas vegetais, que envolvem a extração utilizando soluções salinas e/ou ácidas, precipitação por solventes orgânicos ou por sais e fracionamento por técnicas cromatográficas, tais como exclusão molecular, troca iônica, afinidade e fase reversa (Belitz & Weder, 1990).

A etapa inicial deu-se com a produção da farinha das sementes inteiras, que foi submetida a um tratamento de delipidação com hexano. Este tratamento permitiu diminuir a interferência, nas etapas subsequentes de purificação, de níveis elevados de lipídios, pigmentos e outras substâncias.

A escolha de um solvente para efetuar a extração e precipitação dessas proteínas depende da solubilidade das mesmas, que é considerada muito variável. Segundo Osborne

(1985), as principais proteínas de reserva, abuminas, globulinas, prolaminas e glutelinas são extraídas com base na sua solubilidade, onde albuminas e globulinas são solúveis em soluções salinas; prolaminas solúveis em solventes orgânicos (etanol) e as glutelinas em soluções alcalinas. Além das proteínas de reserva, sementes contêm várias outras proteínas em menor quantidade, tais como inibidores de tripsina, lectinas, inibidores de α -amilase, ureases, os quais são também solúveis em soluções salinas (Duranti & Gius, 1997). Para a extração da lectina de *K. paniculata*, o tampão fosfato de potássio monobásico, 0,1 M, pH 7,6 mostrou-se eficiente. Sabendo-se que o extrato bruto de *K. paniculata* continha lectina, pois apresentou atividade hemaglutinante, iniciaram-se então os passos de purificação desta proteína.

Para ensaios de hemaglutinação realizados com o E.B., foram utilizados eritrócitos de diversos animais: camundongo, rato, carneiro, cavalo, boi, hamster, coelho e eritrócitos humanos do sistema ABO. Embora a lectina de sementes de *K. paniculata* não tenha mostrado atividade hemaglutinante específica aos eritrócitos testados, mostrou mais afinidade aos eritrócitos do grupo A, como a lectina recentemente isolada de sementes de *Sphenostyles stenocarpa* (Machuka et al., 1999). É interessante observar que KpLec hemaglutinou igualmente eritrócitos de camundongos, rato, carneiro e boi, e por razões práticas, eritrócitos de rato foram usados nos ensaios subsequentes. Entretanto, diferente da lectina de *Saraca indica* (Ray & Chatterjee, 1995), que mostrou hemaglutinar fortemente eritrócitos de coelho, a lectina de *K. paniculata* (KpLec) apresentou sua menor atividade hemaglutinante frente a estes eritrócitos. Além disso, não teve efeito algum em eritrócitos de hamster.

A aglutinação é o resultado da interação dos açúcares de superfície e sítios de ligação para estes açúcares na molécula de lectina (Singh et al., 1999). Estas interações são usualmente não-covalentes, envolvendo pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e forças de Van der Waals (Mirelman, 1986).

Sharon & Lis (1989) propuseram os seguintes mecanismos para a interação célula-célula mediada por lectinas de superfície:

- 1) Formação de pontes entre glicoproteínas solúveis que se ligam as lectinas na superfície celular;
- 2) Lectinas podem se combinar com carboidratos de componentes insolúveis da matriz extracelular para promover adesão celular;
- 3) Lectinas solúveis podem se ligar a carboidratos de células justapostas para atuar como pontes entre estas células.

Os resultados mostram que os passos de purificação utilizados, as cromatografias de exclusão molecular, de afinidade e de fase reversa (HPLC), foram suficientes para a purificação da KpLec (Fig. 7).

A fração KpLec foi eluída como um pico principal com atividade hemaglutinante em aproximadamente 75% de Acetonitrila, mostrando que esta lectina se liga fortemente à matriz cromatográfica, pois sua eluição só é feita em concentrações elevadas do solvente orgânico. A forte ligação de uma proteína à coluna de interação hidrofóbica caracteriza uma proteína que possui alta quantidade de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (Guimarães & Collins, 1990). KpLec apresentou alto conteúdo de Gly, Val, Leu, Ile, Phe e Pro, comprovando sua hidrofobicidade e baixo conteúdo de His, Met, Cys, o que é comum nas proteínas de origem vegetal (Ryan, 1981). Sua composição de aminoácidos foi comparada com outras lectinas

vegetais, usando o banco de dados Expasy, KpLec apresentou alta homologia com a lectina de *Onobrychis viciifolia* (Kouchalakos et al., 1984), e com a lectina de *Erythrina corallodendron* (Adar et al., 1989).

A realização da eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%), na presença de SDS, permitiu acompanhar os resultados das etapas de purificação da lectina (figura 7) e verificar o grau de pureza da KpLec. A lectina apresentou duas cadeias polipeptídicas (22 e 44 kDa) e, em condições redutoras (0,1 M de DTT), a mesma se apresentou predominantemente na forma monomérica (22 kDa). Estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos na análise densitométrica, que mostrou que na presença de DTT 0,1 M houve redução de 88% da subunidade maior em sua forma monomérica (22 kDa). Esta lectina apresenta, portanto, duas cadeias ligadas por pontes dissulfeto, que são reduzidas na presença de DTT.

O mesmo também foi observado para uma outra lectina, da mesma família de KpLec (Sapindaceae), purificada de sementes de *Talisia esculenta* que apresenta duas cadeias polipeptídicas, de 20 e 40 kDa (Freire et al., 2001). A massa molecular relativa de KpLec determinada por cromatografia de filtração em gel, em uma coluna de Superdex G 75 (sistema FPLC) foi 22 kDa, mostrando que em SDS-PAGE, a lectina se associa em duas subunidades, mas sua forma monomérica é de 22 kDa. A presença de lectinas com mais de uma cadeia polipeptídica, como encontrado para KpLec, foi observada também por outros pesquisadores no estudo de lectinas de plantas. Lectinas podem ser encontradas desde a forma monomérica (Yamaguchi et al., 1998), como a dimérica (Van Damme et al., 1991), trimérica (Moreira et al., 1997) e tetramérica (Van Damme et al., 1987).

O sequenciamento N-terminal de KpLec mostrou que esta lectina apresenta homologia principalmente com a lectina de rizoma de *Urtica* (*Urtica dioica* aglutinina - UDA) (Tabela 2).

UDA é uma pequena lectina, com massa molecular de 8,5 kDa, pertencente à família de proteínas que apresentam domínio de ligação à quitina. Assim como KpLec exibe afinidade para N-acetilglicosamina e também apresenta atividade inseticida, mostrando inibir o desenvolvimento do bruquídeo *C. maculatus* e afetar a sobrevivência do lepidóptero (*M. vitrata*) (Machuka et al., 1999).

Quando KpLec foi submetida a ensaios de hemaglutinação, na presença de um agente quelante de cátions divalentes como o EDTA, a lectina perdeu sua atividade hemaglutinante em uma concentração de 12,5 mM, indicando que KpLec apresenta dependência de cátions divalentes, diferente do que foi encontrado por Moreira et al. (1998), que isolaram uma lectina de sementes de *Artocarpus incisa* (frutalina), que não requer qualquer cátion divalente para sua atividade, bem como a lectina de *T. esculenta* (Freire et al., 2001).

Na presença de EGTA, quelante de íons cálcio, KpLec não teve sua atividade inibida, mostrando que esta lectina não depende de cálcio para a sua atividade, e sim de magnésio e manganês. Estes resultados estão de acordo com Utarabhand e Akkayanont (1995), que demonstraram que a lectina purificada do feijão *Parkia javanica*, também não perdeu sua atividade quando tratada com EGTA em concentrações de até 40 mM, mas diferente de KpLec, esta lectina não perdeu sua atividade hemaglutinante na presença de EDTA (40 mM).

A associação das subunidades através das ligações por pontes dissulfeto não é essencial para a atividade da lectina, pois KpLec quando exposta a condições redutoras com DTT (10 mM) por 12 horas, a 25 °C, não perdeu sua atividade hemaglutinante. Entretanto, a interação entre pontes de hidrogênio presentes na proteína parece essencial para sua

atividade, pois quando a mesma foi submetida ao tratamento com uréia (8 M) por 12 horas, à temperatura ambiente, fez KpLec perder completamente sua atividade.

Palánová e Volf (1997), no estudo físico-químico de lectinas presentes em *Phlebotominae sandflies*, verificaram exatamente o contrário do que foi observado para KpLec. As lectinas de *P. sandflies* tiveram sua atividade hemaglutinante diminuída quando expostas ao DTT (10 mM) e nenhum efeito significativo foi observado após tratamento com Uréia (8 M). Estes autores atribuem o efeito do DTT às quantidades significativas de metionina e cisteína que as lectinas de *S. sandflies* possuem, ao contrário de KpLec, que apresentou baixo conteúdo destes aminoácidos.

A atividade hemaglutinante de KpLec sobre eritrócitos de rato foi inibida por todos os carboidratos testados (Tabela 4), mas KpLec apresentou maior afinidade por N-acetilglicosamina (0,09 mM). Outras lectinas que apresentam maior afinidade por N-acetilglicosamina são: a lectina de *Lentinus edodes* (Wang et al., 1999), lectina extracelular de *Agrobacterium radiobacter* (Joshi et al., 1997) e da *Urtica dioica* aglutinina, (Broekaert et al., 1989).

As lectinas são usualmente glicoproteínas com conteúdo variável de carboidrato (Moreira et al., 1991). De acordo com a metodologia utilizada neste trabalho, foi determinado que KpLec é uma glicoproteína que apresenta aproximadamente 14% de carboidrato total. Estes resultados estão de acordo com os de outros pesquisadores, que também isolaram lectinas com alto conteúdo de carboidratos, como Datta et al. (1991), Cavada et al. (1998), Moreira et al. (1998) e Freire et al. (2001).

A propriedade hemaglutinante da KpLec foi resistente ao tratamento com metaperiodato de sódio, um agente oxidante que destrói açúcares que contenham grupos

hidroxilas não substituídos (Rupp et al., 1995). O mesmo também foi observado para uma hemaglutinina manose-específica, isolada de cepas de *Escherichia coli* do trato urinário (Goldhar et al., 1984). Este processo de deglicolização usando metaperiodado vem sendo comumente usado por vários pesquisadores na área de caracterização de hemaglutininas de microorganismos, como no estudo de propriedades hemaglutinantes de *Escherichia coli* (Bhuiyan et al., 1995), e na caracterização da atividade hemaglutinante de *Salmonella choleraesuis*, *Bifidobacteria pseudolongum* e *Escherichia coli* K88 (Meng et al., 1998). O estudo da deglicosilação de glicoproteínas tem gerado certo questionamento quanto ao papel dos carboidratos na função das glicoproteínas (Edge et al., 1981).

A clivagem das unidades de carboidratos da lectina por TFMS e Anisol também não afetou a atividade da proteína, sugerindo que a atividade hemaglutinante esteja relacionada com a porção protéica da molécula. A atividade hemaglutinante de KpLec após tratamento com diferentes pHs se manteve estável numa ampla faixa de pH (5-10), perdendo sua atividade apenas em condições extremas, entre os pHs 2-4 e 12-14 (figura 11). Outras lectinas estáveis à variação de pH também foram estudadas por Machuka et al. (1999), na caracterização da lectina de *Sphenostyles stenocarpa* (ativa em pH 2-10), por Sampietro et al. (2000), que purificaram uma lectina de *Cyphomandra betacea*, ativa em pH variando de 5 – 9, muito semelhante à KpLec e por Freire et al. (2001), na purificação de uma lectina de sementes de *T. esculenta*, ativa em pHs 5-9.

Resultados da termoestabilidade da KpLec (figura 10) mostraram que esta lectina não apresentou diminuição considerável de sua atividade hemaglutinante até 80 °C por 30 minutos. Estes resultados são compatíveis com algumas lectinas de plantas, como a lectina

de *Saraca indica*, que é estável até 95 °C (Ray & Chatterjee, 1995), a lectina de *Vatairea macrocarpa* (Cavada et al., 1998) que ainda mantém 55% de sua atividade após 5 minutos de exposição a 100 °C, a lectina da casca de *Hevea brasiliensis* (Wititsuwannakul et al., 1998) estável até 80 °C e a lectina de *Talisia esculenta*, estável até 70 °C (Freire et al., 2001).

O tratamento de KpLec com enzimas proteolíticas como proteinase K e tripsina, por 30 minutos a 37 °C, aboliram completamente a atividade hemaglutinante, novamente sugerindo que esta atividade hemaglutinante esteja relacionada à parte protéica da molécula. Estes resultados são compatíveis com os encontrados por Rupp et al. (1995) e Wititsuwannakul et al. (1998) onde a digestão com enzimas proteolíticas levou a lectina ao mínimo de sua atividade hemaglutinante.

A agregação plaquetária propriamente dita consiste na formação de pontes intracelulares entre proteínas solúveis, principalmente fibrinogênio e fator VIII, e as glicoproteínas insolúveis GPIIb e GPIIb/IIIa presentes na membrana das plaquetas. Esse processo é desencadeado quando a concentração de fibras expostas de colágeno é muito alta ou quando há presença de agonistas no local lesado (Weiss & Lages, 1997; Matos, 1993). Por causa de sua grande importância, mudanças na função normal de plaquetas podem causar desordens trombóticas ou hemorrágicas. Na trombose, causas desconhecidas podem resultar na formação espontânea de agregados suficientemente grandes para bloquear a circulação (Derenleau, 1987). Esse distúrbio pode ser evitado pela inibição da agregação plaquetária, seja pela diminuição da síntese de agonistas ou pela ação das desintegrinas (Coller et al., 1995; London et al., 1996).

Os processos desencadeados pelos agonistas são acompanhados pela exposição de receptores a moléculas adesivas presentes na circulação sanguínea, tais como o fibrinogênio e o fator de von Willebrand (vWF), que podem levar à formação do tampão plaquetário conhecido como trombo, reduzindo ou interrompendo a perda de sangue no local de injúria (processos hemorrágicos). As plaquetas contribuem significativamente para manter a integridade da parede vascular e ajudam no processo de recuperação da lesão vascular (Jamieson, 1988; Hawiger, 1989).

Por sua especificidade de ligação a glicanos, lectinas podem se ligar à membrana das plaquetas, agindo tanto como indutoras quanto inibidoras da agregação plaquetária. Os dados mostraram que a lectina KpLec, incubada por 4 minutos, na presença de plasma rico em plaquetas (PRP), não teve atividade agregante e nem inibidora, nas concentrações até 100 μg (Fig 12). Os experimentos com KpLec (100 μg) na presença de ristocitina (um antibiótico que é análogo ao vWF), não apresentaram nenhum efeito significativo, estimulador ou inibidor da agregação. Outros ensaios com agonistas como o colágeno também foram realizados, sem que nenhum efeito modulador tenha sido observado. Estes resultados também foram encontrados por Ganguly & Fossett (1980), que verificaram que a lectina de lentilha se liga à membrana das plaquetas, mas não estimula sua agregação.

Quando se discute ou se especula sobre o papel fisiológico das lectinas de plantas, é de crucial importância perceber que, com exceção de algumas enzimas como quitinases, glucanases e glicosidases, lectinas são as únicas proteínas de plantas capazes de reconhecimento e ligação a glicoconjugados presentes na superfície externa de

microorganismos (como bactérias e fungos) ou glicoconjugados expostos ao longo da superfície do trato intestinal de predadores de plantas (Peumans e Van Damme, 1995).

KpLec, diferentemente de algumas lectinas vegetais que afetam o desenvolvimento de fungos, como a lectina de batata (Lungu et al., 1990), a lectina de rizoma de urtiga (*U. dioica*) (Broekaert et al., 1989) e a aglutinina de gérmen de trigo (WGA) (Ciopraga et al., 1999), não afetou o desenvolvimento dos fungos testados, *F. oxysporum*, *C. limdemuthianum* e *S. cerevisiae* (Figura 14), não podendo, portanto, ser utilizada como um agente fungistático para estes microorganismos.

Muitas lectinas de plantas têm sido extensivamente estudadas e usadas como ferramenta no estudo de estruturas de superfície celular (Mody et al., 1995). O modo pelo qual as lectinas induzem a lise celular por se ligarem a carboidratos da superfície celular ainda não está esclarecido. O que tem sido discutido é que algumas lectinas lisam as células por desencadearem apoptose (morte programada da célula), através da ativação de endonucleases endógenas, levando à fragmentação do DNA (Kim et al., 1993). Estudos demonstraram que algumas lectinas, como a fitohemaglutinina (PHA), concanavalina A (ConA) e a aglutinina de gérmen de trigo (WGA) apresentam efeito citotóxico em certas linhagens celulares (Stanley, 1981).

Com o propósito de verificar se KpLec apresentava algum efeito citotóxico, utilizou-se células vero (células de rim de macaco verde) como modelo biológico para o estudo desta atividade. De acordo com os testes realizados, KpLec também exibiu atividade citotóxica considerável (alterações morfológicas e desprendimento do tapete celular), após 4 horas de incubação com as células, numa concentração de 62,5 µg/ml (Figura 13).

Estudos mais detalhados da ação de KpLec sobre linhagens celulares serão necessários para o esclarecimento de suas propriedades biológicas, de possíveis alterações intracelulares, além de verificar se KpLec exerce atividade citotóxica sobre outras linhagens celulares ou mesmo sobre células tumorais, já que estas últimas apresentam extrema variação na composição e distribuição dos glicoconjugados da superfície celular (Sharon, 1983).

O rápido desenvolvimento de novas tecnologias na incorporação de genes em uma variedade de cultivares tem aumentado o interesse na identificação de genes de plantas que conferem resistência a insetos; a manipulação desses genes pode aumentar a capacidade de defesa de plantas contra insetos (Macedo et al., 2000). Assim, esta nova estratégia para o controle de pragas seria uma alternativa ao uso de pesticidas químicos (Jouanin et al., 1998).

O envolvimento de lectinas no controle de insetos tem sido avaliado, principalmente e primeiramente, através de experimentos de alimentação, utilizando dietas artificiais contendo preparações de lectinas (Machuca et al., 1999). Através desta simulação, o potencial de lectinas em inibir o desenvolvimento de insetos pode ser avaliado.

Em períodos severos de infestação, a perda de sementes de feijão armazenadas (*V. unguiculata*) após colheita, pode atingir até 100% em um período de 6 meses, devido ao ataque do bruquídeo *C. maculatus* (Hall et al., 1997). Desta maneira, o efeito de KpLec sobre larvas destes bruquídeos foi avaliado, através de experimentos no qual medimos o número e o peso de larvas sobreviventes após 20 dias da oviposição em sementes artificiais, contendo concentrações variadas da lectina. KpLec exerceu um decréscimo significativo (55%) no número de indivíduos na concentração de 1% de proteína (Figura 16) e, concomitantemente, uma redução de até 56% na massa corpórea dos indivíduos alimentados com sementes

artificiais que também continham 1% da lectina (Fig 17). Outras lectinas de plantas, como a lectina de sementes de *Maclura pomifera*, a lectina de amendoim (*Arachis hypogaea*), a lectina de gérmen de trigo (WGA) e a lectina de tubérculo de batata, inibiram o desenvolvimento de *C. maculatus* quando incorporadas em sementes artificiais, a 0,1% e 1,0% de proteína (Murdock et al., 1990). A *U. dioica* aglutinina (UDA), uma lectina N-actilglicosamina específica, para a qual KpLec mostrou apresentar homologia, também é tóxica para o bruquídeo *C. maculatus* a 1%, quando incorporada em dietas artificiais (Huesing, 1991).

O modo de ação inseticida das lectinas de plantas ainda não está completamente esclarecido, mas acredita-se que estas proteínas possam provocar efeitos deletérios pela ligação a receptores glicosilados na superfície do intestino dos insetos (Pusztai & Bardocz, 1996). Além disso, Haper et al. (1998) recentemente demonstraram que lectinas podem interferir na formação e integridade da membrana peritrófica do intestino médio dos insetos.

A. kuehniella é a principal praga dos moinhos de farinha e muitas vezes, ataca também grãos de cereais armazenados. Ela habita principalmente lugares usados para processar grãos ou preparar produtos que utilizem farinha, como padarias e moinhos de processamento de grãos de milho. Estas larvas envolvem todo o material no qual elas estão se alimentando, resultando em um aglomerado de partículas sólidas e fezes. KpLec também foi efetiva sobre o desenvolvimento deste lepidóptero. A mortalidade larval foi de 43% e 55% na dieta artificial que continha 0,5% e 1,0% da lectina, respectivamente (Fig. 19). Além de KpLec reduzir em mais de 50% o número de larvas deste inseto, diminuiu também o peso das mesmas em até 90%, na concentração de 1% de proteína (fig 20). Semelhante à ação de KpLec, outras lectinas também são ativas contra lepidópteros, como a lectina de

amendoim (*A. hypogaea*), que aumentou a mortalidade larval do lepidóptero *Chilo partellus* em 46,2% e 48,1%, nas concentrações de 0,5% e 1,0%, respectivamente. Entretanto, a lectina de ervilha (*P. sativum*) não foi tóxica para *C. partellus*, em concentrações até 1% (Lav & Kfir, 1997). Outra duas lectinas, WGA e a aglutinina de *B. purpúrea*, foram efetivas contra larvas do lepidóptero *O. nubilalis*, quando incorporadas na dieta a 2% (Czapla & Rang 1990).

Diferente do que foi encontrado para KpLec, que foi tóxica tanto para um coleóptero quanto para um lepidóptero, a lectina de *Sphenostyles stenocarpa* mostrou afetar o desenvolvimento do coleóptero *C. maculatus*, mas não teve efeito tóxico significativo sobre larvas do lepidóptero *Maruca vitrata* (Machuka et al., 2000). Entretanto, a lectina manose-específica de *Galanthus nivalis* (GNA) é tóxica para vários insetos predadores, incluindo homópteros, coleópteros e lepidópteros, quando incorporada em dietas artificiais (Foissac et al., 2000). Embora seja muito provável que a toxicidade das lectinas seja baseada na ligação específica de glicoconjugados em algum lugar do intestino médio dos insetos, o mecanismo exato da ação das lectinas não é totalmente conhecido. Três tipos de interação são possíveis: (a) ligação lectina-quitina da membrana peritrófica; (b) ligação da lectina a glicoconjugados das células epiteliais ao longo do trato digestivo; e (c) ligação de lectinas a enzimas digestivas glicosiladas (Peumans et al., 1995).

Os resultados das incorporações em dietas artificiais, tanto para *C. maculatus*, quanto para *A. kuehniella*, sugerem que KpLec possa ser empregada em estudos mais aprofundados, que envolvam o mecanismo de defesa de plantas ao ataque de insetos. Entretanto, tem que considerado que plantas que contenham açúcares, principalmente na seiva, podem diminuir a toxicidade das lectinas, a expressão de genes que codificam

lectinas, nesse caso, pode ser ineficiente para a proteção da planta. Mas, inversamente, quando o açúcar inibitório estiver ausente, lectinas podem ser muito eficientes. Tem que se levar em conta também, antes que genes de lectinas possam ser aplicados em larga escala para conferir resistência a insetos e nematóides em plantas, um possível risco à saúde de consumidores humanos e animais, já que algumas lectinas mostrarm ser tóxicas.

VI. CONCLUSÕES

- KpLec é constituída por duas cadeias polipeptídicas de 22 e 44 kDa;
- É uma glicoproteína, que apresenta 14% de carboidrato total;
- Apresenta maior afinidade por N-acetilglicosamina (0,09 mM);
- Possui alto conteúdo de aminoácidos hidrofóbicos (Gly, Val, Leu, Ile);
- Apresenta homologia principalmente com a *Urtiga dioica* aglutinina (UDA);
- Não sofre alteração na sua atividade hemaglutinante quando exposta ao DTT, mas quando submetida ao tratamento com uréia torna-se inativa;
- KpLec não é dependente de cálcio mas, de íons como magnésio e manganês;
- A atividade hemaglutinante de KpLec não foi afetada por agentes deglicosilantes (TFMS) e oxidantes (metaperiodado de sódio);
- É uma lectina estável a uma ampla faixa de pH (5-10);
- É termoestável, não apresenta diminuição considerável de sua atividade até 80 °C;
- O tratamento com proteinase K e tripsina (enzimas proteolíticas) fez com que a lectina perdesse completamente sua atividade;
- Mostrou não estimular e nem inibir a agregação plaquetária;
- Não afeta o desenvolvimento dos fungos *F. oxysporum*, *C. lindemuthianum* e *S. cerevisiae*;
- Apresenta atividade citotóxica em relação a células Vero;
- Possui atividade inseticida, reduzindo o número e peso das larvas de *C. maculatus* e *A. kuehniella*.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adar, R., Richardson, M., Lis, H. and Sharon, N., 1989. The amino acid sequence of *Erythrina corallodendron* lectin and its homology with other legume lectins. *FEBS Lett.* **257**: 81-85.
- Al-Mehmood, S., Colin, S., and Bonaly, R., 1992. *Kluyveromyces bulgaricus* yeast lectins: isolation of two gal-specific lectin forms from yeast cell wall. *J. Biol. Chem.* **266**: 20882-20887.
- Ali, N., 1991. Soluble β -galactoside binding lectins: physicochemical and functional properties. *Biochem. Educ.* **19**: 2-6.
- Andrews, R. K., Booth, W. J., Gorman, J. J., Castaldi, P. A. and Berndt, M. C., 1989. Purification of botrocetin from *Bothrops jararaca* venom. Analysis of the botrocetin mediated interaction between von Willebrand factor and the human platelet membrane glycoprotein Ib-IX complex. *Biochemistry.* **28**: 8317-8326.
- Ayoub, A., Causse, H., Van Damme, E. J. M., Peumans, W.J., Cambillau, P and Rougé, P., 1994. Interactions of plant lectins with the components of the bacterial cell wall peptidoglycan. *Biochem. Syst. Ecol.* **22**: 153-159.
- Balzarini, J., Neyts, J., Schols, D., Hosoya, M., Van Damme, E., Peumans, W., and De Clercq, E., 1992. The mannose-specific plant lectins from *Cymbidium hybrid* and *Epipactis helleborine* and the (N-acetylglucosamine) n-specific plant lectin from *Urtica dioica* are potent and selective inhibitors of human immunodeficiency virus and cytomegalovirus replication *in vitro*. *Antiviral Res.* **18**: 191-207.
- Banerjee, R., Mande, S. C. & Ganesh, V., 1994. Crystal structure of peanut lectin, a protein with an unusual quaternary structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**: 227-31.
- Bar-Shavit, Z., Ofek, I., Goldman, R., Mirelman, D., and Sharon, N., 1977. Mannose residues on phagocytes as receptors for the attachment of *E. coli* and *S. typhi*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **78**: 455-460.
- Bar-Shavit, Z., Goldman, R., Ofek, I., Sharon, N., Mirelman, D., 1980. Mannose-binding activity of *Escherichia coli*: a determinant of attachment and ingestion of the bacteria by macrophages. *Infect. Immunol.* **29**: 417-424.
- Barbieri, L., Batelli, G. B. and Stirpe, T., 1993. Ribosome-inactivating proteins from plants. *Biochim. Biophys. Acta.* **1154**: 237-282.
- Barbieri, L., Valbonesi, P., Gorini, P., Pession, A. & Stirpe, F., 1996. Polynucleotide adenosine glycosidase activity of saporin-L1: effect on DNA, RNA and poly(A). *Biochem. J.* **319**: 507-513.

- Barondes, S. H., Castronovo, V. Cooper, D. N. W., Cummings, R. D., Drickamer, K., Feizi, T. Gitt, M. A., Hirabayashi, J., Hughes, C. Kasai, K-I., Leffler, H., Liu, F-T. Lotan, R. Mercurio, A. M., Monsigny, M., Dillai, S., Poirer, F., Raz, A., Rigby, P. W. J., Rini, J. M. & Wang, J. L. 1994a. Galectins: a family of animal β -galactoside binding lectins. *Cell*. **79**: 597-598.
- Barondes, S. H., Cooper, D. N. W., Gitt, M. A., e Leffler, H., 1994b. Galectins: structure and functions of a large family of animal lectins. *J. Biol. Chem.* **269**: 20807-20810.
- Beachey, E. H., 1981. Bacterial clearance: adhesin-receptor interactions medianting the attachment of bacteria to mucosal surfaces. *J. Infect. Dis.* **143**: 325-345.
- Becker, J. W., Reeke, G. N., Cunningham, B. A. & Edelman, G. M., 1976. New evidence on the location of the saccharide binding site of Concanavalin A. *Nature*. **259**: 406-409.
- Belitz, H. D. and Weder, J. K. P., 1990. Protein Inibitor of hydrolases in plant foodstuffs. *Food Rev. Int.*, **6**: 151-211.
- Bell, A., Fitches, E. C., Down, R. E., Marris, G. C., Edwards, J. P., Gatehouse, J. A. and Gatehouse, A. M. R., 1999. The effect of snowdrop lectin (GNA) delivered via artificial die and transgenic plants on *Eulophus pennicornis* (Hymenoptera: Eulophidae) a parasitoid pf the tomato moth *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera: noctuidae). *J. Insect. Physiol.* **45**: 983-991.
- Benjamin, C. F., Figueiredo, R. C. Henriques, M. G. M. O. and Barja-Fidalgo, C., 1997. Inflammatory and anti-inflammatory effects of soybean agglutinin. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **30**: 873-881.
- Berndt, M. C. and Phillips, D. R., 1981. Platelet membrane proteins: Composition and receptor function. In: *Platelets in Biology and Pathology*. **2**: 43-76.
- Beuth, J., Ko, H. L., Schroten, H., Solter, J., Uhlenbruck, G. & Pulverer, G., 1987. Lectin-mediated adhesion of *Streptococcus pneumoniae* and its specific inhibition *in vitro* and *in vivo*. *Zentrabl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg.* **265**: 160-168.
- Beuth, J., Ko, H. L., Uhlenbruck, G. & Pulverer, G. 1987. Lectin-mediated adhesion to humar tissue. *Eur. J. Clin. Microbiol.* **6**: 591-593.
- Bjorksten, B. and Wadstrom, T., 1982. Interaction of *E. coli* with different fimbriae and polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immun.* **38**: 298-305.
- Bhuiyan, S. H., Rahman, H. and Haider, K., 1995. Study of hemagglutinating property of enteroinvasive *Escherichia coli* from various geographical locations. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* **48**: 193-198.

- Blumenstock, E. and Jann, K., 1982. Adhesion of pilated *E. coli* strains to phagocytes: differences between bacteria with mannose-sensitive pilli and those with mannose-resitant pilli. *Infect. Immun.* **35**: 264-269.
- Boehlmann, H., Clausen, S., Behnke, S., Gise, H., Hiller, C., Reihmann-Philipp, V., Schrader, G., Barkholt, V. & Apel, K., 1988. Leaf specific thionins of barley: a novel class of wall proteins toxic to plant pathogenic fungi and possibly involved in the defense mecanisms of plants. *EMBO. J.* **7**: 1559-65.
- Borreback, C. A. & Rougé, P., 1986. Mitogenic properties of structurally related Lathyrus lectins. *Arch. Biochem. Biophys.* **248**: 30-34.
- Boyd, W. C. e Reguera, R. M. 1949. Studies on hemagglutinins present in seeds of some representatives of the family Leguminoseae. *J. Immunol.* **62**: 333-339.
- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principal of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Broekaert, W. F., Van Parijs, J., Leyns, F., Joos, H. and Peumans, W. J. 1989. A chitin-binding lectin from stinging nettle rhizomes with antifungal properties. *Science*. **245**: 1100-1102.
- Broekaert, W. F., arien, W., terras, F. R. G., De Bolle, M. F. C., Proost, P., Van Damme, J., Dillen, L., Claeys, M., Rees, S. B., Vanderleyden, J. & Cammue, B. P. A., 1992. Antimicrobial peptides from *Amaranthus caudatus* seeds with sequence homology to the cysteine/glycine-rich domain of chitin-binding proteins. *Biochemistry*. **31**: 4308-14.
- Broekaert, W. F and Peumans, W. J., 1996. Lectin release from seeds of *Datura stramonium* and interference of the *Datura stramonium* lectin with bacterial motility. In: TC Bog-Hansen, e Van Driessche, eds, Lectins, Biology, biochemistry, Clinical Biochemistry, vol **5**. Walter de Gruyter, Berlin, pp 57-65.
- Burger, M. M. and Goldberg, A. R., 1967. Identification of a tumor – specific determinat on neoplastic cell surfaces. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **57**: 359-366.
- Calderon, A. M., Buck, G. And Doyle, R. J., 1997. Lectin-microorganism complexes. In Van Driessche E., Beeckmans, TC Bog-Hansen (eds): lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry, vol **12**.
- Cavada, B. S., Santos, C. F., Granjeiro, T. B., Nunes, E. P., Sales, P. V. P., Ramos, R. L., De Souza, F. A. M., Crisostomo, C. V. and Calvete, J. J., 1998. Purification and characterization of a lectin from seeds of *Vatairea macrocarpa* Duke. *Phytochemistry*. **49**: 675-680.
- Ciopruga, J., Gozia, O., Tudor, R., Brezuica, L. and Doyle, R. J., 1999. Fusarium sp. growth inhibition by wheat germ agglutinin. *Biochim. Biophys. Acta*. **1428**: 424-432.

- Clemetson, K. J., Pfueller, S. L., Lüscher, E. F. and Jenkins, C. S. P., 1977. Isolation of the membrane glycoproteins of human blood platelets by lectin affinity chromatography. *Biochim Biophys. Acta*. **464**: 493-508.
- Coller, B. S., Anderson, K. and Weisman, H. F., 1995. New antiplatelet agents: platelet GPIIb/IIIa antagonists. *Thromb. Haemost.* **74**: 302-308.
- Collinge, D. B., Kragh, K. M., Mikkelsen, J. D., Nielsen, K. K., Rasmussen, U and Vad, K. 1993. Plant chitinases. *Plant. J.* **3**: 31-40.
- Cooper, H. A., Clemetson, K. J. and Lüscher, E. F., 1979. Human platelet membrane receptor for bovine von Willebrand factor (platelet aggregation factor) : an integral membrane glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **76**: 1069-1073.
- Cooper, E. L., 1980. Phylogeny of cytotoxicity. *Endeavour*. **4**: 160-165.
- Cunningham, B. A., Wang, J. L., Waxdal, M. J. & Edelman, G. M., 1975. The covalent and three dimensional structure of concanavalin A. II- Amino acid sequence of cyanogen bromide fragment F3. *J. Biol. Chem.* **250**: 1503-1512.
- Czapla, T. H and Lang, B. A., 1990. Effect of plant lectins on the larval development of European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) and southern corn rootworm (Coleoptera Chrysomelidae). *J. Econ. Entomol* **83**: 2480-2485.
- Datta, P. K., Figueroa, M. O. D. C. R. and Lajolo, F. M., 1991. Purification and characterization of two major lectins from *Araucaria brasiliensis* syn. and *Araucaria angustifolia* seeds (Pinhão). *Plant Physiol.* **97**: 856-862.
- Delbaere, L. T. J., Vandonselaar, M., Prasad, L., Quail, J. W., Wilson, K. S. & Dauter, Z., 1993. *J. Mol. Biol.* **230**: 950-965.
- De Oliveira, J. T. A., Cavada, B. S. & Moreira, R. A., 1991. Isolation and partial characterization of a lectin from *Cratylia floribunda* Mart. Seeds. *Rev. Brasil. Botânica*. **14**: 63-69.
- Depierreux, C. Kang, H. C., Guerin, B., Monsigny, M. e Delmotte, F., 1991. Characterization of an *Agrobacterium tumefaciens* lectin. *Glycobiology* **1**: 643-649.
- Derenleau, D. A., 1987. Blood platelet shape change ABCs. *Trends Biochem. Sci.* **12**: 439-442.
- Dessen, A., Dabesan, G. S., Brewer, C. F. and Sachetini, J. C., 1995. X-ray crystal structure of the soybean agglutinin cross-linked with a branched analog of the blood group I carbohydrate antigen. *Biochemistry*. **34**: 4933-4942.

- Drickamer, K., 1988. Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. *J. Biol. Chem.* **263**: 9557-9560.
- Drickamer, K., 1993. Evolution of Ca^{2+} -dependent animal lectins. *Prog. Nucl. Acid. Res.* **45**: 207-232.
- Drickamer, K. & Taylor, M. E., 1993. Biology of animal lectins. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **9**: 237-264.
- Dubois, M., Giles, K. A., Hamilton, J. K. and Rebers, P. A., 1956. Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. *Anal Chem.* **28**: 350-6.
- Duranti, M. & Gius, C. 1997. Legume seeds: protein content and nutritional value. *Field Crop Res.* **53**: 35-45.
- Einspahr, H., Parks, E. H., Suguna, K., Subramanian, E. & Suddath, F. L., 1996. *J. Biol. Chem.* **261**: 16518-27.
- Etzler, M. E. 1986. In: The lectins: Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine, pp. 371-435.
- Fabregus, J. & Carracedo, A., 1989. Purification and partial characterization of tomentin: an N-acetylglucosamine-specific lectin from the green algae *Codium tomentosum*. *J. Exp. Mar. Biol.* **124**: 21-30.
- Firon, N., Ofek, I. and Sharon, N., 1984. Carbohydrate binding sites of the mannose-specific fimbrial lectins of enterobacteria. *Infec. Immun.* **43**: 1088-1090.
- Foissac, X., Loc Thi, N., Christou, P., Gatehouse, A. M. and Gatehouse, J. A., 2000. Resistance to green leafhopper (*Nephotettix virescens*) and brown planthopper (*Nilaparvata lugens*) in transgenic rice expressing snowdrop lectin (*Galanthus nivalis* agglutinin; GNA). *J. Insect. Physiol.* **46**: 573-583.
- Ford, W. W., 1910. The distribution of haemolysis agglutinins and poisons in fungi, especially the Amanitas, th entolomas, the Lactarius and the Inocybes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2**, 285-318.
- Francischetti, I. M. B., Saliou, B., Leduc, M., Carlini, C. R., Hatmi, J. R., Faili, A and Cassian, B., 1997. Convulxin, a potent platelet- aggregating protein from *Crotalus durissus terrificus* venom, specifically binds to platelets. *Toxicon.* **35**: 1217-1228.
- Freire, M. G. M., Gomes, V. M., Corsini, R. E., Machado, O. L., de Simone, S. G., Novello, J. C., Marangoni, S. and Macedo, M. L. R. Isolation and partial characterization of a novel lectin

- from *Talisia esculenta* seeds that interferes with fungal growth. *Plant Physiology and Biochemistry. In press.*
- Friedberger, E. and Brossa, G. A., 1912. Ueber die Wirkungen von Pilzextracten. Wirkung der Extrakte von champignon *Agaricus campestris*, Steinpilz (*Boletus edulis*) und Pfefferling (*Cantharellus cibarius*) auf rote Blutkörperchen. *Z. Immunitätsforsch. Exp. Ther.* **15**, 506-517.
- Gabius, H. J., 1994. Non carbohydrate binding partners, domains of animal lectins. *Int. J. Biochem.* **26**: 469-477.
- Gabius, H. J., 1997. Structure and function of plant lectins. In: *Glycosciencis*. Sigrun Gabius (Ed.), pp 415-438.
- Galli-Vallerio, B., 1916. Hämagglutinine und Hämolyse in getrockneten Pilzen. *Z. Immunitätsforsch. Exp. Ther.* **25**, 154-162.
- Ganguly, P., Gould, N. L. and Sidhu, P., 1979. Interaction of lectins with human platelets Effect on Platelet stimulation by thrombin and ristocetin. *Biochim. Biophys. Acta.* **586**: 574-583.
- Ganguly, P. and Fossett, N. G., 1980. Interaction of lentil lectin with human platelets Evidence against glycoprotein II as aggregation mediator. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **92**: 499-504.
- Ganguly, P. and Fossett, N. G., 1980. Evidence for multiple mechanisms of interaction between Wheat Germ Agglutinin and human platelets. *Biochim. Biophys. Acta.* **627**: 256-61.
- Giloba, G. N., 1982. *Pseudomonas aeruginosa* lectins. *Meth. Enzymol.* **83**: 378-385.
- Goldhar, J., Perry, R. and Ofek, I., 1984. Extraction and properties of nonfibrous manose resistant hemagglutinin from a urinary isolate of *Escherichia coli*. *Curr. Microbiol.* **11**: 49-54.
- Goldstein, I. J., Hughes, R. C., Monsigny, M., Ozawa, T. and Sharon, N., 1980. What should be called a lectin? *Nature*, **285**: 66.
- Goldstein, I. J. and Poretz, R. D., 1986. Isolation, physicochemical characterization and carbohydrate binding specificity of lectins. In: Liener, I. E., Sharon, N. and Goldstein, I. J. (Eds). *The Lectins, Properties, Functions and Application in Biology and medicine*. Academic Press, Orlando, FL. pp: 33-247.
- Greenberg, J., Packham, M. A., Cazenave, J. -P., Reimers, H. -J. and Mustard, J. F., 1975. Effects on platelet function of removal of platelet sialic acid by neuraminidase. *Lab. Invest.* **32**: 476-484.

Guillot, J., Genaud, L., Gueugnot, J. and Damez, M., 1983. Purification and properties of two hemagglutinins of the mushroom *Laccaria amethystina*. *Biochemistry*. **22**, 5365-5369.

Guillot, J. and Konska, G., 1997. Lectins in higher fungi. *Bioche. Systemat. Ecol.* **25**, 203-230.

Guimarães, L. F. L. & Collins, C. H., 1990. Cromatografia líquida de alta eficiência. In: Collins, C. H., Braga, G. L. e Bonato, P. S. Introdução a métodos cromatográficos. 5ª ed., Ed. da Unicamp, Campinas – SP, Brasil.

Habib, M. E. M. and Fagundes, G. G., 1996. Sensitivity of *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879) (Lepidoptera, Pyralidae) and its natural ectoparasite, *Habrobracon hebetor* (Say, 1836) (Hymenoptera, braconidae) to microwaves (2450 mhz). In: proceedings of the 20th International Congress of Entomology, Florence, Italy, 25-31 August pp. 581.

Habibi, J., Backus, E. A. and Huesing, J. E., 2000. Effects of phytohemagglutinin (PHA) on the structure of midgut epithelial cells and localization of its binding sites in western tarnished plant bug, *Lygus hesperus* knight. *J. Insect. Physiol.* **46**: 611-619.

Hall, A. E., Singh, B. B. and Ehlers, J. D., 1997. Cowpea breending. *Plant Breed. Rev.* **15**: 217-274.

Hamebryck, T., Dao-Thi, M. H. and Poortmans, F., 1995. The crystal structure of PHA-L. In: 16th Interlec Conference (Toulouse) : 92.

Harper, M. S., Hopkins, T. L. and Czaplá, T. H., 1998. Effect of wheat germ agglutinin on formation and structure of the peritrophic membrane in European corn borer (*Ostrinia nubilalis*) larvae. *Tissue & Cell.* **30**: 166-176.

Hawiger, J., 1989. Platelet secretory pathways. *Meth. Enzymol.* **169**: 191-195.

Hemperley, J. J., Hopp, T. P., Becker, J. W. & Cunningham, B. A., 1979. The chemical characterization of favin, a lectin isolated from *Vicia faba*. *J. Biol. Chem.* **254**: 6903-6810.

Hilder, V. A., Powell, K. S., Gatehouse, A. M. R., Gatehouse, J. A., Gatehouse, L. N., Shi, Y., Hamilton, W. D. O., Merryweather, A., Newell, C., Timans, J. C., Peumans, W. J., Van Damme, E. J. M and Boulter, D., 1995. Expression of snowdrop lectin in transgenic tobacco plants results in added protection against aphids. *Transgenic. Res.* **4**: 18-25.

Hilder, V. A. & Boulter, D., 1999. Genetic engineering of crop plants for insect resistance – a critical review. *Crop Protection.* **18**: 177-191.

Hokama, A. & Iwanaga, M. 1991. Purification and characterization of *Aeromonas sobria* pili, a possible colonization factor. *Infect. Immun.* **59**: 3478-3483.

- Honma, Y. & Nakasone, N., 1990. Pili of *Aeromonas hydrophila*: purification, characterization and biological role. *Microbiol. Immunol.* **32**: 83-98.
- Howard, M. A. and Firkin, B. G., 1971. Ristocetin – A new tool in the investigation of platelet aggregation. *Thromb. Diath. Haemorrh.* **26**: 362-369.
- Huang, X., Xie, W. and Gong, Z., 2000. Characteristics and antifungal activity of a chitin binding protein from *Ginkgo biloba*. *FEBS Lett.* **478**: 123-126.
- Huesing, J. E., Murdock, L. L and Shade, R. E., 1991a. Rice and stinging nettle lectins insecticidal activity similar to wheat germ agglutinin. *Phytochemistry.* **30**: 3565-3568.
- Huesing, J. E., Shade, R. E., Chrispeels, M, J and Murdock, L. L., 1991b. α -amylase inhibitor not phytohemagglutinin, explains resistance of common bean seeds to cowpea weevil. *Plant Physiol.* **96**: 993-996.
- Hughes, R. C., 1976. Membrane Glycoproteins London-Boston: Butter-worths, 1976.
- Jamieson, G. A., 1988. Platelet membrane receptors: molecular biology, immunology, biochemistry and pathology. *Progr. Clin. Biol Res.* **283**:
- Jenkins, C. S. P., Phillips, D. R., Clemetson, K. J., Meyer, D., Larrieu, M. –J. and Lüscher, E. F. Platelet membrane glycoproteins implicated in ristocetin – induced aggregation. *J. Clin. Invest.* **57**: 112-124.
- Jouanin, L., Bottino-Bonadé, M., Girard, C., Morrot, G. and Giband, M., 1998. Transgenic plants for insect resistance. *Plant Science.* **131**: 1-11.
- Joshi, B., Khire, J. M., SivaRaman, H. and Khan, M. I., 1997. Purification and characterization of na extracellular lectin (lectin I) from *Agrabacterium radiobacter* NCIM 2443. *Biochim. Biophys. Acta.* **1336**: 218-224.
- Karasaki, Y., Tsukamoto, S., Mizusaki, K., Sugiura, T. and Gotoh, S., 2001. A garlic lectin exerted an antitumor activity and induced apoptosis in human tumor cells. *Food Res. Int.* **34**: 7-13.
- Karlsson, K. A. 1989. Animal glycosphingolipids as membrane attachment sites for bacteria. *Ann. Rev. Biochem.* **58**: 309-350.
- Kawagishi, H., 1995. Mushroom lectins. *Food Rev. Int.* **11**: 63-68.
- Kawagishi, H., Takagi, J., Taira, T., Murata, T. and Useu, T., 2001. Purification and characterization of a lectin from the mushroom *Mycoleptodonoides aitchisonii*. *Phytochemistry.* **56**: 53-58.

- Kawasaki, T., Sakai, Y., Taniuchi, Y., Sato, K., Maruyama, K., Shimizu, M., Katu, S., Yano, S., Inagaki, O., Tomioka, K., Ynagisawa, I. and Takenaka, T., 1996. Biochemical characterization of a new desintegrin, flavostatin, isoleted from *Trimeresurus flavoviridis* venom. *Biochimie*. **78**: 245-252.
- Kennedy, J. F., Palva, P. M. G., Corella, M. T. S., Cavalcanti, M. S. M. & Coelho, L. C. B. B., 1995. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. *Carb. Polym.* **26**: 219-230.
- Kim, M., Rao, M. V., Tweardy, D. J., Prakash, M., Galli, U. and Gorelik, E., 1993. Lectins induced apoptosis of tumour cells. *Glycobiology*. **3**: 447-453.
- Kirby, E. P., 1977. Factor VIII- associated platelet aggregation. *Thromb. Haemost.* **38**: 1054-1072.
- Ko, H.L., Beuth, J., Solter, J., Schroten, H. Uhlenbruck, G. & Pulverer, G., 1987. *In vitro* and *in vivo* inhibition of lectin-mediated adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* by receptor blocking carbohydrates. *Infection* **15**: 237-240.
- Kochibe, N. & Matta, K. L., 1989. *J. Biol. Chem.* **264**: 173-177.
- Kocourek, J. e Horejsi, V., 1983. A note of the recent discussion of definition of the term "lectin". In: T. C. Bog-Hansen, & G. A. Spengler, (eds). *Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical biochemistry*. Proceedings of 5th Lectin Meeting. Vol 3, walter de Gruyter Berlin-New York.
- Kolberg, J. & Sletten, K., 1982. Purification and Properties of a mitogenic lectin from *Lathyrus sativa* seeds. *Biochem. Biophys. Acta*. **704**: 26-30.
- Konami, Y., Yamamoto, K., Toyoshima, S. and Osawa, T., 1991. The primary structure of the *Laburnum alpinum* seed lectin. *FEBS Lett.* **286**: 33-38.
- Konska, G., 1993. Contribution à l' étude du complexe lectinique du polypore soufré *Laetiporus sulfureus* (Bull.:Fr.) Murr. Isolement et caractérisation d' une lectine spécifique de la N-acetyllactosamine. Mémoire pour le Diplôme de Recherche de l' Université d' Auverge Mention Pharmacie, Clermont-Ferrand.
- Kouchalakos, R. N., Bates, O. J., Bradslaw, R. A. and Kenneth, D. Hapner.,1984. Lectins from Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* scop.) Complete amino acid sequence. *Biochemistry*. **23**: 1824-1830.
- Kudrya, I. A. S., 1994. Alkaline serine proteinase and lectin isolation from culture fluid of *Bacillus subtilis*. *Appl. Microbiol. Biotech.* **41**: 505-509.
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. *Nature*. **227**: 680-685.

- Landsteiner, K. & Raubitscheck, H., 1907. Beobachtungen über Hämolyse und Hämaggglutination. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenk. Infektionskr. Hyg. Abt. 1: Orig* **45**: 660-667
- Law, I. J. & Kfir, R., 1997. Effect of mannose-binding lectin from peanut and pea on the stem borer *Chilo partellus*. *Ent. Exp. et App.* **82**: 261-265.
- Lerner, D. R. & Raikhel, N. V., 1992. The gene for stinging nettle lectin (*Urtica dioica* agglutinin) encodes both a lectin and a chitinase. *J. Biol. Chem.* **267**: 11085-11091.
- Liener, I. E., 1986. Nutritional significance of lectins in the diet. In: I. E. Liener; N. Sharon & I. J. Goldstein, (Eds). *The Lectins: Properties, Functions, and Applications in Biology and Medicine*. Academic Press, New York.
- Lin, T. T. -S. and Li, S. S. -L., 1980. Purification and physicochemical properties of ricins and agglutinins from *Ricinus communis*. *Eur. J. Biochem.* **105**: 453-459.
- Linthorst, H. J. M., 1991. Pathogenesis – related proteins of plants. *Crit. Rev. Plant. Sci.* **102** 125-150.
- Lis, H. & Sharon, N., 1981. *J. Chromatogr.* **215**: 361-372.
- Locatelli, D. and Biglia, M., 1995. Development of *Ephestia kuehniella* (syn=Anagasta) (Zeller) and *Plodia interpunctella* (Hubner) (Pyralidae : Phycitinae) in backing ingredients and products. *Italian J. Food Sci.* **7**: 333-340.
- Logan, R. P., 1996. Adherence of *Helicobacter pylori*. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 10 Suppl. 1: 3-15.
- London, F., Ahmad, S. S. and Walsh, P. W., 1996. Annexin V inhibition of factor IXa – catalyzed factor X activation on human platelet and on negatively – charged phospholipid vesicles. *Biochemistry.* **35**: 16886-16897.
- Loris, R., Steyart, J. and Maes, D., 1993. Crystal structure determination and refinement at 2.3-Å resolution of the lentil lectin. *Biochemistry.* **32**: 8712-8.
- Lungu, M., Moroianu, J., Buliza, L., Vranceanu, V. and Motas, C., 1990. Inhibition of some plant pathogenic fungus growth by lectins. *Rev. Roum. Biochim.* **27**: 51-58.
- Macedo, M. L. R., Coelho, M. B., Freire, M. G. M., Machado, O. L. T., Marangoni, S. and Novello, J. C., 2000. Effect of a toxic protein isolated from *Zea mays* seeds on the development and survival of the cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus*. *Prot. Pep. Lett.* **7**: 225-231.

- Machuka, J. S., Okeola, O. G., Van Damme, Els. J. M., Chrispeels, M. J., Leuven, F. V. and Peumans, W. J., 1999. Isolation and partial characterization of galactose-specific lectins from African Yam beans, *Sphenostyles stenocarpa* Harms. *Phytochemistry* **51**: 721-728.
- Machuka, J. S., Van Damme, Els. J. M., Peumans, W. J. & Jackai, L. E. N., 1999a. Effect of plant lectins on larval development of the legume pod borer, *Maruca vitrata*. *Ent. Exp. App.* **93**: 179-187.
- Machuka, J. S., Okeola, O. G., Chrispeels, M. J. and Jackai, L. E. N., 2000. The African yam bean seed lectin affects the development of the cowpea weevil but does not affect the development of larvae of the legume pod borer. *Phytochemistry*. **53**: 667-674.
- Majerus, P. W., Brodie, G. N., 1972. The binding of phytohemmagglutinins to human platelet plasma membranes. *J. Biol. Chem.* **247**: 4253-4257.
- Marcusson-Begun, H., 1925. Untersuchungen über das hämagglutinin der Kartoffenolle. *Z. Immunitätsforsch. Exp. Ther.* **45**, 49-73.
- Masur, H. & Jones, T. C., 1978. The interaction in vitro of *Pneumocystis carinii* with macrophages and L-cells. *J. Exp. Med.* **147**: 157-170.
- Matos, M. F. C., 1993. Agregação de plaquetas induzida por trombina. Ação de caliceína plasmática humana e inibidores de serino proteinases de origem vegetal. São Paulo, Tese Doutorado – Universidade Federal de São Paulo.
- Melo, V. M. M., Duarte, A. B. G., Carvalho, A. F. F. U., Siebra, E. A. and Vasconcelos, I. M., 2000. Purification of a novel antibacterial and haemagglutinating protein from the purple gland of the sea hare, *Aplysia dactylomela* Rang, 1828. *Toxicon*. **38**: 1415-1427.
- Meng, Q., Kerley, M. S., Russel, T. J. and Allee, G. L., 1998. Lectins-Like activity of *Escherichia coli* K88, *Salmonella choleraesuis*, and *Bifidobacteria pseudolongum* of porcine gastrointestinal origin. *J. Anim. Sci.* **76**: 551-556.
- Mirelman, D., 1986. In: *Microbial lectins and Agglutinins: Properties and Biological Activity*, pp. 443, John Wiley and Sons, New York.
- Mirelman, D. & Ofek, I., 1986. Introduction to microbial lectins and agglutinins. In: D. Mirelman (Ed.) *Microbial lectins and agglutinins: properties and Biological activity*. pp 1-19. John Wiley & Sons, New York.
- Mirelman, D., 1987. Amoeba-bacterium relationship in amoebiosis. *Microbiol. Rev.* **51**: 272-284.
- Mirelman, D. & Rvdin, J. I., 1987. In: *Microbial lectins and Agglutinins. Properties and Biological Activity*, pp. 319-334, Mirelman, D., Ed., Wiley, New York.

- Mody, R., Joshi, S. and Charrey, W., 1995. Use of lectins as diagnostic and therapeutic tools for cancer. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.* **33**: 1-10.
- Moreira, R. A., Barros, A. C. H., Stewart, J. C. & Pusztai, A., 1983. Isolation and characterization of a lectin from the seeds of *Dioclea grandiflora* Mart. *Planta*. **158**: 63-69.
- Moreira, R. A. & Oliveira, J. T., 1983. *Biol. Plant.* **25**: 336-342.
- Moreira, R. A. & Cavada, B. S., 1984. Lectins from *Canavalia brasiliensis* Mart. Isolation, characterization and behavior during germination. *Biol. Plant.* **26**: 113-120.
- Moreira, R. A., Ainouz, I. L., De Oliveira, J. T. A. and Cavada, B. S., 1991. Plant Lectins, Chemical and Biological Aspects. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. **86**, Suppl. II, 211-218.
- Moreira, R. A., Monteiro, A. C. O., Horta, A. C. G., Oliveira, J. T. A. and Cavada, B. S., 1997. Isolation and characterization of *Dioclea altissima* var. *megacarpa* seed lectin. *Phytochemistry*. **2**: 139-144.
- Moreira, R. A., Castelo-Branco, C. C., Monteiro, A. C. O., Tavares, R. O. and Beltramini, L. M., 1998. Isolation and partial characterization of a lectin from *Artocarpus incisa* L. seeds. *Phytochemistry*. **7**: 1183-1188.
- Murdock, L. L., Huesing, J. E., Nielsen, S. S., Pratt, R. C and Shade, R. E., 1990. Biological effects of plant lectins on the cowpea weevil. *Phytochemistry* **29**: 85-89.
- Naim, H. Y., Clemetson, K. J. and Lüscher, E. F., 1982. Effects of galactose- binding lectins on human blood platelets: Identity of the peanut agglutinin receptor with the von Willebrand factor receptor. *Thromb. Res.* **26**: 431-441.
- Nicolson, G.L. & Blaustein, J. K., 1972. *Biochem. Biophys. Acta.* **266**: 543-547.
- Nicolson, G. L., 1976. Trans-membrane control of the receptors on normal and tumor cells. II. Surface changes associated with transformation and malignancy. *Biochim. Biophys. Acta.* **458**: 1-72.
- Nieva-Moreno, M. I., Isla, M. I., Sampietro, A. R. And Vattuone, M. A., 1997. Biological activity of the lectin from mature *Cyphomandra betacea* Sendt fruits. *Eur. J. Cell. Biol.* **74** (suppl 46) : 35.
- Nomura, K., Ashida, H., Uemura, N., Kushibe, S., Ozaki, T. and Yoshida, M., 1998. Purification and characterization of a mannose/glucose specific lectin from *Castanea crenata*. *Phytochemistry*. **49**: 667-673.

- Nurden, A. T. and Caen, J. P., 1975. Specific roles for platelet surface glycoproteins in platelet function. *Nature*. **255**: 720-722.
- O' Brien, A. D. & Holmes, R. K., 1987 Shiga and Shiga-like toxins. *Microbiol. Rev.* **51**: 206-220.
- Ofek, I. & Sharon, N. 1988. Lectinophagocytosis: a molecular mechanism of recognition between cell surface sugars and lectins in the phagocytosis of bacteria. *Infect. Immun.* **56**: 539-547.
- Ofek, I. & Sharon, N. 1990. Adhesins as lectins: specificity and role in infection. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **151**: 91-113.
- Ogilvie, M. L., Byl, J. W. and Gartner., 1989. Platelet aggregation is stimulated by lactose-inhibitable snake venom lectins. *Throm. Haemostasis*. **62**: 704-707.
- Ohman, L., Hed, J. , & Stendahl, O., 1982. Interaction between human polymorphonuclear leukocytes and two different strains of type 1 fimbriae-bearing *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* **146**: 751-757.
- Ohman, L., Magnusson, K. E., & Stendahl, O., 1985. Mannose-specific and hydrophobic interactions between *Escherichia coli* and polymorphonuclear leukocytes: influence of bacterial culture period. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect.* **93**: 125-131.
- Osborne, T. B., 1985. Seed storage proteins: characterization and biosynthesis. *Biochem Plants*. **6**: 449-485.
- Ozeki, Y., 1998. Purification and Cell attachment activity of a D-galactose-binding lectin from the skin of Sea hare, *Aplysia kurodai*. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **45**: 989-995.
- Palánová, L. and Volf, P., 1997. Carbohydrate binding specificities and physico-chemical properties of lectins in various tissue of *Phlebotominae* sandflies. *Folia Parasitologica*. **44**: 71-76.
- Patscheke, H., Brossmer, R. and Wörner, P., 1977. D-galactose- binding lectins induce a differential response on blood platelets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **75**: 200-206.
- Patscheke, H. and Wörner, P., 1977. Common activation of aggregation and release reaction of platelets. *Thromb. Res.* **11**: 391-402.
- Paulson, J. C., 1985. In: The Receptors, Vol. 2, pp. 131-219, Conn, P. M., Ed., Academic Press, New York.
- Peumans, W. J. & Van Damme, E. J. M., 1995. The role of lectins in plant defence. *Histochem. J.* **27**: 253-271.

- Peumans, W. J. & Van Damme, E. J. M., 1995. Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiol.* **109**: 347-352.
- Peumans, W. J. & Van Damme, E. J. M., 1996. Prevalence, Biological activity and genetic manipulation of lectins in foods. *Trends Food Sci. Technol.* **7**: 132-138.
- Peumans, W. J. & Van Damme, E. J. M., 1998. Plant lectins: Versatile proteins with important perspectives in biotechnology. *Biotech. Gen. Eng. Rev.* **15**: 199-229.
- Perez, G., 1995. Purification and characterization of a lectin from the seeds of *Erythrina costaricensis*. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **8**: 857-863.
- Perry, A., Ofek, I. & Silverblatt, F. J., 1983. Enhancement of mannose-mediated stimulation of human granulocytes by type 1 fimbriae aggregated with antibodies on *Escherichia coli* surfaces. *Infect. Immun.* **39**: 1334-1345.
- Phillips, D. R., 1980. An evaluation of membrane glycoprotein in platelet adhesion and aggregation. In: *Progr. Hem. Thromb.* **5**: 81-109.
- Pineau, N., Aucouturier, P., Brugier, J.C., and Preud'homme, J.L. 1990. Jacalin: a lectin mitogenic for human CD4T lymphocytes. *Clin. Exp. Immunol.* **80**: 420-425.
- Powell, L. D. & Varki, A. 1995. I-type lectins. *J. Biol. Chem.* **270**: 14243-14246.
- Powell, K. S., Spence, J., Bharathi, M., Gatehouse, J. A. and Gatehouse, A. M. R., 1998. Immunohistochemical and developmental studies to elucidate the mechanism of action of the snowdrop lectin on the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stal). *J. Insect Physiol.* **44**: 529-539.
- Prado-Franceschi, J. & Vital Brazil, O., 1981. Convulxin, a new toxin from the venom of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). *Toxicon* **19**: 875-887.
- Pratt, R. C., Singh, N. K., Shade, R. E., Murdock, L. L. and Bressan, R. A., 1990. Isolation and partial characterization of a seed lectin from Tepary bean that delays bruchid beetle development. *Plant Physiol.* **93**: 1453-1459.
- Pusztai, A. & Bardocz, S., 1996. Biological effects of plant lectins on the gastrointestinal tract: metabolic consequences and applications. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **8**: 149-165.
- Rademacher, T. W., Parekh, R. B., and Dwek, R. A., 1988. Glycobiology. *Ann. Rev. Biochem.* **57**: 785-838.

- Ramos, M. V., Mota, D. M., Teixeira, C. R., Cavada, B. S. and Moreira, R. A., 1998. Isolation and partial characterization of highly toxic lectins from *Abrus pulchellus* seeds. *Toxicon*. **36**: 477-489.
- Ratanapo, S., Ngamjunyaporn, W. and Chulavatnatol, M., 2001. Interaction of a mulberry leaf lectin with a phytopathogenic bacterium, *P. syringae* pv *mori*. *Plant Sci*. **160**: 739-744.
- Ravdin, J. I., 1989. *Entamoeba histolytica* from adherence to enteropathy. *J. Infect. Dis*. **159**: 420-429.
- Ray, S. and Chatterjee, B. P. 1995. Saracin: A lectin from *Saraca indica* seed integument recognizes complex carbohydrates. *Phytochemistry*. **3**: 643-649.
- Renkonen, K. O., 1948. Studies on hemagglutinins present in seeds of some representatives of Leguminosae. *Ann. Med. Exp. Bio. Fenn*. **26**: 66-72.
- Ribeiro, D. A., 2000. Purificação e Caracterização bioquímica e funcional de uma serinoprotease (URUPROT) do veneno de *Bothrops alternatus* (URUTU). Tese de Mestrado, I.B – Unicamp.
- Rogers, D. J., Fish, B., Barwell, C. J., & Lovoless, R. W., 1988. In: *Lectins-Biology, Biochemistry and Clinical Biochemistry*, Vol. 6, pp. 373-376, Bog-Hansen, T. C. and Freed, D. L. J., Eds., Sigma Chemical Company, St. Louis.
- Rougé, P. & Cavada, B. S., 1984. Isolation and partial characterization of two isolectins from *Lathyrus ochus* L. (DC). *Plant science Letters*. **32**: 21-27.
- Rupp, M. E., Sloat, N., Meyer, H. G. W., Han, J. and Gattermann, S., 1995. Characterization of the hemagglutinin of *Staphylococcus epidermidis*. *J. Infec. Dis*. **172**: 1509-18.
- Ryan, C. A., 1981. Plant proteinases. In: *The Biochemistry of plants*. (Marcus, E. ed.). Academic Press, New York.
- Ryan, C. A., 1990. Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol*. **28**: 426-49.
- Sage, H. J. & Green, R. W., 1972. *Meth. Enzimol*. **28**: 332-339.
- Sampietro, A. R., Isla, M. I., Quiroga, E. N. and Vattuone, M. A., 2001. An N-acetylglucosamine oligomer binding agglutinin (lectin) from ripe *Cyphomandra betacea* Sendt fruits. *Plant Sci*. **160**: 659-667.
- Santiago, A. P., Saavedra, E. P., Campos, E. and Cordoba, F., 2000. Effect of plant lectins on *Ustilago maydis* in vitro. *Cell. Mol. Life. Sci*. **57**: 1986-1989.

- Schlumbaum, A., Mauch, F., Vögeli, U. and Boller, T., 1986. Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth. *Nature*. **324**: 365-367.
- Sequeira, L. and Graham, T. L., 1977. Agglutination of avirulent strains of *Pseudomonas solanacearum* by potato lectin. *Physiol. Plant. Pathol.* **11**: 43-54.
- Shankar, C. S. and Umesh Kumar, S. 1994. A surface lectin associated with flocculation in brewing strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **140**: 1097-1101.
- Shanttil, S. J. and Bennett, J. S. 1981. Platelets and their membranes in hemostasis Physiology and pathophysiology. *Ann. Intern. Med.* **94**: 108-118.
- Sharon, N. and Lis, H., 1972. Lectins: Cell-agglutinating and sugar-specific proteins. *Science* **177**: 949-959.
- Sharon, N., 1983. Lectin receptors as lymphocyte surface markers. *Adv. Immunol.* **34**: 213-298.
- Sharon, N., 1987. Bacterial lectins-cell-cell recognition and infectious disease. *FEBS Lett.* **217**: 145-157.
- Sharon, N. and Lis, H., 1989. Lectins as cell recognition molecules. *Science* **246**: 227-234.
- Sharon, N. and Lis, H., 1990. Legume lectins – a large family of homologous proteins. *FASEB J.* **4**: 3198-3208.
- Sharon, N. and Lis, H., 1993. Carbohydrates in cell recognition. *Sci. Am.* 74-81.
- Shet, M. S. & Madaiah, M., 1989. *Biochem. Biophys. Acta.* **991**: 465-469.
- Singh, S. & Rachie, K. O., 1985. Cowpea, Research, production and Utilization. John Wiley & Sons, Chichester.
- Singh, S. & Jackai, L. E. M., 1985. Insect pests of cowpea in Africa: their life cycle, economic importance and potential for control. *Cowpea, Research, Production and Utilization* (Edited by Singh, S. R. and Rachie, K. O), John Wiley & Sons, Chichester.
- Singh, B. B., Singh, S. R. and Adjadi, O., 1985. Bruchid resistance in cowpea. *Crop. Sci.* **25**: 736-739.
- Singh, R.S., Tiwary, A. K., Kennedy, J. F., 1999. Lectins: Sources, Activities, and Applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* **19**(2): 145-178.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Stanley, P., 1981. Surface carbohydrate alterations of mutant mammalian cells selected for resistance to plant lectins. In: *The Biochemistry of glycoproteins and Proteoglycans* (Lennarz, W. J., ed.) pp: 161-190, Plenum Press, New York.

Stratford, M., 1992. Yeast flocculation: reconciliation of physiological and genetic view points. *Yeast* **8**: 25-38.

Stratford, M. & Pearson, B. M., 1992. Lectin-mediated flocculation of the yeast *Saccharomyces ludwigii*. *Letf. Appl. Microbiol.* **14**: 214-217.

Sueyoshi, S., Tsuji, T. and Moullec, J., 1985. Purification and chracterization of four isolectins of mushroom (*Agaricus bisporus*). *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **366**, 213-221.

Summer, J. B. & Howell, S. F. 1936. The identification of the hemagglutinin of the Jack bean with concanavalin A. *J. Bacteriol.* **32**: 227-237.

Suzuki, T., Saito, H., Inoue, S., Migita, S. & Takahashi, T. (1979). *J. Biochem.* **85**: 163-171.

Svanborg-Eden, C., Bjursten, L.-M., Hull, R., Hull, S., Magnusson, K.-E., Moldovano, Z. e Leffler, H. 1984. Influence of adhesins on interaction of *Escherichia coli* with human phagocytes. *Infect. Immun.* **44**: 672-680.

Triguerós, V., Wang, M., Pére, D., Paquereau, L., Chavant, L. and Fournier, D., 2000. Modulation of a lectin insecticidal activity by carboydrates. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **45**: 175-179.

Tschopp, T. B., Weiss, H. J. and Baumgartner, H. R., 1974. Decreased adhesion of platelets to subendothelium in von Willebrands disease. *J. Lab. Clin. Med.* **83**: 296-300.

Utarabhand, P. and Akkayamont, P., 1995. Purification of a lectin from *Parkia javanica* beans. *Phytochemistry.* **38**: 281-285.

Van Damme, E. J. M., Allen, A. K. and Peumans, W. J., 1987. Isolation and characterization of a lectin with exclusive specificity towards mannose from snowdrop (*Galanthus nivalis*) bulbs. *FEBS Lett.* **215**: 140-144.

Van Damme, E. J. M., Goldstein, I. J. and Peumans, W. J., 1991. A comparative study of mannose-binding lectins from the amaryllidaceae and alliaceae. *Phytochemistry.* **30**: 509-514.

Van Damme, E. J. M. & Peumans, W. J., 1991. Lectins from monocotyledonae. In: *Lectin Reviews*, **1**: 161-170, Kipatric, D.C., Van Driessche, E., and Bog Hansen, T.C., Eds. Sigma Chemical Co., St. Louis.

- Van Damme, E. J. M., Barre, A., Smeets, K., Torrekens, S., Van Leuven, F., Rouge, P. and Peumans, W. J., 1995. The bark of *Robinia eudocacia* contains a complex mixture of lectins. Characterization of the proteins and the cDNA clones. *Plant Physiol.* **107**: 833-843.
- Van Damme, E. J. M., Barre, A., Bemer, V., Rouge, P., Van Leuven, F. and Peumans, W. J., 1995. A lectin and a lectin-related protein are the two most prominent proteins in the bark of yellow wood (*Cladrastis lutea*). *Plant. Mol. Biol.* **29**: 579-598.
- Van Damme, E. J. M.; Briké, F.; Winter, H. C.; Van Leuven, F. Goldstein, I. J. and Peumans, W. J., 1996. Molecular cloning of two different manose-binding lectins from tulip bulbs. *Eur. J. Biochem.* **236**: 419-427.
- Van Damme, E. J. M.; Peumans, W. J.; Barre, A. and Rougé, P., 1998. Plant Lectins: A Composite of Several Distinct Families of Structurally and Evolutionary Related Proteins with Diverse Biological Roles. *Plant Sci.* **17**: 575-692.
- Van Parijs, J.; Broekaert, W. F.; Goldstein, I. J. e Peumans, W. J., 1991. Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. *Planta* **183**: 258-262.
- Van Parijs, J., Joosen, H. M., Peumans, W. J., Geuns, J. M and Van Laere, A. J (1992). Effect of the lectin UDA (*Urtica dioica* agglutinin) on germination and cell wall formation of *Phycomyces blakesleeianus*. *Arch Microbiol* **158**: 19-25.
- Vasconcelos, I. M., Cavada, B. S., Moreira, R. A. & De Oliveira, J. T. A., 1991. Purification and partial characterization of a lectin from the seeds of *Dioclea guianensis*. *J. Food. Biochem.* **15**: 137-154.
- Waljuno, K. Scholma, R. A., Beintema, J. Mariono, A. & Hahn, A. N., 1975. Amino acid sequence of hevein. *Proc. Int. Rubber Conf. Kuala Lumpur* **2**: 518-531.
- Wang, H. X., Ng, T. B. and Ooi, V. E. C., 1999. Studies on purification of a lectin from fruiting bodies of the edible shiitake mushroom *Lentinus edodes*. *Inter. J. Biochem. Cell Biol.* **31**: 595-599.
- Watkins, W. M. & Morgan, W. T. J., 1952. Neutralization of the anti-H agglutinin in cel by simple sugars. *Nature* **169**: 825-826.
- Weinhaus, O., 1909. Zur biochemie des phasins. *Bichem. Z.* **18**, 228-260.
- Weiss, H. J. & Lages, B., 1997. Platelet protombinase activity and intracellular calcium response in patients with storage pool deficiency, glycoprotein IIb-IIIa deficiency, or impaired platelet coagulant activity. A comparison with Scott syndrome. *Blood.* **89**: 1599-1611.
- Wiley, D. C. & Skehel, J. J., 1987. The Structure and function of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus. *Ann. Rev. Biochem.* **56**: 365-394.

- Wititsuwannakul, R., Wititsuwannakul, D. and Chanchai, S., 1998. A lectin from the bark of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Phytochemistry*. **47**: 183-187.
- Wongkham, S., Wongham, C., Boonsiri, P., Simanathiansophon, S., Trisonthi, C. and Atisook, K., 1995. Isolectins from seeds of *Artocarpus lakoocha*. *Phytochemistry*. **40**: 1331-1334.
- Wu, A. M., Song, S. -C., Chen, Y. and Garber, N. G., 2000. Defining the carbohydrate specificities of *Aplysia* gonad lectin exhibiting a peculiar D-galacturonic acid affinity. *J. Biol. Chem.* **275**: 14017-14024.
- Yamagushi, M., Jimbo, M., Sakai, R., Muramoto, K. and Kamiya, H., 1998. Purification and characterization of *Microcystis aeruginosa* (freshwater cyanobacterium) lectin. *Comp. Biochem. Physiol.* **119**: 593-597.
- Yoshida, M., Kato, S., Oguri, S. and Nagata, Y., 1994. Purification and properties of lectins from a mushroom *Pleurotus cornucopiae*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **58**, 498-501.
- Zhuang, C., Murata, T., Usui, T., Kawagishi, H., Kobayashi, K., 1996. Purification and Characterization of a lectin from the toxic mushroom *Amarita pantherina*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1291**: 40-44.