

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA - DEPARTAMENTO DE
BIOQUÍMICA



MIRELA BATISTA COELHO

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA LECTINA DE
SEMENTES DE *Annona coriacea* E SEU EFEITO SOBRE OS

INSETOS *Callosobruchus maculatus* e *Anagasta kuehniella*

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
MIRELA BATISTA COELHO
e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

i
UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE 30
Nº CHAMADA T/UNICAMP
C65i
V _____ EK _____
TOMBO BCI 50590
PROC 16.837/02
C _____ DX _____
PREÇO R\$ 14,00
DATA 28/08/02
Nº CPD _____

CM00172418-3

BIB ID 253796

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

C65i

Coelho, Mirela Batista

Isolamento e caracterização de uma lectina de sementes de *Annona coriacea* e seu efeito sobre os insetos *Callosobruchus maculatus* e *Anagasta kuehniella*/Mirela Batista Coelho. -- Campinas, SP:[s.n.], 2002

Orientadora: Maria Lígia Rodrigues Macedo

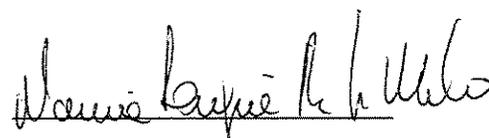
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia

1. Lectina. 2. *Anagasta kuehniella*. 3. *Annona coriacea*. 4. *Callosobruchus maculatus*. I. Macedo, Maria Lígia Rodrigues. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Campinas, 27 de fevereiro de 2002.

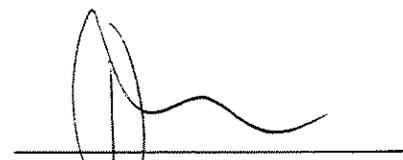
BANCA EXAMINADORA

Prof.^a. Dr.^a. Maria Lígia Rodrigues Macedo (Orientadora)



Assinatura

Prof. Dr. Paulo Mazzafera



Assinatura

Prof. Dr. Sérgio Marangoni



Assinatura

Prof. Dr. José Camillo Novello

Assinatura

*Sê forte e corajoso, não temas nem te espantes,
Porque o Senhor teu Deus é contigo, Por onde
quer que andares.*

Josué 1.9

À Deus que me deu forças e me acolheu em seus braços nos momentos de dificuldades, permitindo a vitória.

Aos meus pais, Dorival e Edenei, pelo amor, carinho e aos valores que me ensinaram, os quais me proporcionaram alcançar os meus objetivos.

Ao meu querido namorado, Glauber, pela paciência, compreensão e carinho, que sempre me apoiou e socorreu em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

À Prof.^a. Dr.^a. Maria Lígia Rodrigues Macedo, por ter me orientado e por ter acreditado na minha capacidade permitindo assim a realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Sérgio Marangoni e Prof. Dr. José Camillo Novello pela oportunidade, colaboração e apoio no desenvolvimento deste trabalho.

À Prof.^a. Dr.^a. Carmen Veríssima Ferreira, Prof.^a. Dr.^a. Nilce Correa Meirelles, Prof.^a. Dr.^a. Fernanda Ramos Gadelha e ao Prof. Dr. José Camillo Novello pela participação no exame de qualificação onde puderam apontar importantes observações e sugestões para a revisão deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Paulo Mazzafera por aceitar em participar da banca examinadora desta dissertação, valorizando assim o meu trabalho.

À Prof.^a. Maria das Graças Machado Freire, pelo apoio e auxílio durante a realização desta dissertação.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Purificação de Proteínas e suas Funções Biológicas – LPPFB – UFMS, pela colaboração junto aos ensaios biológicos utilizando insetos.

À Renata Pereira e ao Prof. Dr. José L. Donato do Departamento de Farmacologia - FCM pela colaboração junto aos ensaios de agregação plaquetária.

Aos Professores do Departamento de Bioquímica que colaboraram para a realização deste trabalho, seja com seus conhecimentos, seja com seu incentivo.

Aos técnicos Paulo Baldasso e Marino Forner pelo apoio e amizade.

Aos companheiros do Laquip e demais colegas e funcionários do Departamento de Bioquímica pelo convívio agradável e ajuda durante a realização deste trabalho.

As minhas amigas moradoras da casa E1: Ana Paula, Cris, Lygia, Junko, Camila, Tânia, e aos nossos amigos em comum pelas alegrias, farras e pelo apoio nas dificuldades.

À CAPES, pela bolsa de estudos concedida.

ÍNDICE

ABREVIACÕES	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
I - INTRODUÇÃO	01
1 – Classificação das lectinas	02
2 – Propriedades gerais das lectinas	12
3 – Especificidade das lectinas de plantas em ligarem a carboidratos	13
4 – Mecanismos de defesa de plantas	16
5 – Papéis Biológicos das lectinas de plantas	17
6 - Plantas transgênicas	26
II - OBJETIVOS	29
III - MATERIAIS	30
1 – Sementes e árvore de <i>Annona coriacea</i>	31
2 – Insetos	32
3 – Reagentes	34
IV – MÉTODOS	35
1 – Preparação da farinha	35
2 – Obtenção do Extrato Bruto (EB)	35
3 – Purificação da lectina ACLEC	35
4 – Determinação da Massa Molecular Relativa	37
5 – Dosagem de proteínas	37
6 – Dosagem de carboidratos	38
7 – Análise automática de aminoácidos	38
8 – Determinação da estrutura N-Terminal	39
9 – Ensaio biológicos	40

10 – Caracterização físico-química	42
11 – Agregação plaquetária	45
12 – Papel fungicida de ACLEC	46
13 – Papel inseticida de ACLEC	46
V - RESULTADOS	48
1 – Estudo da atividade hemaglutinante do EB de <i>A. coriacea</i>	48
2 – Purificação de ACLEC	50
3 – Estudo da atividade hemaglutinante de ACLEC	54
4 – Estudo da estabilidade de ACLEC	57
5 – Análise de aminoácidos	62
6 – Determinação da estrutura N-Terminal	64
7 – Ensaio biológicos	65
VI - DISCUSSÃO	74
VII – BIBLIOGRAFIA	86

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Árvore e sementes de <i>Annona coriacea</i>	31
Figura 2: Macho e fêmea de <i>Callosobruchus maculatus</i> em grãos de feijão	32
Figura 3: Inseto e larva de <i>Anagasta kuehniella</i>	33
Figura 4: Cromatografia de exclusão molecular do EB de sementes de <i>A. coriacea</i>	50
Figura 5: Cromatografia de ACL-2 em coluna de fase reversa (HPLC)	51
Figura 6: SDS-PAGE dos passos de purificação da lectina de <i>A. coriacea</i>	52
Figura 7: Determinação da massa molecular relativa de ACLEC	53
Figura 8: Efeito do pH na atividade hemaglutinante de ACLEC	57
Figura 9: Efeito da temperatura na atividade hemaglutinante de ACLEC	58
Figura 10: Eletroforese em gel de poliacrilamida de ACLEC tratada	61
Figura 11: Efeito de ACLEC no processo de agregação plaquetária induzido por Ristocetina	66
Figura 12: Efeito de ACLEC no processo de agregação plaquetária induzido por Colágeno	68
Figura 13: Efeito de ACLEC no crescimento de fungos	69
Figura 14: Sobrevivência de larvas de <i>C. maculatus</i> em sementes artificiais contendo ACLEC	70
Figura 15: Peso médio de larvas de <i>C. maculatus</i> em sementes artificiais contendo ACLEC	71
Figura 16: Número de larvas de <i>A. kuehniella</i> em dieta artificial contendo ACLEC	72
Figura 17: Peso médio de larvas de <i>A. kuehniella</i> em dieta artificial contendo ACLEC	72
Figura 18: Efeito inibitório de ACLEC sobre as larvas de <i>A. kuehniella</i> em dietas artificiais	73

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I: Famílias das lectinas de plantas	06
Tabela II: Origem das lectinas purificadas de sementes de Legumes	08
Tabela III: Especificidade de ligação a carboidratos de lectinas de plantas	15
Tabela IV: Especificidade de EB de <i>A. coriacea</i> a eritrócitos humanos	48
Tabela V: Especificidade de EB de <i>A. coriacea</i> a eritrócitos de diferentes espécies Animais	49
Tabela VI: Especificidade de ACLEC para eritrócito humanos	54
Tabela VII: Especificidade de ACLEC para eritrócitos de diferentes espécies animais	55
Tabela VIII: Ação inibitória de carboidratos sobre a atividade hemaglutinante de ACLEC	56
Tabela IX: Efeito de diferentes compostos na atividade hemaglutinante de ACLEC	61
Tabela X: Composição de aminoácidos de ACLEC	63
Tabela XI: Alinhamento da lectina ACLEC (subunidade 16 kDa) seqüenciada de sementes de <i>A. coriacea</i> com outras lectinas de plantas	64

ABREVIACÕES PARA AMINOÁCIDOS

AMINOÁCIDOS	ABREVIACÕES (3 LETRAS)	SÍMBOLO
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
cido aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Glutamina	Gln	Q
cido glutâmico	Glu	E
Glicina	Gly	G
Histidina	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

Nomenclatura IUPAC

ABREVIACOES

ACLEC	– lectina de <i>Annona coriacea</i>
ACN	– acetonitrila
CAPS	– 3-ciclohexil-amino-1-ácido propanosulfônico
DTT	– ditioneitol
GlcNac	– N-acetilglucosamina
Gal	– galactose
GalNac	– N-acetilgalactosamina
HPLC	– cromatografia líquida de alta eficiência
kDa	– kilodalton
NeuAc	– cido neuramnico
PAGE	– eletroforese em gel de poliacrilamida
PPP	– plasma rico em plaquetas
PRP	– plasma rico em plaquetas
PSA	– persulfato de amônio
PVDF	– polivinildileno difluoreto
SDS	– dodecil sulfato de sódio
TEMED	– N'-N'-N'-N'- tetra metilenodiamina
TFA	– cido trifluoroacético
TFMS	– cido trifluometanosulfnico
TRIS	– hidroximetil aminometano
EDTA	– cido etilenodiaminotetracido
EGTA	– cido etilenodiaminoglicoltetracido

RESUMO

As lectinas são (glico) proteínas de origem não imune que interagem específica e reversivelmente com carboidratos. O atual interesse em lectinas deve-se a sua utilidade como ferramenta em pesquisas biológica e médica, assim como o seu envolvimento na defesa de plantas contra fungos e insetos. Neste trabalho, uma lectina foi purificada de sementes de *Annona coriacea* (Annonaceae), conhecida comumente por Marolo, usando gel filtração em coluna Sephadex G-75 e em coluna de fase reversa C18 μ -Bondapack. Em SDS-PAGE, ACLEC (*A. coriacea* lectin) migrou como duas bandas com massa molecular aparente de 21,6 e 16,0 kDa em condições não reduzidas, e 16,0 e 11,4 kDa em presença de ditioneitol 1 M. Portanto, a subunidade de 21,6 kDa formada por duas cadeias de 11,0 kDa ligadas covalentemente. A massa molecular relativa de 12 kDa foi estimada por gel de filtração em coluna Superdex 75, indicando que ACLEC comporta-se como um heterodímero. ACLEC aglutinou eritrócito humano (do tipo A, B, AB e O), eritrócitos de bovino, camundongo, carneiro, coelho, caprino, galinha e de rato. A lectina apresentou especificidade a D-manose e D-glicose. Por ensaios físico-químicos constatamos que ACLEC não foi inibida por ampla faixa de pH, ou afetada por íons divalentes, ou enzimas proteolíticas como pronase. A oxidação com metaperiodato de sódio, ou redução com uréia e ditioneitol também não afetaram a hemaglutinação. Porém, a hemaglutinação foi inibida por altas temperaturas e por exposição à tripsina e ácido trifluorometanosulfônico. A análise de aminoácidos mostrou uma alta quantidade de resíduos de Arg e Gly, presença de três resíduos de metionina e a ausência de resíduos de fenilalanina. O N-terminal de ACLEC apresentou aproximadamente 50% de homologia com outras lectinas de plantas. ACLEC não agregou plaquetas nem afetou a agregação plaquetária por colágeno ou ristocetina.

ACLEC não inibiu o desenvolvimento de fungos e do inseto *Callosobruchus maculatus*, mas teve alto efeito detrimental sobre o desenvolvimento do inseto *Anagasta kuehniella*. Estas observações sugerem que esta lectina pode agir seletivamente como um inseticida contra algumas espécies de insetos.

ABSTRACT

Lectins are (glyco) proteins with non-immune origin that interact specifically and reversibly with carbohydrates. The current interest in plant lectins reflects their usefulness as tools in biological and medical research and their involvement in plant defense against fungi and insects. In this work, a lectin was purified from the seeds of *Annona coriacea* (Annonaceae), commonly known as “Marolo”, using gel filtration on Sephadex G-75 and reversed-phase HPLC on a μ -Bondapack column. In SDS-PAGE, ACLEC (*A. coriacea* lectin) migrated in two bands with apparent molecular masses of 21.6 kDa and 16.0 kDa in non-reducing conditions, and 16.0 kDa and 11.4 kDa in the presence of 1 M dithiothreitol. Nevertheless, the subunit of 21.6 kDa is formed by two bands covalent-binding of 11.0 kDa. Molecular mass of 12.0 kDa was estimated by gel filtration on Superdex 75, thus indicating that ACLEC exists as a heterodimer. ACLEC agglutinated human type A, B, AB and O erythrocytes, as well as mouse, sheep, rabbit, cow, goat, chicken and rat erythrocytes. The lectin had a higher affinity for D-mannose and D-glucose. The hemagglutinating activity of ACLEC was not inhibited over a wide pH range, or was it affected by divalent cations or proteolytic enzymes such as pronase. Oxidation with sodium metaperiodate, or reduction with urea and dithiothreitol also did not affect the hemagglutination. On the other hand, hemagglutination was inhibited at high temperature and by exposure to trypsin and trifluoromethanesulfonic acid. Amino acid analysis showed a high content of Arg and Gly, presence of three methionine and the absence of phenylalanine. The N-terminal sequence of ACLEC showed approximately 50% of homology with other plant lectins. ACLEC did not aggregate platelets or affected platelet aggregation by collagen or ristocetin.

ACLEC not inhibited the development of fungi and of the insect *Callosobruchus maculatus* but it had a high detrimental affect on the development of the insect *Anagasta kuehniella*. This observation suggests that this lectin may act selectively as an insecticide against some insect species.

I - INTRODUÇÃO

As lectinas são proteínas de origem não imune que se ligam reversivelmente a carboidratos, além de aglutinarem células e precipitarem glicoconjugados (Goldstein *et al.*, 1980).

Hemaglutinina seria o termo mais apropriado do que “lectina”, por referir-se à capacidade de uma proteína aglutinar eritrócitos, mas não leva em conta que muitas lectinas podem aglutinar outras células. As lectinas de plantas foram definidas recentemente como toda proteína possuidora de pelo menos um domínio não catalítico, aos quais se ligam reversivelmente a monossacarídeos ou oligossacarídeos específicos (Van Damme *et al.*, 1998).

As lectinas são usualmente glicoproteínas com conteúdo de carboidrato variado como observado em lectinas de *Canavalia brasiliensis* (Moreira *et al.*, 1984), *Dioclea grandiflora* (Moreira *et al.*, 1983) e *Cratylia floribunda* (De Oliveira *et al.*, 1991). São encontradas em quase todas as plantas comestíveis e a exposição do homem e de animais a elas é inevitável. Experimentalmente tem-se mostrado que algumas lectinas são muito resistentes às enzimas do trato digestivo, e encontradas ainda ativas em fezes de ratos ou humanos, que ingerem alimentos contendo essas proteínas (Vasconcelos *et al.*, 1989). Este fator mostra a grande importância para o estudo do papel nutricional, já que os aminoácidos, derivados das lectinas intactas ou parcialmente digeridas, possam se ligar às células epiteliais do intestino (King *et al.*, 1980).

As lectinas de plantas estão localizadas em cotilédones de sementes, citoplasma (Mialonier *et al.*, 1973) ou em corpos protéicos (Youle *et al.*, 1976) podendo constituir cerca de 10% do nitrogênio total.

Aparentemente estão envolvidas na organização celular, embriogênese, fagocitose e proteção da célula contra fungos, bactérias e insetos. Desempenham também um papel ativo no transporte e fixação de carboidratos nas plantas, tão bem como no crescimento e alongação da parede celular (Knox *et al.*, 1976).

1 - CLASSIFICAÇÃO DAS LECTINAS

Na natureza, as lectinas são encontradas nas mais diferentes formas de vida, como em microrganismos (Lü-Lü *et al.*, 1992), animais (Gabijs, 1994) e plantas (Peumans *et al.*, 1995). A ocorrência de lectinas em diferentes espécies, tecidos ou células tem mostrado a importância dessas moléculas em organismos.

1.1 - Subdivisão das Lectinas

De acordo com a definição de lectinas, elas estão subdivididas em quatro classes, de acordo com o número de domínios, em: Merolectinas, Hololectinas, Quimerolectinas e Superlectinas.

❖ *Merolectinas*

São proteínas que consistem exclusivamente de um único domínio ligante a carboidrato, pequenas e de uma única cadeia e são incapazes de aglutinar células devido a sua natureza monovalente. Exemplos deste grupo são a heveína (Van Parijs *et al.*, 1991), proteína monomérica ligante a quitina presente no látex de *Hevea brasiliensis* e algumas proteínas de orquídeas (Van Damme *et al.*, 1998).

❖ *Hololectinas*

São compostas exclusivamente de domínios ligantes a carboidratos, mas contém pelo menos dois domínios que são idênticos ou muito similares. Comportam-se como verdadeiras aglutininas e estão presentes na maioria das lectinas de plantas (Van Damme *et al.*, 1998).

❖ *Quimerolectinas*

São a fusão de proteínas compostas de um ou mais domínios ligantes a carboidratos e um domínio não relacionado com uma atividade catalítica bem definida (ou outra biológica), que age independentemente do(s) domínio(s) ligante(s) a carboidrato(s). Dependendo do número de sítios ligantes a açúcar, as quimerolectinas comportam-se como merolectinas ou hololectinas. As proteínas inativadoras de ribossomos tipo-2 (Ricina), que possuem dois domínios ligantes a carboidratos em cada cadeia B, como hololectina, comporta-se como aglutininas (Peumans *et al.*, 1998).

❖ *Superlectinas*

Como as hololectinas, as superlectinas consistem exclusivamente de pelo menos dois domínios ligantes a carboidratos. Porém, diferentes das hololectinas os domínios ligantes a carboidratos das superlectinas reconhecem açúcares estruturalmente diferentes. As superlectinas podem também ser consideradas um grupo especial de quimerolectinas compostas de dois domínios ligantes a carboidratos estruturais e funcionalmente diferentes. Esta natureza quimérica é ilustrada pelo protômero da lectina de Tulipa TxLC-I que consiste de um domínio N-terminal ligante a manose formado com um domínio não relacionado ligante a GalNAc (Van Damme *et al.*, 1998).

1.2 - Lectinas animais

As lectinas de mamíferos podem ser divididas em Tipo-C, Tipo-S, Tipo-P e Tipo-I, baseadas na estrutura do domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD) (Powell *et al.*, 1995). O CRD media a ligação da lectina ao carboidrato e é altamente conservado para cada tipo de lectina.

❖ *Lectinas do Tipo-C*

São provavelmente o grupo mais diverso com respeito a estrutura, localização e especificidade para açúcar. Estão localizadas principalmente no meio extracelular e possuem resíduos de cisteínas ligados formando pontes dissulfeto. Possuem seqüência de 14 resíduos de aminoácidos invariáveis e 18 resíduos altamente conservados num segmento de 115-130 aminoácidos que auxiliam na identificação de proteínas ligantes a carboidratos (Powell *et al.*, 1995).

❖ *Lectinas Tipo-S*

Consiste de lectinas ligantes a β -galactosídeos, agora chamadas galectinas (Barondes *et al.*, 1994). São solúveis mesmo sem a utilização de detergentes (Gabiús, 1994) e têm a atividade independente de cálcio (Ca^{2+}), apresentam caráter ácido, baixo peso molecular e encontram-se no meio intra e extracelular.

Possuem um número menor de resíduos de cisteína em sua estrutura se comparadas com as lectinas do Tipo-C. Evidências sugerem que estejam envolvidas, em mamíferos, na regulação do crescimento, adesão e migração celular e têm uma importante função na neoplasia e resposta imune (Barondes *et al.*, 1994).

Pelo menos quatro galectinas (galectinas-1, 2, 3 e 4) têm sido identificadas, sendo que as do tipo 1 e 3 são as melhores estudadas. Dependem de agentes redutores (tióis) para a atividade completa. São secretadas e expressas na superfície celular (Sato *et al.*, 1994).

❖ *Lectinas Tipo-I*

Inclui as lectinas ligantes ao ácido siálico (Powell and Varki, 1995). Estruturalmente, as lectinas do tipo-I pertencem à superfamília das imunoglobulinas (IgG). O CRD é semelhante ao das IgG apresentando uma unidade estrutural compacta fornecida por 70 a 110 aminoácidos, caracterizada por dois planos de folhas β -pregueada. Este grupo

agora tem pelo menos cinco membros, incluindo CD22 e a sialoadesina. Independentes de cálcio (Ca^{2+}), são proteínas integrais de membrana e possuem amplos domínios citossólicos com sítios potenciais de fosforilação (Powell *et al.*, 1995).

❖ *Lectinas do Tipo-P*

É um grupo com apenas dois membros, com massa molecular de 46 e 300 kDa, ligantes de glicoproteínas, contendo manose-6-fosfato. O CRD não foi estruturalmente definido. São encontradas nos aparatos do Complexo de Golgi, como também na membrana plasmática no caso da forma de 300 kDa, sendo responsável pela transferência de glicoproteínas para os lisossomos e pela internalização de glicoproteínas extracelulares (Ni *et al.*, 1996).

❖ *Pentraxinas*

São proteínas plasmáticas, que incluem, dentre outras a proteína reativa-C (CRP). Essas lectinas expressam-se quando há algum processo de inflamação ou injúria tecidual no organismo e podem desempenhar funções como estimulação da fagocitose por leucócitos (Gabius, 1994). É composta de subunidades protéicas associadas não-covalentemente em simetria pentamérica cíclica. O tamanho das subunidades são de 25 kDa a 30 kDa (Ni *et al.*, 1996) e são dependentes de cálcio (Ca^{2+}) (Tennent *et al.*, 1994).

1.3 - Lectinas de Plantas

Várias lectinas de plantas têm sido isoladas e caracterizadas em detalhes. Embora consideradas uma classe muito heterogênea de proteínas, quanto às diferenças na estrutura molecular, especificidade a carboidratos e atividade biológica, a maioria das lectinas, pertencem a sete grandes grupos, nomeados lectinas de legumes, lectinas ligantes a quitina, lectinas de monocotiledôneas, proteínas inativadoras de ribossomos tipo-2 (RIP), floema de Cucurbitaceae, família Jacalina e Amaranthaceae (**Tabela I**) (Peumans *et al.*, 1998).

Lectinas	Ocorrência	Estrutura Molecular		Especificidade	
	Distribuição Taxonômica	Nº de lectinas identificadas	Tamanho do Protômero (kDa)	Nº de protômeros	
Legume	Legumes	>100	30 ou [(30-X)+X] ^a	2 ou 4	Diversa
Monocotiledôneas	Liliales	>50	12	1,2,3 e 4	Manose
Ligantes a Quitina	Mono e Dicotiledôneas	>100	5-35	1 ou 2	GlcNAc ou (GlcNAc) _n
Tipo 2RIP	Mono e Dicotiledôneas	>20	[30-s-s-35] ^b	1,2 ou 4	Gal, GalNAc ou Neu5Acα(2,6)Gal/GalNAc (GlcNAc) _n
Floema de Cucurbitaceae	Cucurbitaceae	<10	24	2	(GlcNAc) _n
Família Jacalina	Moraceae	<10	16 ou [(16-X)+X] ^a	2	Gal
	Convolvulaceae				Manose/Maltose
maranthaceae	Amaranthaceae	<10	30	2	GalNAc

Tabela I: Famílias das Lectinas de Plantas: ocorrência, estrutura molecular e especificidade^c

^a Protômeros são clivados em duas subunidades.

^b Ambas subunidades são ligadas por pontes dissulfeto.

^c Peumans *et al.*, 1998.

1.3.1 - Lectinas de Legumes

Referem-se a um tipo particular de lectinas de plantas que são encontradas exclusivamente em Leguminosae, que é a família mais estudada (Sharon *et al.*, 1990), como demonstrado na **Tabela II**.

Até o momento, várias lectinas de legumes tornaram-se ferramentas indispensáveis na pesquisa biológica e biomédica sendo utilizadas como proteínas bioativas na pesquisa e medicina (Van Damme *et al.*, 1998).

Até o presente, 100 lectinas de legumes têm sido isoladas de 70 diferentes espécies pertencentes a vários grupos taxonômicos. Muitas lectinas de legumes têm sido isoladas de sementes maduras. As lectinas de legumes perfazem cerca de 10% de proteína solúvel das sementes. Em algumas espécies, maiores concentrações de lectina (acima de 50%) têm sido observadas, porém em outras as lectinas representam menos do que 0,1% do total de proteínas das sementes (Van Damme *et al.*, 1998).

As lectinas das sementes de legumes são predominantemente localizadas nas células de armazenagem do parênquima dos cotilédones; alguns estudos mostram que as lectinas de legume estão estocadas em vacúolos (Chrispeels *et al.*, 1991). Podem também ser encontradas em diferentes tecidos vegetais como folhas, caules, raízes e nódulos de raízes, porém em concentração muito baixa (Van Damme *et al.*, 1998).

É o único grupo de lectinas que contem cátions divalentes em sítios ligantes a metal. Cada subunidade possui íons manganês (Mn^{2+}) e cálcio (Ca^{2+}), os quais são essenciais para a atividade ligante a carboidrato das lectinas. Os aminoácidos envolvidos na ligação de íons Mn^{2+} e Ca^{2+} são altamente conservados em todas as lectinas de legumes (Van Damme *et al.*, 1998).

Algumas lectinas receberam muita atenção devido a sua abundância em muitas culturas de plantas e a seu presumível envolvimento na simbiose entre legumes e a fixação de nitrogênio da bactéria *Rhizobium* (Diaz *et al.*, 1989).

Tabela II: Origem de lectinas purificadas de sementes de Legumes^a

SUBORDEM E TRIBO	ESPÉCIE
Caesalpinaceae	<i>Bauhinia purpurea</i> <i>Griffonia simplicifolia</i>
Papilionaceae	
Abreae	<i>Abrus precatorius</i>
Carageae	<i>Caragana arborescens</i>
Dalbergiae	<i>Lonchocarpus capassa</i>
Diocleae	<i>Canavalia ensiformes</i> <i>Canavalia gladiata</i> <i>Dioclea grandiflora</i>
Galageae	<i>Robina pseudoacacia</i> <i>Wistaria floribunda</i>
Genisteae	<i>Crotalaria juncea</i> <i>Cytisus scoparius</i> <i>Cytisussessifolius</i> <i>Ulex europaeus</i>
Hedysareae	<i>Arachis hypogaeae</i> <i>Onobrychis viciifolia</i>
Loteae	<i>Lotus tetragonolobus</i>
Phaseoleae	<i>Amphicarpea bracteata</i> <i>Dolichos biflorus</i> <i>Eritrina corallodendron</i> <i>Glycine max</i> <i>Phaseolus lunatus limensis</i> <i>Phaseolus vulgaris</i> <i>Psophocarpus tetragonolobus</i> <i>Vigna radiata</i>
Sophoreae	<i>Bowringia milbraedii</i> <i>Maackia amurensis</i> <i>Sophora japonica</i>
Trifolieae	<i>Medicago sativa</i> <i>Trifolium repens</i> <i>Lathyrus ochrus</i>
Vicieae	<i>Lens culinaris</i> <i>Pisum sativum</i> <i>Vicia cracca</i> <i>Vicia faba</i> <i>Vicia graminea</i> <i>Vicia villosa</i>

^aSharon *et al.*, 1990.

1.3.2 - Lectinas de Monocotiledôneas

Desde a descoberta de uma lectina com uma especificidade a manose em bulbos de *Galanthus nivalis* (Van Damme *et al.*, 1987), proteínas similares têm sido encontradas em espécies de monocotiledôneas nas famílias Amaryllidaceae, Alliaceae, Araceae, Orchideae, Liliaceae e Bromeliaceae (Van Damme *et al.*, 1998).

Todas as proteínas de monocotiledôneas ligantes a manose são construídas de 1, 2, 3 ou 4 subunidades de 12 kDa e exibem uma especificidade exclusiva a manose. Estas lectinas têm recebido muita atenção devido a sua capacidade antiviral (Balzarini *et al.*, 1992) e propriedades inseticida (Gatehouse *et al.*, 1990).

1.3.3 - Lectinas Ligantes de Quitina

São destacadas como proteínas que contêm pelo menos um “domínio heveína”, o qual refere-se a uma pequena proteína de 43 aminoácidos, extraída do látex da seringueira *Hevea brasiliensis* (Van Parijs *et al.*, 1991). Heveína é uma merolectina composta de um único domínio ligante de quitina (Lee *et al.*, 1991). Algumas proteínas são constituídas de um, dois, três ou quatro domínios, como em lectina de *Phytolacca caudatus* (Broekaert *et al.*, 1992).

Há lectinas que são ligantes de quitina e desprovidas de domínios heveína, como as lectinas da família Cucurbitaceae (Van Damme *et al.*, 1998). Estas lectinas estão bem caracterizadas graças ao trabalho pioneiro feito com aglutininas do gérmen de trigo (WGA), que foi a primeira a ser isolada e caracterizada (Nagata *et al.*, 1972).

Estas lectinas também são encontradas em Gramineae, como na tribo Triticae e no gênero *Brachypodium* e *Oryza*. Todas as lectinas de gramíneas estão estruturalmente confinadas no embrião. Além disso, as lectinas ligantes em quitina estão presentes na família Solanaceae nas espécies *Solanum tuberosum* (batata), *Lycopersicum esculentum* (tomate) e outras (Van Damme *et al.*, 1998).

1.3.4 - Lectinas Inativadoras de Ribossomo – Tipo 2

São quimerolectinas compostas de um polinucleotídeo constituído por um domínio adenosina glicosidase (cadeia A) o qual mantém comunicação com um domínio ligante a carboidrato (cadeia B) (Barbieri *et al.*, 1993). Ambas cadeias são sintetizadas por uma única molécula precursora a qual é pós-transducionalmente processada pela excisão de uma ligação entre as cadeias A e B. As lectinas tipo 2RIP apesar entre as cadeias essas lectinas diferenciam-se uma das outras pela atividade catalítica, especificidade a substrato e pelas suas propriedades (cito) tóxicas (Peumans *et al.*, 1998).

Estas lectinas estão localizadas nas famílias Euphorbiaceae, Fabaceae, Sambucaceae, Viscaceae, Ranunculaceae, Lauraceae, Passifloraceae, Tridaceae e Liliaceae. Não há dúvidas, que o tipo-2 RIP é uma superfamília de proteínas presentes em diferentes grupos taxonômicos (Peumans *et al.*, 1998).

O tipo-2 RIP tem como exemplo as potentes toxinas Ricina e Abrina. A ricina foi o primeiro exemplo do tipo-2 RIP que teve sua estrutura primária determinada por métodos químicos, sua estrutura tridimensional resolvida por cristalografia de raios-X (Montfort *et al.*, 1987), e a primeira a ser clonada (Lamb *et al.*, 1985). Exibe grande especificidade por galactose e N-acetilgalactosamina.

1.3.5 - Família Jacalina

Jacalina é a lectina de sementes de jaca (*Artocarpus integrifolia*) com especificidade para galactose é uma das mais clássicas lectinas de plantas não leguminosas. Lectinas similares têm sido encontradas em outras espécies de *Artocarpus* e em *Maclura pomifera* (Young *et al.*, 1989). Todas as lectinas de Moracea são formadas por dois protômeros idênticos. Cada protômero contém uma subunidade menor e outra maior. Até recentemente, lectinas de Moracea forma consideradas como a menor família de lectina as quais ocorrem exclusivamente nesta particular família de plantas (Peumans *et al.*, 1998).

A família jacalina também é a superfamília de lectinas ocorrendo em vários grupos taxonômicos, sendo possuidora de uma heterogeneidade quanto à especificidade por carboidratos.

1.3.6 - Lectinas do Floema de Cucurbitaceae

Muitas espécies de Cucurbitaceae contêm alta concentração de uma lectina que se liga a oligômeros de GlcNAc (Wang *et al.*, 1994). Estas são denominadas lectinas do floema de Cucurbitaceae e são proteínas diméricas compostas de duas subunidades idênticas de 24 kDa. Todas as lectinas correntemente conhecidas apresentam um alto grau de similaridade seqüencial, mas não têm qualquer similaridade seqüencial com qualquer outra lectina de planta ou proteína, desse modo, são consideradas como a menor família de proteínas confinadas para um grupo taxonômico relativamente pequeno (Peumans *et al.*, 1998).

1.3.7 - Lectinas de Amaranthaceae

A clonagem molecular e a análise por difração de raio-X revelaram que amarantina, a lectina de sementes de *Amaranthus caudatus* não se assemelha a qualquer outra lectina de planta com respeito a seqüência de aminoácidos e estrutura tridimensional. Baseado nestes dados, Amarantina é agora considerada como o protótipo de lectina da família amarantina. Várias outras espécies de *Amaranthus* contêm lectinas as quais são muito similares a amarantina, como *A. spinosus*, *A. leucocarpus* e *A. cruentus* (Peumans *et al.*, 1998).

2 - PROPRIEDADES GERAIS DAS LECTINAS

As lectinas de plantas são usualmente ricas em aminoácidos ácidos e básicos e pobres em aminoácidos contendo enxofre, sendo que a maioria é glicoproteínas com conteúdo de açúcar variável.

Algumas lectinas são classificadas como metaloproteínas, devido à necessidade de cátions tais como o cálcio (Ca^{2+}) e manganês (Mn^{2+}) para realizar sua atividade hemaglutinante, além de conferir a essas lectinas termoestabilidade e alguma resistência à proteólise enzimática (Moreira *et al.*, 1990). O peso molecular das lectinas de plantas variam de 8,5 a 265 kDa como os calculados em *Urtica dioica* (Broekaert *et al.*, 1989) e *Phaseolus lunatus* (Moreira *et al.*, 1990), respectivamente.

Em geral, as lectinas de plantas são oligômeros constituídos de duas ou mais subunidades idênticas ou não idênticas. Porém, a estrutura tetramérica é mais comum, como as lectinas de *Canavalia ensiformis* e *Dioclea grandiflora* (Moreira *et al.*, 1983), ambas com subunidades idênticas.

Geralmente, as lectinas estão distribuídas por todas as partes da planta. A maior parte, porém, é encontrada nos órgãos de armazenamento. Outras partes das plantas como folhas, caule, raízes e flores principalmente, contêm apenas uma minuta quantidade que não necessariamente são idênticas em estrutura ou especificidade a carboidratos com as lectinas de órgãos de armazenamento (Rüdiger, 1998).

Embora muitas sementes de Leguminosae representam os órgãos de estocagem, em outras plantas suas diferentes partes servem como propósito de estocagem como em tubérculos de batata (*Solanum tuberosum*), folhas de *Aloe* e *Urtica dioica* (Peumans *et al.*, 1984).

A localização intracelular de lectinas tem sido debatida há muitos anos. Agora aceitamos que muitas das lectinas “típicas” que ocorrem em órgãos de estocagem estão localizadas em organelas celulares especiais que são formadas a partir dos vacúolos, denominadas, corpos protéicos. Assim, a biossíntese de lectinas segue um caminho geral da síntese das proteínas de reserva. As vesículas derivadas dos vacúolos têm sido

identificadas como a localização para a deposição de lectinas em órgãos de estocagem muito diferentes de sementes, como em casca de árvore (Baba *et al.*, 1991).

Uma propriedade geral de muitas proteínas que estão diretamente envolvidas nos mecanismos de defesa de plantas é a estabilidade a amplas faixas de pH, temperatura e a enzimas proteolíticas. Muitas proteínas que possam conferir algum grau de patogenicidade a insetos, bactérias ou fungos, tais como quitinases e glucanases (Linthorst, 1991), inibidores de proteases (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 tipo-2 (Barbieri *et al.*, 1993) permanecem estáveis ao tratamento que poderia inativar as proteínas celulares normais.

As lectinas de plantas, assim como, as proteínas acima relatadas, exibem uma similar resistência em condições desfavoráveis, e uma grande quantidade não é degradada por proteases do trato digestivo animal ou de inseto (Peumans *et al.*, 1995).

Embora muitas lectinas de plantas são proteínas estáveis, há certas exceções. Além disso, muitas lectinas resistentes são degradadas na planta por proteases vegetais. Em adição, alguns organismos que se alimentam de plantas também possuem proteases intestinais que promovem a degradação dessas lectinas (Peumans *et al.*, 1995).

3 - ESPECIFICIDADE DAS LECTINAS DE PLANTAS POR CARBOIDRATOS

As lectinas distinguem-se de todas as outras proteínas de plantas pela sua capacidade em ligar-se a carboidratos simples ou complexos. Muitos comentários importantes têm sido feitos com respeito à especificidade das lectinas a carboidratos. As lectinas podem também conter um segundo tipo de sítio ligante que pode interagir com um ligante não-carboidrato (Peumans *et al.*, 1998).

As lectinas de plantas podem ser subdivididas em grupos de acordo com a especificidade a carboidratos (**Tabela III**). Até décadas atrás, apenas lectinas ligantes a manose/glicose, Gal/GalNAc/(GlcNAc)_n, fucose e ácido siálico eram reconhecidas. Um

novo grupo de especificidade foi adicionado, o de lectinas de monocotiledôneas ligantes a manose (o qual exibe uma especificidade exclusiva para manose) (Van Damme et al., 1998). Existem ainda outros grupos de especificidade como manose/maltose como em lectinas de *Calystegia sepium* (Peumans et al., 1997). Muitas lectinas não se relacionam a nenhum dos grupos acima descritos, devido a não se ligarem a mono ou dissacarídeos, mas requerem glicans mais complexos para uma eficiente inibição da atividade hemaglutinante.

A especificidade por carboidratos das lectinas é costumariamente examinada por técnicas de inibição, na qual diferentes carboidratos são testados quanto a sua capacidade em inibir a atividade da lectina. Esta ligação entre sacarídeos em lectinas pode também ser observada por métodos físico-químicos, como equilíbrio em diálise, espectrofotometria, fluorometria e ressonância magnética (Sharon et al., 1990). As interações de todos os açúcares de superfície e de lectinas ligantes a sítios de ligação a açúcar são usualmente não-covalente, envolvendo pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e forças de van der Waal's (Singh et al., 1999).

As lectinas pertencentes a diferentes famílias (com estruturas diferentes) podem ser reconhecidas pelos mesmos carboidratos, como em lectinas ligantes a manose que ocorrem em monocotiledôneas, leguminosas, e na família jacalina. Lectinas ligantes Gal/GalNAc são encontradas na família de leguminosas, tipo 2RIP e na família Amaranthaceae.

Tabela III: Especificidade de ligação a carboidratos de lectinas de plantas^a

ESPECIFICIDADE	LECTINAS
Grupo Fucose	
Fucose	<i>Ulex europaeus</i>
Grupo Galactose/N-acetilgalactosamina	
Galactose>>GalNAc	<i>Jacalina (Artocarpus integrifolia)</i>
Gal=GalNAc	<i>Clerodendron trichotomum</i>
Gal<<GalNAc	<i>Soja (Glycine max)</i>
Grupo N-acetilglicosamina	
GlcNAc	Gérmen de trigo (<i>Triticum aestivum</i>)
(GlcNAc) _n	<i>Urtica dioica</i>
Grupo Manose	
Manose	<i>Galanthus nivalis</i>
Manose/Glicose	Con A (<i>Canavalia ensiformes</i>)
Manose/Maltose	<i>Calystegia sepium</i>
Grupo Ácido Siálico	
Ácido Siálico	Gérmen de trigo (<i>Triticum aestivum</i>)
Neu5Ac α (2,6)Gal/GalNAc	<i>Sambucus nigra</i>
Neu5Ac α (2,3)Gal/GalNAc	<i>Maackia amurensis</i>
Grupo de Glicanos Complexos	
Especificidade com complexos conhecidos	PHA (<i>Phaseolus vulgaris</i>)
Especificidade com complexos desconhecidos	<i>Euonymus europaeus</i>

^aPeumans *et al.*, 1998

4 - MECANISMOS DE DEFESA DE PLANTAS

Diferente dos animais, as plantas não possuem um sistema imunológico para a sua defesa contra viroses e microrganismos patogênicos. Entretanto, devido a sua imobilidade absoluta, as plantas não podem evitar ou escapar do ataque de predadores. Assim, elas têm realmente um outro sistema de defesa o qual puderam desenvolver no curso de sua evolução (Peumans *et al.*, 1995). Muitas destas proteínas estão sendo testadas como detergentes e repelentes contra insetos (Brattsten, 1991).

Basicamente, os mecanismos de defesa de plantas podem ser divididos em sistemas passivos e ativos.

O *Sistema Defensivo Ativo* é também conhecido como reação de hipersensibilidade, é induzido em plantas resistentes em resposta a todos grupos de patógenos de plantas conhecidos, como viroses, bactérias, fungos e nematodos (Cornelissen *et al.*, 1993). Esta reação de hipersensibilidade é caracterizada por uma rápida necrose localizada no sítio da infecção.

O *Sistema Defensivo Passivo* é constitutivamente expresso para antecipar um ataque por patógenos ou predadores. São barreiras físicas e adaptações morfológicas, tais como espessas paredes celulares, sementes cobertas, espinhos e pêlos os quais agem como obstáculos para a penetração dos patógenos. Outras defesas estão baseadas em adaptações bioquímicas mais do que morfológicas (Peumans *et al.*, 1995).

As plantas têm uma vasta capacidade metabólica além de produzirem muitos metabólitos secundários os quais são tóxicos, antinutricionais ou aversivos as espécies, tornando-se um “predador” em potencial. Os exemplos incluem as piretrinas de crisântemo e alcalóides como a nicotina do tabaco. Outras classes de compostos secundários os quais tem sido implicados na proteção do ataque de insetos incluem os terpenóides, esteróides, flavanóides, fenólicos, glicosídeos cianogênicos, rotenóides, saponinas e aminoácidos não protéicos (Gatehouse *et al.*, 1998). A produção de alguns desses compostos impõe um demonstrável custo metabólico na planta, indicado pela aptidão reduzida na ausência de predação; isto sugere que essa produção na planta é uma resposta seletiva para a

alimentação do inseto sendo que os vários tipos de proteínas são tóxicos (Peumans *et al.*, 1995).

As evidências obtidas com respeito ao papel das lectinas na defesa de plantas indicam que pelo menos algumas destas proteínas são importantes componentes dos mecanismos passivos de defesa contra insetos fitófagos e animais herbívoros e possivelmente contra microrganismos. Algumas lectinas podem estar envolvidas nos mecanismos de defesa ativos, o qual deve estar relacionado com a sua afinidade por carboidrato (Peumans *et al.*, 1995).

5- PAPÉIS BIOLÓGICOS DAS LECTINAS DE PLANTAS

Os papéis biológicos das lectinas de plantas são ainda pouco determinados. Sua localização ultraestrutural e seu comportamento durante o ciclo de vida da planta são de extrema importância para a avaliação de algumas hipóteses relacionadas com suas funções (Moreira *et al.*, 1990). A admissão que a atividade de muitas lectinas de plantas está orientada contra glicans exteriores foi uma importante descoberta do papel dessas proteínas.

Várias hipóteses relacionadas com as funções das lectinas foram sugeridas, baseadas em suas propriedades gerais e localização. Assim, as lectinas atuam com um papel muito importante como proteínas de reserva, como mecanismo de defesa contra patógenos (Mirelman *et al.*, 1975) e na simbiose entre plantas e microrganismos.

A toxicidade oral das lectinas a animais e ao homem tem sido observada por envenenamento acidental de humanos por ingestão de alimentos, como feijão, mal cozidos ou crus e por animais experimentais alimentados com dieta rica em aglutininas de *Phaseolus vulgaris* (PHA) (Pusztai *et al.*, 1977). PHA não é degradada ou inativada pelas enzimas digestivas do estômago causando hiperplasia e hipertrofia do intestino (Pusztai *et al.*, 1996), náuseas, vômito e diarreia.

As lectinas também possuem função repelente, algumas podem causar efeitos indiretos em órgãos distintos. Várias lectinas agem como fatores de crescimento do pâncreas, por modulação de sua atividade secretória, causando distúrbios hormonais (Peumans *et al.*, 1996).

5.1 - Atividade Inseticida das Lectinas

O papel das lectinas como proteínas defensivas de plantas contra insetos predadores foi primariamente estudada em lectinas de feijão (*P. vulgaris*), onde eram responsáveis pela resistência dessas sementes ao ataque por coleópteras (Janzen *et al.*, 1976). Estudos subseqüentes tiveram a confirmação que muitas lectinas atuam como inseticidas; identificadas por meio de dietas artificiais oferecidas a esses insetos.

Os invertebrados fitófagos são um dos primeiros grupos de organismos os quais são expostos aos possíveis efeitos detrimenais das lectinas. Historicamente, o possível papel das lectinas na defesa de plantas contra insetos tem sido reconhecido desde 1976 quando Jazen e outros pesquisadores observaram uma atividade inseticida da lectina de *P. vulgaris* quando oferecida a *Callosobruchus maculatus*. A indicação a um possível papel de proteção da lectina contra insetos está baseada neste resultado falso-positivo, desde que o efeito foi devido a um contaminante, inibidor de α -amilase (Huesing *et al.*, 1991). Posteriormente, por meio de ensaios utilizando-se dietas artificiais, outras lectinas das mais variadas espécies tiveram seu poder inseticida também testado.

A sensibilidade de diferentes espécies de insetos para a ingestão de lectina é variável, e a ligação de uma lectina ao intestino de uma dada espécie não necessariamente facilita a atividade inseticida (Harper *et al.*, 1995). A membrana peritrófica (PM) pode agir como um alvo em muitos insetos para a ligação de lectinas (Fitches *et al.*, 2001). O epitélio celular ao longo do trato digestivo do inseto fitófago está diretamente exposto ao conteúdo da dieta, com isso, são locais específicos possíveis para a atuação da proteína de defesa da planta. Desde que glicoproteínas são os maiores constituintes destas membranas, o lado

luminal do intestino é literalmente coberto com sítios potenciais de ligação para as lectinas da dieta. Pode-se facilmente imaginar que quando há o ligamento da lectina ao receptor da glicoproteína ocorre um efeito deletério local ou sistêmico acarretando o afastamento do inseto, retardo no seu crescimento ou morte (Peumans *et al.*, 1995; Powell *et al.*, 1998).

A toxicidade das lectinas está baseada em sua alta especificidade de ligar-se a receptores de moléculas as quais estão localizadas em algum lugar no intestino do inseto, de modo a gerar vários tipos de interações (Habibi *et al.*, 2000). Primeiro, o ligamento de lectinas à quitina presente na membrana peritrófica de insetos, de modo a afetar a estrutura ou a formação da membrana. O segundo tipo de interação é o ligamento de lectinas a glicoconjugados expostos na superfície das células epiteliais ao longo do trato digestivo de insetos. Em princípio, todas as lectinas que possuam um sítio complementar de ligação a carboidrato para os açúcares destes glicoconjugados, podem ligar-se a superfície epitelial se as condições permitirem a interação lectina-açúcar específica (Peumans *et al.*, 1995).

As lectinas de plantas podem também interferir no sistema digestivo dos insetos por um terceiro tipo de interação, que consiste no ligamento lectina-glicoproteína às enzimas digestivas do inseto de modo a formar complexos glicosilados promovendo a inativação dessas enzimas.

❖ *Lectinas ativas contra Coleóptera*

As lectinas tóxicas a *C. maculatus*, uma das maiores pragas de grãos estocados em muitas partes do mundo, têm sido identificadas em subseqüentes experimentos. Cerca de 17 lectinas de plantas comercialmente acessíveis têm sido relatadas quanto seus efeitos tóxicos a bruquídeos. Essas lectinas podem ser classificadas de acordo com a especificidade para N-acetilgalactosamina/galactose (GalNAc) e aquelas para N-acetilglucosamina (GlcNAc). Lectina de *Psophocarpus tetragonolobus* (GlcNAc) tem sido tóxicas a *C. maculatus*. Em contraste, uma lectina de *Sambucus nigra* com especificidade para GalNAc (SNA-II) foi inefetiva contra o bruquídeo *C. maculatus* enquanto uma outra

(SNA-I), com especificidade a 2,6-neuraminil-gal/GalNAc, foi extremamente potente (Gatehouse *et al.*, 1998).

A razão para o uso de lectinas específicas a N-acetilglicosamina, está baseada no fato que o intestino médio dos insetos contem quitina, um polímero de N-acetilglicosamina, na membrana peritrófica (Richards *et al.*, 1977). De todas as lectinas testadas contra *C. maculatus*, a lectina de gérmen de trigo (WGA), com especificidade para GlcNAc foi a mais potente. Além disso, foi identificado que lectinas de arroz e *Urtica dioica* (UDA) são tóxicas a esse bruquídeo, exibindo níveis similares de toxicidade para WGA (Huesing *et al.*, 1991).

Outras lectinas com diferentes especificidades por carboidratos também têm mostrado efeito tóxico, como, *Pisum sativum*, *Solanum tuberosum*, *Datura stramonium* e *Triticum aestivum*, foram efetivas no combate do bruquídeo *C. maculatus* (Czapla *et al.*, 1990), do mesmo modo que a lectina ligante a N-acetilgalactosamina de *Maclura pomifera* (Murdock *et al.*, 1990).

A especificidade dada a uma lectina não é necessariamente um bom indicador desta propriedade inseticida. Por exemplo, os efeitos tóxicos de lectinas de diferentes espécies, com especificidade a manose/glicose com relação ao bruquídeo *C. maculatus* diferem consideravelmente, como as lectinas de ervilha que tem pouco ou nenhum efeito tóxico ou as lectinas de *Dioclea* spp. que são significativamente tóxicas a esse inseto (Gatehouse *et al.*, 1998).

❖ *Lectinas ativas contra Lepidóptera*

Comparavelmente poucas lectinas tem sido testadas por dietas artificiais e serem relativamente tóxicas a Lepidoptera. Algumas lectinas têm sido descritas na literatura contra *Ostrinia nubilalis* (Czapla *et al.*, 1990) como as lectinas de *Ricinus communis*, *Bauhinia purpurea* e do gérmen de trigo, as quais são específicas para GalNAc, GalNAc e GlcNAc, respectivamente, e causaram uma mortalidade de 100% em larvas após sete dias, utilizando uma concentração de 2%. Porém as lectinas de *Phaseolus vulgaris*, *Pisum*

sativum, *Glycine max* e *Bauhinia purpurea* a uma concentração de 2% não possuíram efeito tóxico ao lepidóptera *Maruca vitrata*.

Lectinas de *Galanthus nivalis* (GNA) com especificidade para α -D-manose e de *Canavalia ensiformes* (Con A) a qual liga-se a resíduos de glucose e manose, têm mostrado exercer efeito detrimental sobre larvas de *Lacanobia oleraceae*, que é um membro economicamente importante das pestes de Lepidópteras (Gatehouse *et al.*, 1999). Estudos com outras lectinas com diferenciada especificidade por carboidratos têm sido realizados para a observação de seus efeitos sobre uma peste de legumes, *Maruca vitrata*. Lectinas como *Allium sativum* (Man), *Calystegia sepium* (Man/Mal), *Pisum sativum* (Man/Glc), *Bauhinia purpurea* (Gal/GalNAc), *Urtica dioica* (GlcNAc), *Maackia amurensis* (ácido siálico) e *Colchium autumnale* (glicans complexos) promovem um retardo no desenvolvimento do lepidóptera *M. vitrata* (Machuka *et al.*, 1999a,b).

❖ *Lectinas ativas contra Homoptera*

A atividade inseticida de lectinas contra homópteras está recebendo muita atenção. Powell e colaboradores (1993) usaram dietas artificiais para testar uma série de lectinas contra *Nilaparvata lugens*, a qual é uma importante peste de arroz da Ásia, e embora algumas lectinas (ervilha e tomate) não tiveram efeito na sobrevivência desses insetos, outras tiveram um decréscimo significativo. As duas proteínas testadas mais efetivas foram GNA (manose específica) e WGA (GlcNAc) causando uma mortalidade de 80%.

Habibi *et al.* (1993) realizou outros ensaios para identificar lectinas as quais poderiam ser adequadas no controle de *Empoasca fabae*; as lectinas testadas foram específicas para glicose-manose, GlcNAc ou GalNAc. Das lectinas testadas as que causaram uma maior redução da sobrevivência foram as lectinas de jaca, ervilha, lentilha, além de PHA e WGA. GNA também promoveu uma significativa redução no crescimento de *Myzus persicae* e reduziu significativamente a fecundidade das fêmeas sobreviventes (Sauvion *et al.*, 1996).

❖ *Lectinas ativas contra Diptera*

Muitos relatos dos efeitos de lectinas de plantas a insetos têm sido relacionados a insetos fitófagos. Recentemente, os efeitos de lectinas de plantas em larvas de *Lucila cuprina* tem sido testada na tentativa de identificar possíveis controles estratégicos desta peste (Eiseman *et al.*, 1994). E nesses estudos demonstraram que WGA (GlcNAs específica) e Con A (glicose/manose específica) causaram uma inibição concentração-dependente do crescimento larval das larvas desse inseto.

Os efeitos deletérios causados pelas lectinas poderiam ser prevenidos pela presença de açúcares inibitórios apropriados, sugerindo uma alta interação específica.

5.2 - Atividade Antiviral das lectinas de Plantas

Várias lectinas de plantas exibem um efeito inibitório *in vitro* em viroses animal e humana. Por exemplo, a lectina ligante a quitina de *Urtica dioica* e as lectinas das espécies Amaryllidaceae e Orchidaceae são potentes inibidores de infecções de células alvo com retrovíroses tais como o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e o citomegalovírus (Balzarini *et al.*, 1992).

Até agora, porém, nenhuma lectina – com exceção da 2RIPs – tem exibido qualquer efeito inibitório na infecção ou espalhamento de viroses de plantas em hospedeiros sensíveis. A carência de evidências não deve significar que as lectinas não estejam envolvidas na proteção de algumas plantas contra viroses (Peumans *et al.*, 1995). Ainda há a possibilidade que algumas plantas possam ter um papel antiviral indireto. Porém, a presença de lectinas inseticidas pode prevenir e/ou reduzir o espalhamento de doenças virais transmitidas por insetos.

5.3 - Atividade Bactericida das Lectinas de Plantas

A parede celular das bactérias não apenas permite qualquer interação entre glicoconjugados em suas membranas e proteínas ligantes a carboidratos, como também impede que estas proteínas penetrem no citoplasma. As lectinas de plantas não podem alterar a estrutura e/ou a permeabilidade da membrana ou atrapalhar os processos intracelulares normais de invasão de micróbios.

O processo utilizado pelas lectinas de plantas na defesa contra bactérias, está relacionado a um mecanismo indireto baseado nas interações com carboidratos presentes expostos na parede celular ou polissacarídeos extracelulares. Um dos primeiros exemplos documentados é a interação da bactéria *Pseudomonas solanacearum* e a lectina de batata. Experimentos *in vitro* demonstraram que apenas amostras não virulentas foram reconhecidas e aglutinadas pela lectina purificada, e as amostras virulentas não reagiram devido à presença de polissacarídeos extracelulares (Sequeira *et al.*, 1977).

Recentes observações com considerada ligação de lectinas de plantas aos componentes da parede celular bacteriana (tal como ácido murâmico, ácido N-acetilmuramínico e muramil dipeptídeos) revelaram que as lectinas de sementes de várias espécies de leguminosas fortemente interagem com aqueles carboidratos da parede bacteriana (Ajouba *et al.*, 1994). Algumas lectinas têm a capacidade em reconhecer e imobilizar bactérias atuando como um importante processo de resistência destas plantas à infecção. As lectinas têm sido indiretamente envolvidas com a resistência de *Phaseolus vulgaris* e tomate no reconhecimento e encapsulação bacteriana (Moreira *et al.*, 1991).

5.4 - Atividade Fungicida das Lectinas de Plantas

Já que as lectinas de plantas não podem se ligar a glicoconjugados nas membranas fúngicas ou penetrar no citoplasma das células devido à presença de uma parede celular rígida e espessa, uma interferência direta no crescimento e desenvolvimento destes organismos (por uma alteração da estrutura e/ou permeabilidade da membrana ou um

distúrbio dos processos intracelulares normais) parece improvável. Porém, os efeitos indiretos baseados na ligação de lectinas a carboidratos expostos na superfície da parede celular fúngica são possíveis (Peumans *et al.*, 1995).

Devido a sua especificidade, as lectinas ligantes a quitina parecem ter um papel na defesa de plantas contra fungos (e insetos). Estudos *in vitro*, demonstrando que WGA inibia a germinação de esporos e o crescimento de hifas de *Trichoderma viridis* e interfere na síntese de quitina (Mirelman *et al.*, 1975). Isto suporta fortemente a idéia que estas lectinas protegem as plantas contra fungos a levam a formulação da hipótese atrativa que o papel fisiológico de WGA consiste do controle de patógenos fúngais contendo quitina durante a germinação e crescimento do trigo (Mirelman *et al.*, 1975).

Vários tipos de proteínas de plantas fungitóxicas, as quais não são comumente tidas como lectinas, possuem um domínio ligante a quitina com homologia seqüencial para as lectinas ligantes a quitina. Um exemplo, é um pequeno peptídeo (30 resíduos de aminoácidos) ligante à quitina de sementes de *Amaranthus caudatus*, as quais possuem uma potente propriedade fungicida (Broekaert *et al.*, 1992).

Podemos concluir que há relativamente poucas evidências para um papel direto ou indireto das lectinas na defesa de plantas contra fungos. Isto poderia ser esperado, desde que a estrutura de parede de fungos patógenos quase impede um sistema de defesa de plantas baseado em proteínas. Isto não surpreende, de modo que apenas lectinas com um tamanho relativamente pequeno têm sido encontradas interferindo com o crescimento *in vitro* de fungos. O sistema de defesa ativo, baseado na reação de hipersensibilidade e produção de antibióticos (ou peptídeos antimicrobianos), são os melhores controladores do ataque de micróbios a plantas (Peumans *et al.*, 1995).

5.5 - Agregação Plaquetária

A agregação plaquetária é mediada por pelo menos três diferentes mecanismos. O primeiro envolve a liberação de ADP (Born, 1962) e, durante algum tempo, acreditou-se que este fosse capaz de mediar a agregação causada por todos os demais agentes

agregantes. Entretanto, o fato do ATP (um verdadeiro antagonista do ADP) não inibir a agregação induzida por agentes (Macforlane and Mills, 1975) mostrou que drogas podem induzir o processo por outros mecanismos que não a liberação de ADP. Além disso, a combinação de fosfato de creatina pela creatina fosfoquinase (CP/PPK) pode impedir a agregação induzida pelo ADP convertendo-o em ATP. O segundo mecanismo, mediado pelos metabólitos do ácido araquidônico (AA), particularmente o tromboxano A₂ (TXA₂) é deflagrado por potentes agentes agregantes como o tromboxano, colágeno, convulxina e pelo próprio ato de agregação, e pode ser bloqueado pela aspirina (AAS) pela inibição da via da ciclo-oxigenase. No entanto, nem a inibição da via tromboxana (pela AAS) nem da via ADP (pelo CP/CPK), nem de ambas conjuntamente, mostrou-se capaz de inibir a agregação causada por altas concentrações de trombina ou ionoforo de cálcio (A 23187) ou convulxina (Vargaftig *et al.*, 1981).

O PAF (fator ativador de plaquetas), uma lisofosfatidilcolina capaz de agregar plaquetas por uma via independente da ciclo-oxigenase (Chignard *et al.*, 1979) foi postulado como mediador desta terceira via. Entretanto, nem a utilização de antagonistas seletivos do PAF, nem a prévia depleção do conteúdo granular de plaquetas (Adnot *et al.*, 1987), são capazes de impedir a posterior agregação plaquetária induzida, utilizada pela convulxina ou pela trombina.

A serotonina (5-HT) agrega plaquetas humanas em concentrações micromolares (μM), mas este efeito (como outros desta amina) é variável e, de forma geral, reversível e dependente de espécie animal (Mitchell, 1975). O receptor para 5-HT está ligado à ativação da PLAC e de sua ativação resulta a quebra do fosfoinosotídeos, aumento de Ca^{+2} e fosforilação.

Com os relatos acima, tem-se procurado outras fontes que atuem direta ou indiretamente sobre a agregação plaquetária. Uma dessas fontes são lectinas as quais possuem a capacidade de ligar-se a carboidratos, de modo a ligar-se a plaquetas. Essa habilidade em ligar-se a glicoproteínas tem sido utilizada para facilitar a purificação e identificação de glicoproteínas de plaquetas. Um exemplo, é a lectina lentilha que liga-se a superfície de plaquetas mas não estimula a agregação plaquetária (Ganguly *et al.*, 1980). A

fitohemaglutinina (PHA) (Majerus *et al.*, 1972) e a aglutinina de gérmen de trigo (WGA) (Ganguly *et al.*, 1980), não apenas se ligam a superfície de plaquetas mas mediam tanto a secreção e a agregação plaquetária.

O mecanismo de agregação plaquetária induzida por lectinas é inibida por lactose, a qual também bloqueia a hemaglutinação por lectinas. Deste modo, o mesmo sítio onde as moléculas de lectina, a qual media a ligação a superfície de eritrócitos, também parecem mediar a interação com a superfície da plaqueta (Olgivie *et al.*, 1989).

Por ligamento integral de glicoproteínas da membrana, as lectinas parecem iniciar um estímulo o qual é transduzido via receptores de plaquetas causando a agregação plaquetária. A resposta da plaqueta para este estímulo culmina na secreção a qual provoca a agregação (Olgivie *et al.*, 1989).

6 - PLANTAS TRANSGÊNICAS

A proteção de colheitas representa um papel vital e integral na produção agrícola nos dias atuais. O aumento da demanda de produção e a intensificação das práticas agrícolas, particularmente no mundo em desenvolvimento, têm aumentado o problema de pestes, e, portanto, o controle (Gatehouse *et al.*, 1998).

Até o presente, o controle de pestes está primariamente dependente do uso de agroquímicos além de possuírem uma menor extensão para uma variedade resistente, com métodos de controle biológico sendo sucessivamente empregados apenas em poucos casos específicos. Muitos casos têm resultado em um rápido aumento da resistência a insetos a tais compostos, como ilustrado a rápida resistência a inseticidas organoclorados por *Heliothis virescens* (Gatehouse *et al.*, 1998).

O aumento da publicidade e o interesse sob o generalizado uso de inseticidas químicos tem resultado em uma grande quantidade de pesquisas a métodos de controle de insetos não tão nocivos ao ambiente. Tão bem como os efeitos tóxicos em animais de

grande porte observados com alguns pesticidas e inseticidas químicos podem também ter efeitos detrimenais nas espécies de insetos benéficos (Down *et al.*, 2000).

A administração de pestes integradas combina vários sistemas de controle, incluindo pesticidas químicos, embora o controle biológico, usando predadores naturais e parasitóides de culturas é usualmente o elemento chave (Down *et al.*, 2000).

Culturas transgênicas resistentes a insetos têm sido produzidas por muitas culturas economicamente importantes no mundo incluindo o milho, algodão, arroz e batata. Embora muita atenção tem sido focada em genes resistentes a insetos de origem bacteriana, primariamente aqueles codificados por toxinas de *Bacillus thuringiensis*, outros recursos de produtos de gene potencialmente inseticidas têm sido examinados, incluindo as proteínas defensivas de plantas (Fitches *et al.*, 2001).

O objetivo na produção de plantas transgênicas expressando genes de lectinas tem sido primariamente para a proteção de culturas e para explorar a ação inseticida das lectinas. Estes experimentos têm proporcionado evidências diretas que as lectinas podem atuar como uma proteção da planta contra insetos predadores (os quais não poderiam ser feitos por estudos em dietas artificiais), e oferecem a possibilidade de ser investigado como as lectinas agem em associação com outros compostos defensivos presentes nas plantas (Gatehouse *et al.*, 1998).

Em casos em que o isolamento de uma lectina potencialmente proveitosa pode não ser realizada devido a razões práticas, uma pesquisa biotecnológica pode resolver o problema. O gene da lectina clonado pode ser transferido e expressado em um sistema heterogêneo. Em plantas transgênicas, tanto levedura como bactéria podem ser utilizadas como um sistema de expressão para as lectinas de plantas. O sistema de expressão bacteriana oferece várias vantagens importantes. Suas transformações são relativamente fáceis e as culturas podem crescer e ser mantidas sob controle laboratorial (Peumans *et al.*, 1998).

Não é evidente que as lectinas bacterianas recombinantes tenham as mesmas propriedades como as lectinas de plantas originais. As lectinas de plantas maduras são o resultado de modificações pós-transducionais. As bactérias são incapazes de realizar algumas dessas modificações (glicosilação, clivagem proteolítica, formação de pontes

dissulfeto intramoleculares) e, assim, podem acumular uma lectina recombinante que difere de sua forma nativa (Peumans *et al.*, 1998).

A lectina ligante a manose de *Galanthus nivalis* (GNA) é tóxica a importantes pestes de insetos incluindo homóptera, lepidóptera e coleóptera, quando incorporadas na dieta artificial. GNA afeta a população pela inibição do desenvolvimento e diminuição da fecundidade de ambos afideos *Aulacorthum solani* e *Mysus persicae* (Down *et al.*, 1996), além de promover outros efeitos aos demais insetos.

Devido às propriedades entomotóxicas de GNA, seu gene (gene *gna*) tem sido introduzido em variadas espécies de plantas (mono e dicotiledôneas). Em tabaco e batata o gene tem conferido acentuado nível de resistência a *Lacanobia oleraceae* e afideos (Fitches *et al.*, 1997), e em arroz e trigo o gene confere resistência a *Nilaparvata lugens* e afideos, respectivamente (Rao *et al.*, 1998).

Desde que homópteras se alimentam do floema, a expressão de GNA na seiva do floema foi objetivada em tabaco e em arroz pela utilização de promotor específico para floema do gene sacarose sintase de arroz (RSs1) (Rao *et al.*, 1998). O arroz transgênico expressando GNA tem obtido moderados níveis de resistência a *Nilaparvata lugens*, irrespectiva a promotores específicos ou constitutivos. Ambos promotores resultam na acumulação de GNA em tecidos não lignificados, com específica expressão em tecidos vascular e epidermal sendo observado com promotor constitutivo. A expressão de GNA em batatas tem mostrado resistência ao afideo *Mysus persicae* (Gatehouse *et al.*, 1996) e a *Aulacorthum solani* (Down *et al.*, 1996).

II - OBJETIVOS

A presente trabalho teve por objetivo fazer um estudo das sementes de *Annona coriacea*, com ênfase a lectinas presentes nessas sementes. Dentre os objetivos destacamos:

- ❖ Isolar uma lectina de *A. coriacea*;
- ❖ Realizar a caracterização físico-química desta proteína, por meio de técnicas cromatográficas, eletroforéticas, análise e composição de aminoácidos;
- ❖ Verificar a especificidade desta proteína para açúcares e diferentes tipos sanguíneos;
- ❖ Estudar a estabilidade dessa proteína, submetendo-as a condições variadas de pH, temperatura, agentes quelantes, enzimas proteolíticas e agentes desnaturantes;
- ❖ Verificar a atividade dessa proteína na agregação plaquetária;
- ❖ Verificar a atividade fungicida dessa proteína;
- ❖ Verificar a atividade inseticida dessa proteína.

III - MATERIAIS

1 - SEMENTES E ÁRVORE DE *Annona coriacea*

As sementes de *Annona coriacea*, também conhecida como Marolo ou Araticum-do-campo, é uma espécie pertencente à família Annonacea. É uma planta decídua, heliófita, seletiva xerófita, floresce durante os meses de novembro-janeiro e amadurecem no período de novembro-dezembro. Estão amplamente distribuídas pelos cerrados dos estados da Bahia, São Paulo, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul (Lorenzi, 1992).

A árvore pode atingir de 3 a 6 metros. As folhas são simples, coriáceas e pilosas na parte inferior. Sua madeira é leve e mole, geralmente utilizada em ornamentação e paisagismo, principalmente na arborização. Os frutos são comestíveis, tanto ao natural como na forma de suco, sendo inclusive cultivados em muitos pomares domésticos. As sementes não possuem especificidade determinada (Lorenzi, 1992).

As sementes de Marolo utilizadas neste trabalho foram coletadas no cerrado da região de Três Lagoas – Mato Grosso do Sul.

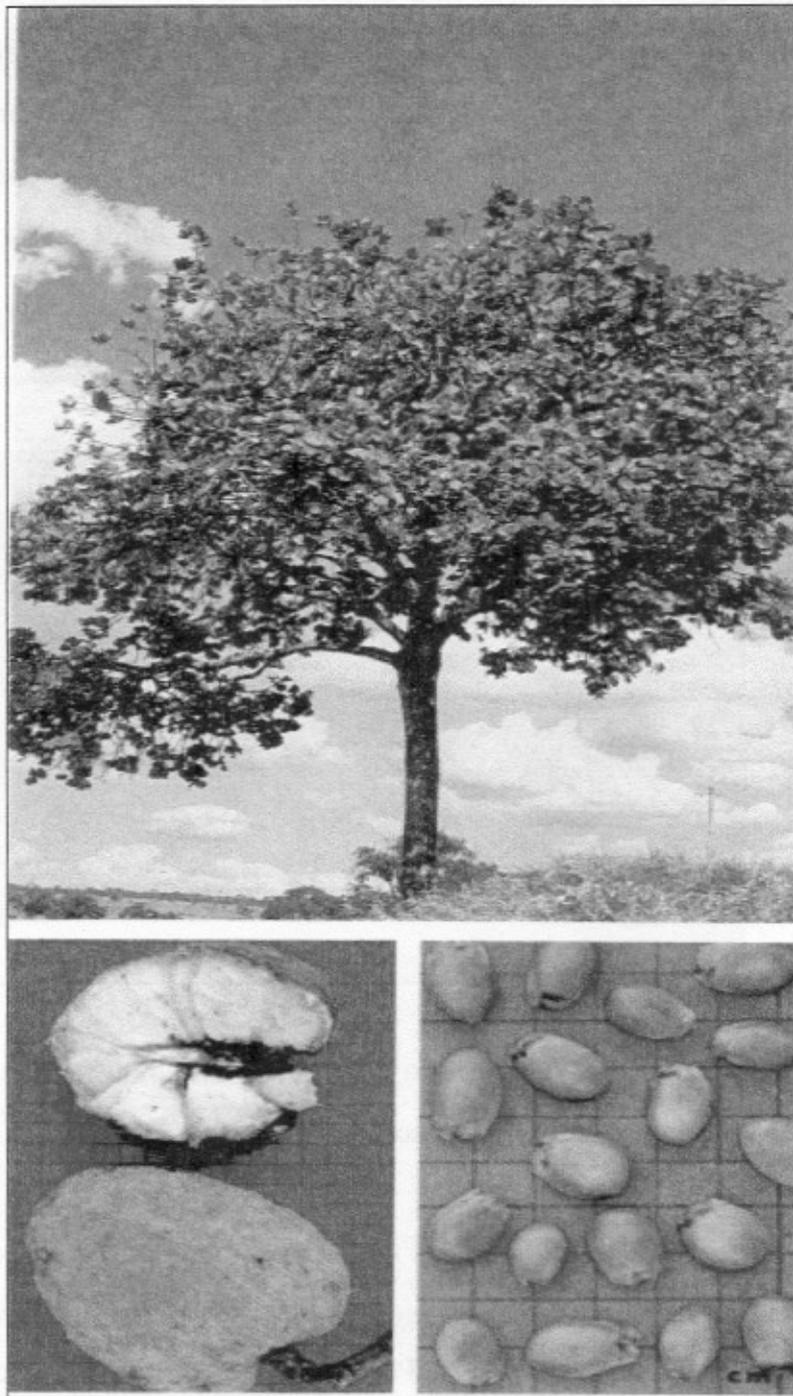


Figura 1: Árvore e sementes de *Annona coriacea* (Lorenzi, 1992).

2 – INSETOS

Para o estudo da atividade inseticida da lectina de *A. coriacea*, foram utilizados os insetos *Callosobruchus maculatus* (coleóptera) e *Anagasta kuehniella* (lepidoptera).

O inseto *Callosobruchus maculatus* é o principal inseto predador de grãos estocados, principalmente as variedades de feijão (*Vigna unguiculata* e *Phaseolus vulgaris*). É uma espécie pertencente à ordem Coleóptera, da família *Bruchidae* (Figura 2).

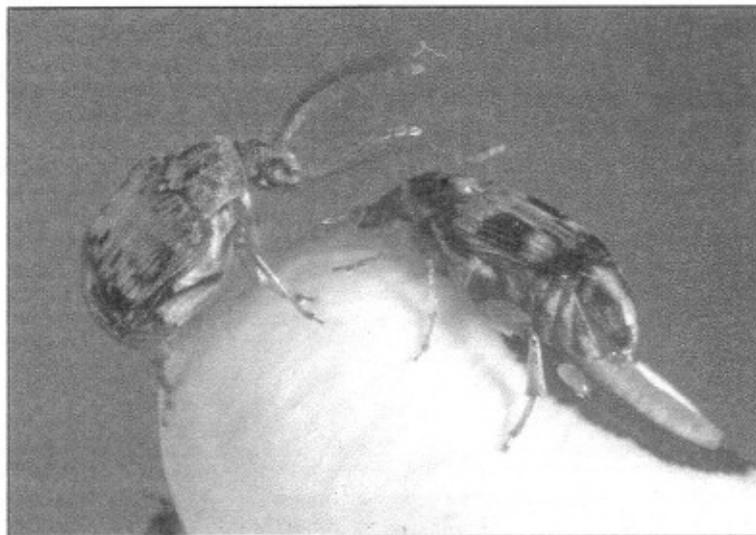


Figura 2: Macho e fêmea de *Callosobruchus maculatus* infestando grãos de feijão (Foto de Tecnigran).

O inseto *Anagasta kuehniella* Z. (Figura 3) é um dos principais predadores de produtos armazenados como milho (*Zea mays*), trigo (*Triticum aestivum*), arroz (*Oryza sativum*) e amendoim (*Arachis hypogea*). Porém mostra uma preferência alimentar para farinhas, farelos e outros produtos deixando-os, na maioria das vezes, imprestáveis para o consumo. É uma espécie pertencente à ordem Lepidoptera, da família *Pyralidea* (Gullan *et al.*, 1994).

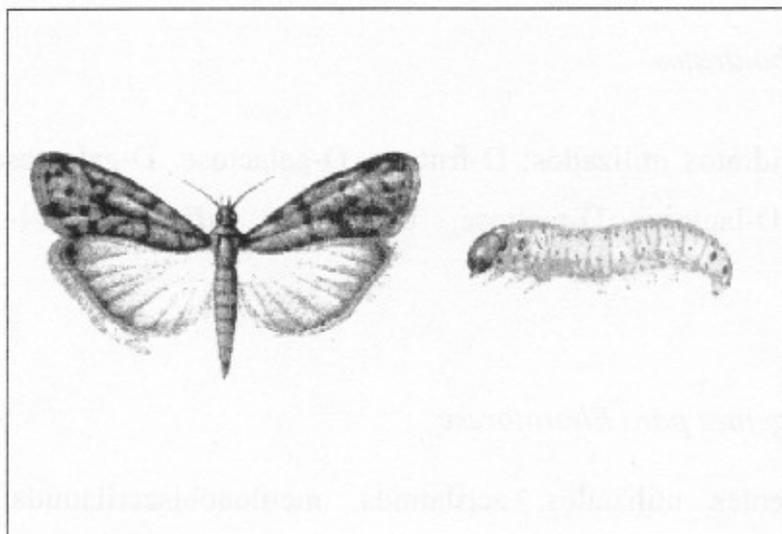


Figura 3: Inseto e larva de *Anagasta kuehniella* (Foto T. J. Kawecki).

As colônias foram mantidas 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).

3 - REAGENTES

❖ *Carboidratos*

Os carboidratos utilizados: D-frutose, D-galactose, D-galactosamina, D-glucose, D-glucosamina, D-lactose, D-maltose, D-manose, rafinose e N-acetil-glucosamina (Sigma).

❖ *Reagentes para Eletroforese*

Os reagentes utilizados: acrilamida, metilenobisacrilamida, TEMED, SDS, Coomassie Brilliant Blue R-250 e persulfato de amônio foram adquiridos da Bio-Rad Laboratories. Os padrões de massas moleculares fosforilase b (94 kDa), albumina sérica bovina (67 kDa), ovoalbumina (43 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina de soja (20 kDa) e α -lactalbumina (14 kDa) são procedentes da Pharmacia Fine Chemical.

❖ *Resinas*

As resinas de exclusão molecular Sephadex G-75 foi adquiridas da Pharmacia Fine Chemicals. A coluna C18 do sistema HPLC utilizada foi adquirida da Waters; a do sistema FPLC foi a Superdex G-75 da Amersham-Pharmacia.

Todos os demais reagentes foram de grau analítico ou HPLC.

IV - MÉTODOS

1 - PREPARAÇÃO DA FARINHA

As sementes de *A. coriacea* foram beneficiadas e passadas em moinho para obtenção de uma farinha de fina granulação. Devido à presença de altas quantidades de lipídios nas sementes, foi realizado o processo de delipidação utilizando hexano. Após secas, a farinha foi armazenada em freezer a uma temperatura de -20°C , para posterior utilização.

2 - OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO (EB)

O extrato bruto foi obtido pela extração da farinha de sementes de *A. coriacea* utilizando tampão fosfato de potássio monobásico 0,1 M, pH 7,6 (1:6 w/v) em constante agitação por um período de 2 horas. O homogeneizado obtido foi centrifugado a $6,000 \times g$ por 30 minutos. Após a centrifugação foi obtido um sobrenadante, denominado extrato bruto (EB), o qual foi dialisado por 48 horas contra água e em seguida liofilizado e utilizado nas etapas de purificação posteriores.

3- PURIFICAÇÃO DA LECTINA ACLEC

3.1 - Cromatografia de Exclusão Molecular Sephadex G-75

Coluna de gel filtração, Sephadex G-75 (3,0 x 50 cm) foi montada à temperatura ambiente e equilibrada em tampão fosfato de potássio monobásico 0,1 M, pH 7,6, contendo 0,1 M de NaCl. Em seguida, foram aplicadas 400 a 500 mg do extrato bruto

liofilizado Foram coletadas frações de 3,0 ml por tubo, com fluxo de 40 ml/h, efetuando-se a leitura das mesmas em espectrofotômetro, a 280 nm. Em seguida foi realizado o ensaio de hemaglutinação, para detecção de lectinas.

3.2 - Cromatografia de Fase Reversa (Sistema HPLC)

A fração com atividade hemaglutinante (ACL-2) oriunda da coluna de exclusão molecular foi submetida a cromatografia em fase reversa em coluna μ -Bondapak C-18 (3,9 x 30 cm) acoplada ao HPLC (Waters).

A coluna foi equilibrada com solução de TFA 0,1% em água obtida por sistema Milli-Q (solvente A). A eluição foi realizada por gradiente de TFA em ACN (solvente B) sob fluxo constante de 2,0 ml/min. O pico proveniente da cromatografia na coluna C18 teve sua atividade testada através de ensaio de hemaglutinação e análise de pureza em SDS-PAGE.

3.3 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida na Presença de SDS

A eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (PAGE-SDS) foi desenvolvida segundo 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 0,1 M, 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 no 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 empregado uma solução de 1 M de ditioneitol no mesmo tampão, e em seguida aquecidas por 2 minutos.

A corrida eletroforética foi realizada em temperatura ambiente, em tampão Tris-HCl 0,025 M, glicina 0,18 M, pH 8,3, contendo 0,1% (m/v) de SDS com duração de, aproximadamente, 2 horas sob corrente de 30 mA.

O 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 2 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).

4 - DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR RELATIVA

A massa molecular relativa da lectina ACLEC foi determinada por FPLC-Pharmacia, utilizando uma coluna de filtração em gel Superdex G-75 (Pharmacia), equilibrada com tampão bicarbonato de amônio 0,2 M, sob fluxo de 0,3 ml/min, calibrada com proteínas de massas moleculares conhecidas e assim, foi possível obter uma curva de calibração.

5 - DOSAGEM DE PROTEÍNAS

A concentração protéica da amostra foi determinada pelo método de Bradford (1976). A concentração de proteína foi avaliada utilizando-se albumina sérica bovina como padrão. O método consiste de 100 µl da amostra mais 2,5 ml da solução de Bradford. A leitura foi realizada 10 minutos após o início da reação a 595 nm.

6 - DOSAGEM DE CARBOIDRATOS

A proteína foi submetida ao método de Dubois *et al.* (1956) para determinação da porcentagem de carboidratos utilizando como padrão glicose.

O método consiste em uma relação de 10 µl de amostra para 990 µl de água, com 25 µl de Fenol 80% e 2,5 ml de ácido sulfúrico (H₂SO₄). A leitura foi realizada a 490 nm.

7 - ANÁLISE AUTOMÁTICA DE AMINOÁCIDOS

O sistema utilizado foi do analisador “Pico-Tag” da Waters, onde a identificação dos aminoácido foi feita através da cromatografia em HPLC do produto feniltiocarbamil do aminoácido, proveniente da derivatização com feniltiocianato dos aminoácidos obtidos de hidrólise ácida. Estas formas de cromóforos podem ser detectadas em concentrações de 1,0 pmol.

7.1- Preparação da amostra

❖ *Hidrólise Ácida*

Esta etapa foi afetuada no fundo do frasco de reação 100 µl de uma solução de HCl 6,0 M, ACLEC, além de 1,0 mg/ml de fenol para evitar a formação de clorotirosina. Em seguida foi feito vácuo próximo de 1-2 torr até início do borbulhamento do HCl. Fechado o vácuo, deixou-se entrar nitrogênio (SS-ultra puro) por 5 seg. Esta etapa foi repetida por 3 vezes. A amostra foi levada ao forno de hidrólise, a 105°C, durante 24 horas. Após este período o tubo de reação foi colocado a vácuo até 65 millitorr para secagem da proteína hidrolisada.

❖ *Derivatização*

Em ACLEC foi adicionado 20 µl de uma solução de metanol:água:triethylamina, 2:2:1 (v/v). Cada tubo foi agitado, centrifugado e colocado a evaporar em vácuo até 65 militorr. Este procedimento remove sais e solventes, adsorvidos nos aminoácidos. Uma solução fresca de derivatização foi preparada com metanol:triethylamina:água:feniltiocianato, na proporção 7:1:1:1 v/v, sendo adicionados 20 µl a cada tubo de reação e deixados a temperatura ambiente por 30 min. Após a derivatização a amostra foi seca a vácuo até 50 militorr, para completa remoção de todo o PITC. A amostra foi dissolvida em 50 µl de uma solução 0,4 mM de tampão fosfato de sódio contendo 0,05 M de acetonitrila.

A análise dos aminoácidos PITC foi realizada em HPLC, usando coluna C18 µ-Bondapak (3,9 mm x 15 cm) em cromatografia de fase reversa com um gradiente linear de 0 a 100% de acetonitrila 60% por 21 min. A identificação de cada aminoácido foi feita em relação a uma corrida padrão de aminoácidos PITC.

8 – DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA N-TERMINAL

8.1 – Eletroforese em gel de poliacrilamida e transferência

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada em condições desnaturantes, de acordo como descrito por Laemmli, 1970. O material foi separado em um gel PAGE-SDS a 12,5%, sendo a separação realizada a 15 mA em sistema de miniplacas Hoefer SE 250. Após a corrida, foi realizado a eletrotransferência de ACLEC para uma membrana de PVDF (polivinildifenodifluoreto), usando uma corrente de 400 mA por 60 min sob resfriamento à 10°C. O tampão de transferência foi preparado como 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 1L com 100 ml de metanol. Ao final da

transferência, a membrana foi corada com Coomassie 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.

8.2 – Procedimento da Seqüência

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

8.3 – Pesquisa da Homologia Sequencial

A seqüência N-terminal de ACLEC foi pesquisada, quanto a sua homologia com outras lectinas de seqüências usando os serviços eletrônicos BLAST-NCBI.

9- ENSAIOS BIOLÓGICOS

9.1 - Obtenção de Eritrócitos

Amostras de sangue, humano (A, B, AB e O) e de animais foram coletados em solução de Alsever's (2,05 g de glicose, 0,80 g de citrato de sódio, 0,42 g de cloreto de sódio, para 100 ml de água destilada, pH entre 6,1 e 6,5, ajustado com ácido cítrico).

Para o uso, o sangue coletado foi centrifugado pelo menos três vezes com NaCl 0,15 M a 1000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado, e a lavagem dos eritrócitos foi prosseguida. O objetivo da lavagem é retirar o anticoagulante e o excesso de proteínas presentes no plasma.

9.2 - Padronização de Eritrócitos

Os eritrócitos coletados foram lavados até obtenção do sobrenadante límpido e ressuspenso em pequeno volume de salina 0,15 M. Alíquotas de 0,5 ml foram retiradas e adicionadas em 25 ml de NaCl 0,15 M e utilizados em ensaios de hemaglutinação (2%).

9.3 - Determinação da Atividade Hemaglutinante (HA)

Para a determinação da atividade hemaglutinante foram utilizadas placas de microtitulação contendo 8 fileiras com 12 poços cada, nos quais foram adicionados 50 µl de NaCl 0,15 M.

Em seguida, foram adicionados 50 µl de ACLEC no primeiro poço, com agitação e transferência de 50 µl para o poço seguinte e sucessivamente até o último poço da mesma fileira, quando necessário, a diluição teve prosseguimento na fileira seguinte. Terminadas as diluições das amostras, foram adicionados 50 µl da suspensão de eritrócitos padronizados a 2% (v/v). As placas foram incubadas em estufa a 37°C por no mínimo 1 hora, com posterior observação do título, o qual é dado pelo inverso da diluição que apresenta aglutinação total.

9.4 - Ensaio de Inibição da Atividade Hemaglutinante

Em placas de microtitulação foram adicionados 50 µl de NaCl 0,15 M em cada poço. Em seguida, foi adicionado 50 µl do carboidrato (em concentrações de 100 mM) no primeiro poço, com agitação e transferência de 50 µl para o poço seguinte e sucessivamente até o último poço da mesma fileira, e em seguida foi adicionado em cada poço 50 µl de ACLEC. As placas foram mantidas em repouso por no mínimo 30 minutos e após esse tempo foram adicionados 50 µl da suspensão de eritrócitos padronizados a 2% (v/v) em NaCl 0,15 M. As placas foram incubadas em estufa a 37°C por no mínimo 1 hora. Os controles utilizados (negativo e positivo) constaram de 50 µl da solução do carboidrato

ou ACLEC, 50 µl de NaCl 0,15 M e 50 µl de suspensão celular, repectivamente. A leitura foi feita em seguida de modo a determinar qual açúcar teve atividade inibitória sobre a atividade hemaglutinante.

10- CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

10.1- Estabilidade em Relação ao pH

Aliquotas de ACLEC (com título mínimo de 5) foram separadas em eppendorffs e diluídas em tampões com os pHs variando de 2,0 a 10,0, e em seguida foram incubadas em banho-maria a 37°C por 1 hora. Após este período, foram retiradas e equilibradas com NaOH ou HCl até o pH se estabilizar entre 7,0 e 8,0. Em seguida, prosseguiu-se o ensaio de hemaglutinação, cada amostra foi testada em triplicata.

10.2 – Estabilidade Térmica

Aliquotas de ACLEC (com título mínimo de 5) foram preparadas em eppendorffs e diluídas em NaCl 0,15 M. Em seguida, cada amostra foi submetida a diferentes temperaturas variando de 37°C a 100 °C por cerca de 30 minutos. Após o término, as amostras tiveram suas temperaturas estabilizadas em banho de gelo. O teste de hemaglutinação foi realizado como no ensaio citado anteriormente. Cada amostra foi testada em triplicata.

10.3 - Agentes Quelantes-Íons Divalentes

Primeiramente, ACLEC (com título mínimo de 5) foi diluída em NaCl 0,15 M, e acondicionadas em eppendorffs. Em placas de microtitulação, foi adicionado em cada poço 50 µl de NaCl 0,15 M e 50 µl de EDTA 25 mM ou EGTA 25 mM em diluições seriadas, e

em seguida adicionou-se a lectina, deixando em incubação por 30 minutos. Após esse período, acrescentou-se 50 µl de hemácias a 2% em cada poço e levou-se a incubação por 1 hora. Controles para ambos os íons foram feitos com 50 µl de NaCl 0,15 M, 50 µl do íon correspondente e 50 µl de hemácia. A leitura foi realizada de maneira a determinar a dependência da lectina a íons divalentes para sua atividade hemaglutinante. Cada ensaio foi realizado em triplicata.

10.4 – Resistência a Hidrólise Enzimática

❖ Tripsina

ACLEC (com título mínimo de 5), foi diluída em um volume de de 900 µl de NaCl e em seguida foi adicionado 100µl da enzima tripsina (500 µg/ mL). Esta mistura foi incubada por 30 minutos a 37°C. Após este período, a mistura teve seu pH verificado e se estivesse fora da neutralidade teve-o corrigido.

O ensaio de hemaglutinação foi preparado como nos ensaios descritos acima e analisado com relação à inibição da atividade hemaglutinante da lectina e realizado em triplicada para posterior análise.

❖ Pronase

ACLEC (com título mínimo de 5), foi diluída em um volume de 900 µl de NaCl 0,15 M e em seguida foi adicionado 100 µl da enzima pronase (100 µg/ mL). Esta mistura foi incubada por 30 minutos a 37°C. Após a incubação, a mistura teve seu pH verificado e se estivesse fora da neutralidade teve-o corrigido.

O ensaio de hemaglutinação foi preparado como nos ensaios descritos acima e analisado com a relação à inibição da atividade hemaglutinante da lectina. O ensaio foi realizado em triplicata para a posterior análise.

10.5 – Estabilidade a Agentes Redutores

❖ *DTT*

Uma alíquota de ACLEC (com título mínimo de 5) foi diluída em 1 ml de DTT 10 mM (diluído em Tris/HCl 10 mM, NaCl 0,15 mM pH 8,0) e incubada overnight a 25°C. O ensaio de hemaglutinação procedeu-se como nos ensaios acima citados. O ensaio foi realizado em triplicata e o resultado foi avaliado de acordo com a efetividade da atividade hemaglutinante da lectina.

❖ *Uréia*

Uma alíquota de ACLEC (com título mínimo de 5) foram diluídas em 1ml de uréia 8 mM (diluído em NaCl 0,15 M) e incubadas overnight a 25°C. Os ensaios de hemaglutinação procederam como nos ensaios acima citados. O ensaio foi realizado em triplicata e o resultado foi avaliado de acordo com a efetividade da atividade hemaglutinante da lectina.

10.6 - Metaperiodato de Sódio (NaIO₄)

Uma alíquota de ACLEC (com título mínimo de 5), foi preparada em eppendorff e diluída em 1 ml de metaperiodato de sódio 10 mM (diluído em tampão acetato de sódio 10 mM, pH 5,5) e posteriormente incubada em temperatura ambiente e no escuro por 10 minutos. Em seguida a amostra juntamente com seu controle (apenas NaIO₄) foram dialisados contra NaCl 0,15 M por 12 horas. Após esse período, a amostra teve seu pH verificado e quando não estando por volta da neutralidade foi corrigido. O ensaio de hemaglutinação foi realizado em triplicata e analisado conforme a atuação sobre o efeito da lectina. A amostra tratada teve sua estrutura e mobilidade analisada em gel de poliacrilamida em presença de SDS (12,5%).

10.7 - Deglicosilação

Uma alíquota de ACLEC (com título mínimo de 5) foi diluída em uma mistura de TFMS e anisol (2:1, v/v) e incubada em gelo por 2 horas. Após esse período a amostra teve seu pH corrigido (2,0) e em seguida dialisada contra NaCl 0,15 M por 12 horas. O ensaio de hemaglutinação procedeu-se como nos ensaios acima citados sendo realizados em triplicata. O resultado foi avaliado de acordo com a efetividade da atividade hemaglutinante. A amostra tratada teve sua estrutura e mobilidade analisada em gel de poliacrilamida em presença de SDS (12,5%).

11 - AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA

Sangue humano de voluntários sadios que não receberam qualquer medicação, durante os 10 dias anteriores ao experimento foi coletado em citrato trisódico 3,8% (9:1 v/v). O plasma rico em plaquetas (PRP) foi obtido por centrifugação a 2,000 rpm, em temperatura ambiente por 15 minutos a 25°C. O sangue remanescente foi novamente centrifugado a 2000 rpm, em temperatura ambiente por 15 minutos a 25°C, para obtenção do plasma pobre em plaquetas (PPP).

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

A agregação foi monitorada, usando-se um agregômetro de dois canais (Payton Scientific Instruments, Inc., Buffalo, NY). O aparelho foi calibrado para 0% e 100% de transmissão de luz, usando PRP e PPP (ou solução de Krebs), determinando uma linha base e um pico máximo de agregação, respectivamente. A suspensão de PRP (500µl) foi mantida sob agitação (900 rpm) no aparelho em cubetas a 37°C, e então foram estimuladas pela adição de agonista (colágeno 8 µg ou ristocetina 8 µl em PRP) ou de lectina e a agregação monitorada durante 3 minutos.

12- PAPEL FUNGICIDA DA LECTINA

Para examinar o efeito da lectina ACLEC no desenvolvimento dos fungos foram utilizados os fungos *Colletrichum musae*, *Colletrichum lindemuthianum*, *Saccharaomyces cerevisiae*, *Fusarium oxysporum*. Foram utilizados cerca de 200 µl de células de levedura (*S. cerevisiae*) e de esporos (fungos filamentosos) (*C. musae*, *C. lindemuthianum* e *F. oxysporum*) (2×10^4 / ml em meio ágar Sabouraud). O meio de cultura é composto de peptona, glicose e ágar. Estas alíquotas foram colocadas em placas multiwell à 28°C e em seguida adicionou-se a solução de ACLEC (800 µg/ml). Todo o protocolo foi realizado sob condições assépticas e em placas estéreis e durante a incubação permaneceram fechadas para estarem livres de contaminação. O experimento foi monitorado por leitura óptica em espectrofotômetro a 660 nm, no tempo zero a cada 6 horas, seguindo até 60 horas. Um controle, sem adição de proteínas também foi utilizado. As leituras foram realizadas contra um branco contendo somente meio de cultura. Após 60 horas, as células e os esporos foram separados do meio de crescimento por centrifugação (3,000 rpm), lavados uma vez em Tris/HCL 100 mM, pH 8,0 para remover o excesso de meio. Os esporos após a extração foram filtrados em gases para a retirada de hifas remanescentes. O experimento foi realizado em triplicata, observados em microscópio (400 X) e a avaliação das leituras, os erros padrões e coeficiente de variações foram calculados.

13- PAPEL INSETICIDA DE ACLEC

13.1 - Criação de Insetos

Os bruquídeos *C. maculatus* foram mantidos sobre sementes de *Vigna unguiculata* (variedade setentão), em frascos de vidro transparente, de boca larga, herméticamente fechados com tampas metálicas perfuradas. As colônias foram mantidas em câmara incubadora (B.O.D.) em temperatura média de 27-28°C ±1 e umidade relativa de 65-70%. A cada geração foi realizada a infestação de novas sementes com fêmeas de dois dias de

idade, após emergência, com o período de postura de 1 dia (24h). Após o período de aproximadamente 30 dias, uma nova geração de insetos foi obtida.

Os insetos *A. kuehniella* foram mantidos em uma sala de criação em temperatura relativa de 26-27°C ±1 e umidade relativa de 65-70%. A dieta artificial foi preparada pela mistura de trigo integral, gérmen de trigo, farelo de trigo e levedura (8:2:1,9:0,1). A cada geração foi realizada a infestação de novas colônias com ovos de um dia de ovoposição.

13.2- Preparação de Sementes Artificiais como forma de alimentação para *C. maculatus*

As sementes artificiais foram preparadas pela mistura de farinha de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*) juntamente com a lectina ACLEC. As incorporações foram realizadas em variadas concentrações de 0,25%, 0,5%, 1%, 2% e 3%.

A mistura (farinha e proteína) foi comprimida em prensa manual para obtenção das sementes, as quais deveram ter 400 mg de massa e dimensões aproximadas de 0,8 x 1,0 cm. Posteriormente, essas sementes artificiais foram oferecidas a fêmeas de bruquídeos, com dois dias de emergência para ovoposição. Foram realizadas doze repetições em cada experimento e após 48 horas de infestação, os insetos e os ovos que excediram a 4 foram retirados. Após 20 dias as sementes foram abertas e analisadas quanto ao número de larvas sobreviventes e o seu peso médio (Macedo *et al.*, 2000).

13.3- Preparação da dieta artificial como forma de alimentação para *A. kuehniella*

A dieta consistiu da mistura de farinha de trigo, gérmen de trigo, farelo de trigo, levedo (8: 2: 1,9: 0,1) mais a lectina ACLEC. As incorporações foram realizadas em concentrações de 0,5%, 1,0% e 2,0%. Foram realizadas doze repetições em cada experimento deixando 5 ovos de *A. kuehniella*. O experimento foi analisado com 28 dias após infestação quanto ao número de larvas sobreviventes e o seu peso médio.

V. RESULTADOS

1 - ESTUDO DA ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE NO EXTRATO BRUTO (EB) DE *A. coriacea*

1.1 - Atividade Hemaglutinante do EB de *A. coriacea* sobre Hemáceas Humanas

O extrato bruto (1mg/ml), obtido da farinha de sementes de *A. coriacea* teve sua atividade hemaglutinante analisada por ensaio de hemaglutinação utilizando-se hemácias humanas (sistema ABO) padronizadas a 2%. Os resultados, ilustrados na **Tabela IV**, mostram que EB de *A. coriacea* possui afinidade por todos os grupos sanguíneos testados, apresentando uma maior especificidade para os grupos sanguíneos A e AB.

Tabela IV: Especificidade do Extrato Bruto (EB) de *A. coriacea* para eritrócitos humanos

ERITRÓCITOS HUMANOS	HEMAGLUTINAÇÃO (TÍTULO*)
<i>A</i>	5
<i>B</i>	3
<i>AB</i>	5
<i>O</i>	3

*Título: corresponde ao inverso da diluição o qual causou aglutinação total dos eritrócitos

1.2 - Atividade Hemaglutinante do Extrato Bruto (EB) de *A. coriacea* sobre Eritrócitos de Diferentes Espécies Animais

A capacidade hemaglutinante do extrato bruto (EB) de sementes de *A. coriacea* foi avaliada por ensaio de hemaglutinação utilizando-se suspensões de hemácias de diferentes espécies animais (camundongo, carneiro, coelho, bovino, caprino, galinha, rato) padronizadas a 2%. Os resultados (Tabela V) ilustram a capacidade do extrato bruto em aglutinar hemácias de todos os tipos sanguíneos utilizados e apresentou uma maior especificidade pelas hemácias de caprino.

Tabela V: Especificidade do extrato bruto (EB) de *A. coriacea* para eritrócitos de diferentes espécies animais.

ERITRÓCITOS ANIMAIS	HEMAGLUTINAÇÃO (TÍTULO*)
<i>Camundongo</i>	3
<i>Carneiro</i>	4
<i>Coelho</i>	4
<i>Bovino</i>	6
<i>Caprino</i>	11
<i>Galinha</i>	5
<i>Rato</i>	5

*Título: corresponde ao inverso da diluição o qual causou aglutinação total dos eritrócitos

2 - PURIFICAÇÃO DE LECTINA DE *A. coriacea*

2.1 Cromatografia de Exclusão Molecular em Coluna Sephadex G-75

Amostras de 5,0 ml de uma solução do extrato bruto (500 mg) de *A. coriacea* dissolvidos em tampão fosfato de potássio monobásico, 0,1 M, pH 7,6, contendo 0,1 M de NaCl foram aplicadas na coluna Sephadex G-75. A eluição foi feita com o mesmo tampão, coletando frações de 3 ml/tubo com fluxo de 40 ml/h. A **Figura 4** mostra o perfil cromatográfico com três picos de proteínas. O ensaio de hemaglutinação foi realizado em todas as frações, detectando-se atividade nos dois primeiros picos de proteína, com uma maior atividade aparente concentrada no segundo pico protéico, o qual foi denominado ACL-2. ACL-2 foi escolhido para estudos posteriores.

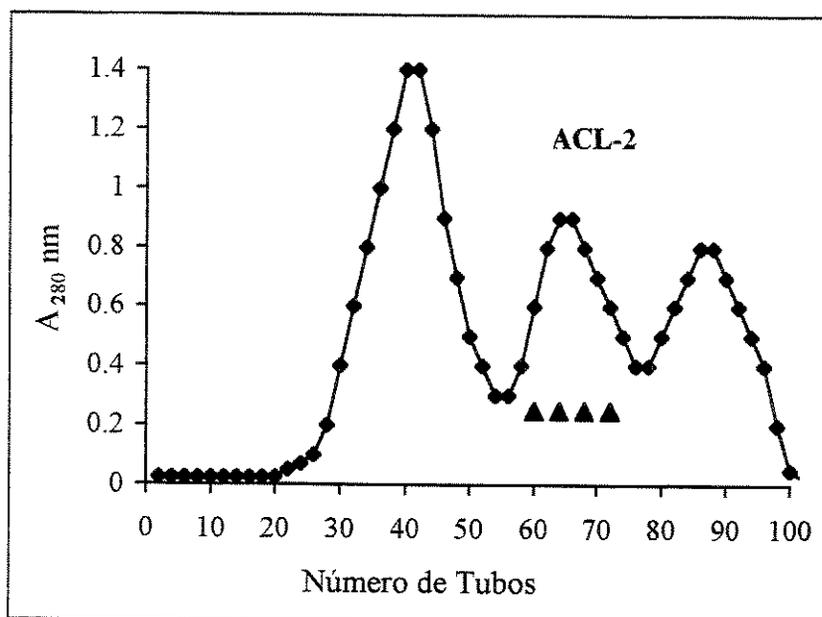


Figura 4: Cromatografia de exclusão molecular do Extrato Bruto (EB) de sementes de *A. coriacea* em coluna de Sephadex G-75. Foram aplicados 500 mg de EB, a eluição foi realizada em tampão fosfato de potássio monobásico 0,1 M, pH 7,6, contendo NaCl 0,1 M. Frações de 3,0 ml/tubo foram coletadas a um fluxo de 40 ml/h à temperatura ambiente. Absorbância a 280 nm. Atividade hemaglutinante (▲▲).

2.2 - Cromatografia de Fase-Reversa (Sistema HPLC)

A fração ACL-2, proveniente da cromatografia de filtração em gel, foi submetida a uma cromatografia de fase reversa (HPLC) em coluna de C18 μ -Bondapak (3,9 X 30 CM) a qual foi eluída com gradiente linear de TFA em ACN (66%). A **Figura 5** mostra o perfil cromatográfico com apenas um único pico simétrico, denominado ACLEC, em torno de 46% de acetonitrila. A eluição foi monitorada a 280 nm. ACLEC foi liofilizada e sua atividade foi determinada por ensaio de hemaglutinação onde apresentou grande atividade hemaglutinante.

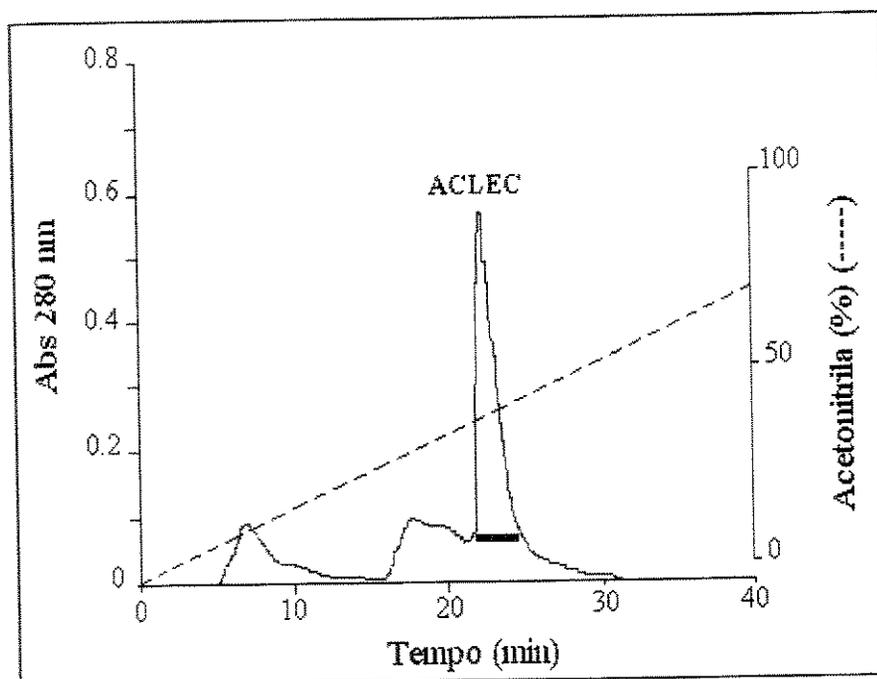


Figura 5: Cromatografia de ACL-2 em coluna μ -Bondapak C18 (3,9 x 300 mm) acoplada ao HPLC, equilibrada em solução de TFA 0,1% (solvente A). Amostra aplicada: 1 mg do material obtido em coluna de exclusão molecular. Solvente A: TFA 0,1%, Solvente B Acetonitrila 66% em TFA 0,1%. Fluxo 2 ml/min. Absorbância em 280 nm. Atividade hemaglutinante (—).

2.3 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em presença de SDS

A **Figura 6** mostra o perfil de migração das frações obtidas nas etapas de purificação da lectina ACLEC de sementes de *A. coriacea*. As frações ACL-2 e ACLEC em sua forma nativa apresentam duas bandas de proteína com peso molecular em torno de 21,6 kDa e 16 kDa (**Linha 2 e 3**). ACLEC quando tratada com agente desnaturante, DTT 1 M, apresenta duas bandas protéicas, mas com um decréscimo das massas moleculares em torno de 16 kDa e 11,4 kDa.

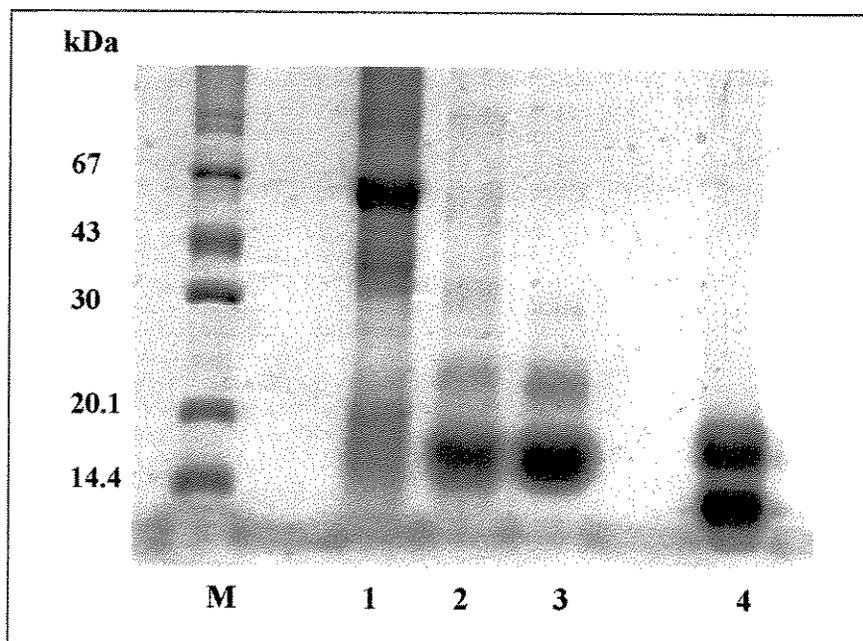


Figura 6: SDS-PAGE dos passos de purificação da lectina obtida de sementes de *A. coriacea*. Amostras: **M** – marcador de peso molecular; **1**- EB; **2**- ACL-2; **3 e 4**- ACLEC na ausência e presença de DTT 1 M, respectivamente.

2.4 – Determinação da Massa Molecular Relativa de ACLEC

A cromatografia em coluna de Superdex G-75 da amostra ACLEC apresentou dois picos de proteínas. 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 exclusão e V_o é o volume de exclusão do azul de Dextrano (**Figura 7**), resultando em massa relativa de aproximadamente 12,0 kDa.

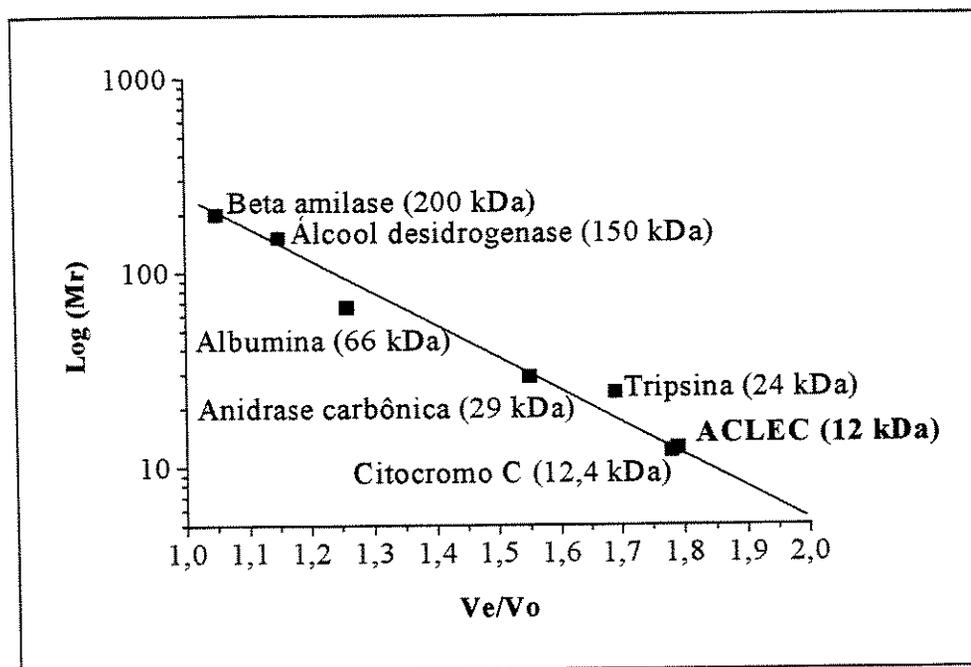


Figura 7: Determinação da massa molecular relativa de ACLEC (2 mg/ml). Foram utilizados os seguintes marcadores de M_r : β -amilase (200 kDa), álcool desidrogenase (150 kDa), albumina (66 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), tripsina (24 kDa) e citocromo c (12,4 kDa).

2.5 - Dosagem de Proteínas e Carboidratos de ACLEC

Utilizando o método de Bradford *et al.* (1976) e Dubois *et al.* (1956) para a dosagem de proteínas e de carboidratos, observou-se que a fração ACLEC de *Annona coriacea* apresentou 4,5% de proteína e 3,8% de carboidratos em relação ao extrato.

3 - ESTUDO DA ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE DE ACLEC

3.1 - Atividade sobre Eritrócitos Humanos

A capacidade hemaglutinante de ACLEC (20 µg) purificada foi avaliada por ensaio de hemaglutinação utilizando-se suspensões de hemácias humanas (sistema ABO) padronizadas a 2%. Na **Tabela VI** estão ilustrados os resultados obtidos com os tipos sanguíneos, onde pudemos observar que ACLEC apresentou especificidade para todos os eritrócitos utilizados.

Tabela VI: Especificidade de ACLEC de *A. coriacea* para eritrócitos humanos

ERITRÓCITOS HUMANOS	HEMAGLUTINAÇÃO (TÍTULO*)
<i>A</i>	4
<i>B</i>	4
<i>AB</i>	4
<i>O</i>	5

***Título:** corresponde ao inverso da diluição o qual causou aglutinação total dos eritrócitos. ACLEC 20 µg.

3.2 - Atividade Hemaglutinante de ACLEC sobre Eritrócitos de Diferentes Espécies Animais

A capacidade hemaglutinante de ACLEC (20 μ g) foi avaliada utilizando-se suspensões de hemácias de diferentes espécies animais. A **Tabela VII** ilustra os resultados obtidos com as hemácias animais, onde ACLEC apresentou especificidade para todas as hemácias utilizadas, porém, maior especificidade foi pelas hemácias de caprino.

Tabela VII: Especificidade de ACLEC de sementes de *A. coriacea* para eritrócitos de diferentes espécies animais.

ERITRÓCITOS ANIMAIS	HEMAGLUTINAÇÃO (TÍTULO*)
<i>Camundongo</i>	2
<i>Carneiro</i>	3
<i>Coelho</i>	3
<i>Bovino</i>	4
<i>Caprino</i>	8
<i>Galinha</i>	3
<i>Rato</i>	4

***Título:** corresponde ao inverso da diluição o qual causou aglutinação total dos eritrócitos. ACLEC 20 μ g.

3.3 - Ação Inibitória de Açúcares sobre a Atividade Hemaglutinante de ACLEC

A ação inibitória dos açúcares sobre a atividade hemaglutinante de ACLEC foi analisada com onze tipos de açúcares ilustrados na Tabela VIII. Através de ensaios de hemaglutinação utilizando sangue de rato a 2%, pudemos observar que ACLEC teve sua atividade inibida por quase todos os açúcares testados. Os açúcares que possuem maior poder inibitório são D-glicose e D-manose a uma concentração de 0,39 mM.

Tabela VIII: Ação inibitória de carboidratos sobre a atividade hemaglutinante de ACLEC

CARBOIDRATOS	IC ₅₀ (mM)*
<i>D- Frutose</i>	6,2
<i>D-Galactose</i>	6,2
<i>D-Galactosamina</i>	6,2
<i>D-Glicose</i>	0,39
<i>D-Glicosamina</i>	25
<i>D-Lactose</i>	1,56
<i>D-Maltose</i>	6,2
<i>D-Manose</i>	0,39
<i>Rafinose</i>	ND
<i>Sacarose</i>	ND
<i>N-acetil- glicosamina</i>	12,5

*IC₅₀: concentração requerida para inibir a atividade hemaglutinante em 50%. A quantidade de ACLEC usada neste ensaio foi de 20 µg.

ND: não detectada ação inibitória.

4 - ESTUDO DA ESTABILIDADE DE ACLEC

4.1- Efeito do pH na Atividade Hemaglutinante de ACLEC

A estabilidade de ACLEC (20 μg) em diferentes condições de pH (2,0-10,0) foi monitorada em banho-maria a 37°C por um período de 30 minutos. Após a neutralização do pH em torno de 7,0, essas amostras tiveram sua atividade hemaglutinante analisadas por ensaios de hemaglutinação utilizando-se hemácias de rato padronizadas a 2%. Na **Figura 8** ilustra a atividade das amostras submetidas à variação de pH. Essas amostras tiveram sua atividade hemaglutinante estáveis a uma ampla faixa de pH.

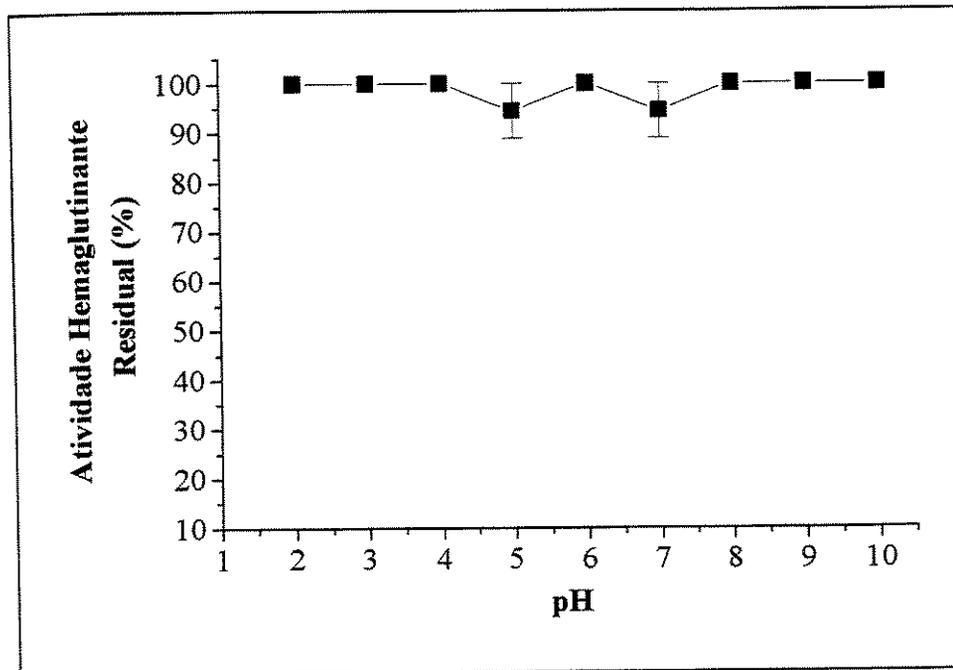


Figura 8: Efeito do pH na atividade hemaglutinante de ACLEC (20 μg). A atividade máxima (100%) corresponde ao título de 5. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.2 - Efeito da Temperatura na Atividade Hemaglutinante de ACLEC

A estabilidade de ACLEC (20 µg) em diferentes temperaturas foi realizada em banho-maria a uma variação de 37°C a 100°C por um período de 30 minutos. Após a paralização dos ensaios por banho de gelo, essas amostras tiveram sua atividade hemaglutinante analisadas por ensaios de hemaglutinação utilizando-se hemácias de rato padronizadas a 2%. A **Figura 9** ilustra a atividade das amostras submetidas à variação de temperatura. Essas amostras tiveram sua atividade hemaglutinante estável entre 37°C e 80°C, mas um decréscimo de 35% e 50% de sua atividade foi observada a partir de 90°C e 100°C, respectivamente.

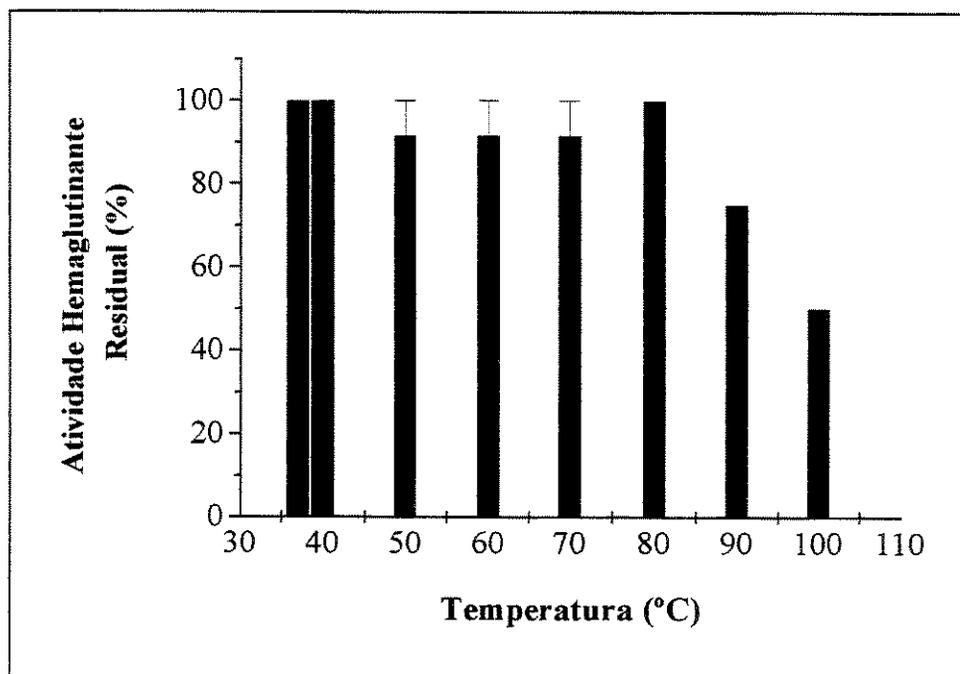


Figura 9: Efeito da temperatura na atividade hemaglutinante de ACLEC (20 µg). A atividade máxima (100%) corresponde ao título de 5. Os ensaios foram realizados em triplicatas.

4.3 - Efeito de Enzimas Proteolíticas na Atividade Hemaglutinante de ACLEC

O tratamento de ACLEC (20 µg) com a enzima proteolítica pronase (500µg/ml) e tripsina (100 µg/ml) foi realizada em banho-maria a 37°C por 30 minutos. A reação foi paralizada e teve seu pH, quando necessário, corrigido para 7,0. Essas amostras tiveram sua atividade analisada por ensaios de hemaglutinação utilizando-se hemácias de rato a 2%. A **Tabela IX** ilustra a atividade das amostras submetidas às enzimas proteolíticas, onde pôde constatar que a enzima pronase não possuiu efeito sobre a atividade hemaglutinante de ACLEC, diferentemente de quando tratada com a enzima tripsina a qual possui ação inibitória sobre a atividade hemaglutinante de ACLEC.

4.4 - Efeito de Íons Metálicos na Atividade Hemaglutinante de ACLEC

O tratamento de ACLEC (20 µg) com íons metálicos foi realizado pela incubação com EDTA (25 mM) e EGTA (25 mM) em placas de microtitulação em banho-maria a 37°C por 30 minutos, respectivamente. Após esse período foram adicionadas a esse ensaio cerca de 50 µl de hemácias de ratos padronizadas a 2%. A **Tabela IX** ilustra a análise da atividade das amostras tratadas, onde pudemos observar que a adição de EDTA e EGTA não possui efeito inibitório sobre a atividade hemaglutinante de ACLEC, ou seja, ACLEC não requer íons para a sua atividade hemaglutinante.

4.5 - Efeito do DTT e Uréia na Atividade Hemaglutinante de ACLEC

O tratamento de ACLEC (20 µg) com DTT (10 mM) e uréia (8 M) foi realizado em banho-maria a 25°C por 30 minutos. Ao término, a amostra tratada teve seu pH verificado, e quando necessário teve-o corrigido. Essas amostras tiveram sua atividade analisada por ensaio de hemaglutinação utilizando hemácias de rato padronizadas a 2%. A **Tabela IX** ilustra a análise da atividade das amostras tratadas, onde pudemos observar que

o tratamento com DTT e uréia não possuiu efeito inibitório sobre a atividade hemaglutinante de ACLEC.

4.6 - Efeito do Agente Oxidativo – Metariodato de Sódio - na Atividade Hemaglutinante de ACLEC

O tratamento de ACLEC (20 µg) com metaperiodato de sódio (10 mM), foi realizado à temperatura ambiente, desprovido de luz e por período de 10 min. Após esse período a amostra tratada teve seu pH, quando necessário, corrigido e em seguida dialisada contra 0,15 M NaCl. Posteriormente, a amostra tratada foi submetida a ensaio de hemaglutinação utilizando hemácias de rato padronizadas a 2%. A **Tabela IX** ilustra a análise da atividade da amostra tratada, onde pudemos observar que metaperiodato de sódio não possui ação inibitória sobre a atividade hemaglutinante de ACLEC. A análise da amostra ACLEC tratada com o agente oxidante foi monitorada por gel de poliacrilamida em presença de SDS (12,5%), pudemos constatar que o tratamento não influenciou na estrutura molecular e nem na mobilidade de ACLEC (**Figura 10, linha 2**).

4.7 - Efeito de Agentes Deglicosilantes na Atividade Hemaglutinante de ACLEC

O tratamento de ACLEC (20 µg) agentes deglicosilantes como TFMS e anisol (2:1) foi realizado em banho de gelo por um período de 2 horas, subseqüentemente essa amostra teve seu pH corrigido para 2,0 e em seguida dialisada contra 0,15 M de NaCl. A **Tabela IX** ilustra a análise da atividade da amostra tratada, onde pudemos observar que o agente deglicosilante possui ação inibitória sobre a atividade hemaglutinante de ACLEC. A análise da amostra tratada foi monitorada por gel de poliacrilamida em presença de SDS (12,5%), onde pudemos constatar que o tratamento promoveu modificações na estrutura molecular e na mobilidade de ACLEC tratada (**Figura 10, linha 3**).

Tabela IX: Efeito de diferentes compostos na atividade hemaglutinante de ACLEC.

TRATAMENTO	HEMAGLUTINAÇÃO
<i>Pronase</i>	+
<i>Tripsina</i>	-
<i>EDTA</i>	+
<i>EGTA</i>	+
<i>DTT</i>	+
<i>Uréia</i>	+
<i>Metaperiodato de Sódio</i>	+
<i>TFMS</i>	-

(+) atividade hemaglutinante (Título 5)
 (-) nenhuma atividade hemaglutinante

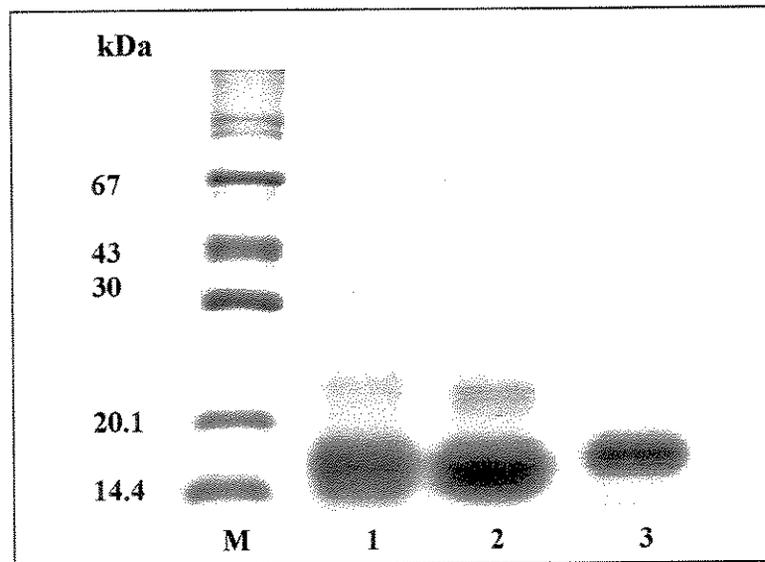


Figura 10: Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) de ACLEC (20 µg). Amostras: **M** – marcador de peso molecular; **1** – ACLEC em condições nativas; **2** – ACLEC tratada com metaperiodato de sódio; **3** – ACLEC tratada com TFMS.

5 - ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS

A lectina ACLEC foi submetida à hidrólise ácida (HCl 6M) e à derivatização para obtenção da composição global de aminoácidos ilustrados na **Tabela X**. A análise foi evidenciada pela alta ocorrência de arginina (Arg), glicina (Gly) e cisteína (Cys) em comparação com os outros aminoácidos. Além desses aminoácidos, ACLEC apresenta três resíduos de metionina (Met) e a ausência de fenilalanina (Phy). Os resíduos de triptofano (Trp) não foram detectados pelo processo empregado.

A comparação da composição de aminoácidos de ACLEC com outras lectinas de plantas foi realizada em banco de dados (<http://expasy.chc>) e identificou homologia entre ACLEC e outras lectinas conhecidas, como *Urtica dioica*, *Abrus precatorius*, *Aloe arborescens* e *Ricinus communis*.

Tabela X: Composição de aminoácidos de ACLEC

AMINOÁCIDOS	MOL DE AA/ MOL DE PROTEÍNA
<i>Asx</i>	8
<i>Glx</i>	39
<i>Ser</i>	8
<i>Gly</i>	10
<i>His</i>	1
<i>Arg</i>	20
<i>Thr</i>	4
<i>Ala</i>	3
<i>Pro</i>	2
<i>Tyr</i>	3
<i>Val</i>	5
<i>Met</i>	3
<i>Cys</i>	8
<i>Ile</i>	6
<i>Leu</i>	8
<i>Phe</i>	0
<i>Lys</i>	4
<i>Trp</i>	ND

ND: não determinado

6 - DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA N-TERMINAL

A **Tabela XI** evidencia a seqüência N-terminal da lectina ACLEC (subunidade 16 kDa) obtida de sementes de *A. coriacea*. A pesquisa em banco de dados das proteínas com seqüências já determinadas mostraram uma alta homologia de ACLEC com outras lectinas de plantas como *Robinia pseudoacacia*, *Cladrastis lutea*, *Maackia amurensis* e *Sophora japonica*.

Tabela XI: Alinhamento da lectina ACLEC (subunidade 16 kDa) seqüenciada de sementes de *A. coriacea* com outras lectinas de plantas. Os gaps (—) foram introduzidos para maximizar a homologia seqüencial. O alinhamento da estrutura primária foi realizado de acordo com meia cistina. Os resíduos numerados correspondem a sua posição relativa após o alinhamento.

LECTINA ^a	SEQÜÊNCIA						
	1	5	20	5	30	35	40
<i>ACLEC</i>	-	D N Q R S F S F N R F N A A P N E N D L L F Q G D A S V S S T					
<i>LECRPA1 α</i>	T G S L -	S F S F P K F A - -		P N Q P Y L I F Q R D A L V T S T			
<i>LecCIAI α</i>	S D S L -	S F T F N N F P - -		P N S E D L I F Q K D A S I S S N			
<i>MALBI</i>	S D E L -	S F T I N N F L - -		P N E A D L L F Q G E A S V S S T			
<i>LECMAB</i>	S D E L -	S F P I N N F V - -		P N E A D L H F Q G V A S V S P T			
<i>LECSJABMII α</i>	S D S L -	S F T F N N F G - -		P D Q R D L I L Q G D A H I P S G			

^aACLEC, lectina de *A. coriacea*; LECRPA1α, lectina de *Robinia pseudoacacia*; LecCIAIα, lectina de *Cladrastis lutea*; LECMAB e MALBI, lectina de *Maackia amurensis*; LECSJABMIIα, lectina da *Sophora japonica*

Área sombreada representa os aminoácidos conservados nas espécies.

7 - ENSAIOS BIOLÓGICOS

7.1 - Agregação Plaquetária

❖ *Ristocetina*

Inicialmente, ACLEC (2mg/70µl) foi incubada com o PRP onde pode-se observar que a lectina não induziu a agregação plaquetária (canal 2). Após 4 minutos, foram adicionados em ambos os canais, o agonista ristocetina (2mg/ml). O canal 1, representa o controle da agregação plaquetária apenas com o agonista e o canal 2 possui a lectina ACLEC juntamente com o agonista (**Figura 11**) e pudemos observar a agregação plaquetária em todos os canais. O teste de agregação plaquetária realizado com ACLEC mostrou que esta lectina não induz a agregação plaquetária diretamente e também não inibe agregação plaquetária induzida por ristocetina.

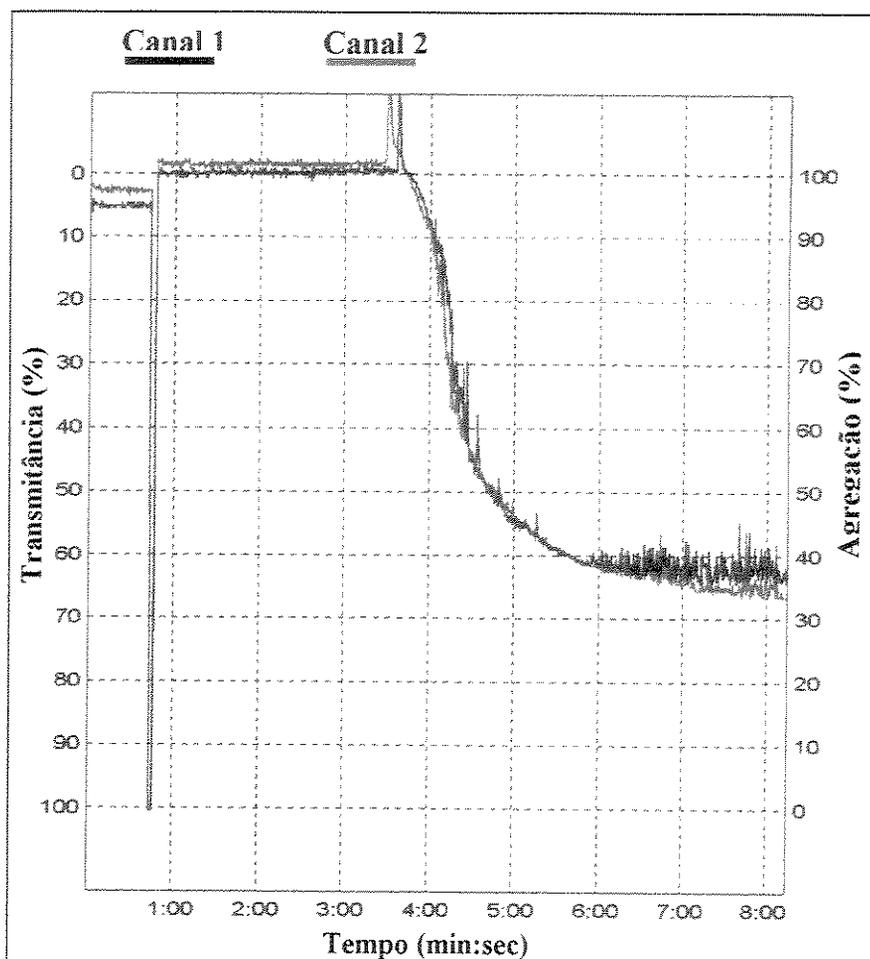


Figura 11: Efeito da ACLEC no processo de agregação plaquetária induzido por ristocetina. **Canal 1:** suspensão de plaquetas lavadas na presença de ristocetina (2 mg/ml). **Canal 2:** suspensão de plaquetas lavadas na presença de ristocetina (2 mg/ml) e ACLEC (2 mg/ 70 μ l).

❖ COLÁGENO

Inicialmente, ACLEC (2mg/70µl) foi incubada com o PRP onde pode-se observar que a lectina não induziu a agregação plaquetária (canal 2). Após 4 minutos, foram adicionados em ambos os canais, o agonista colágeno (1mg/ml). O canal 1, representa o controle da agregação plaquetária apenas com o agonista e o canal 2 possui a lectina ACLEC juntamente com o agonista (**Figura 12**) e pudemos observar a agregação plaquetária em todos os canais. O teste de agregação plaquetária realizado com ACLEC mostrou que esta lectina não induz a agregação plaquetária diretamente e também não inibe agregação plaquetária induzida por colágeno.

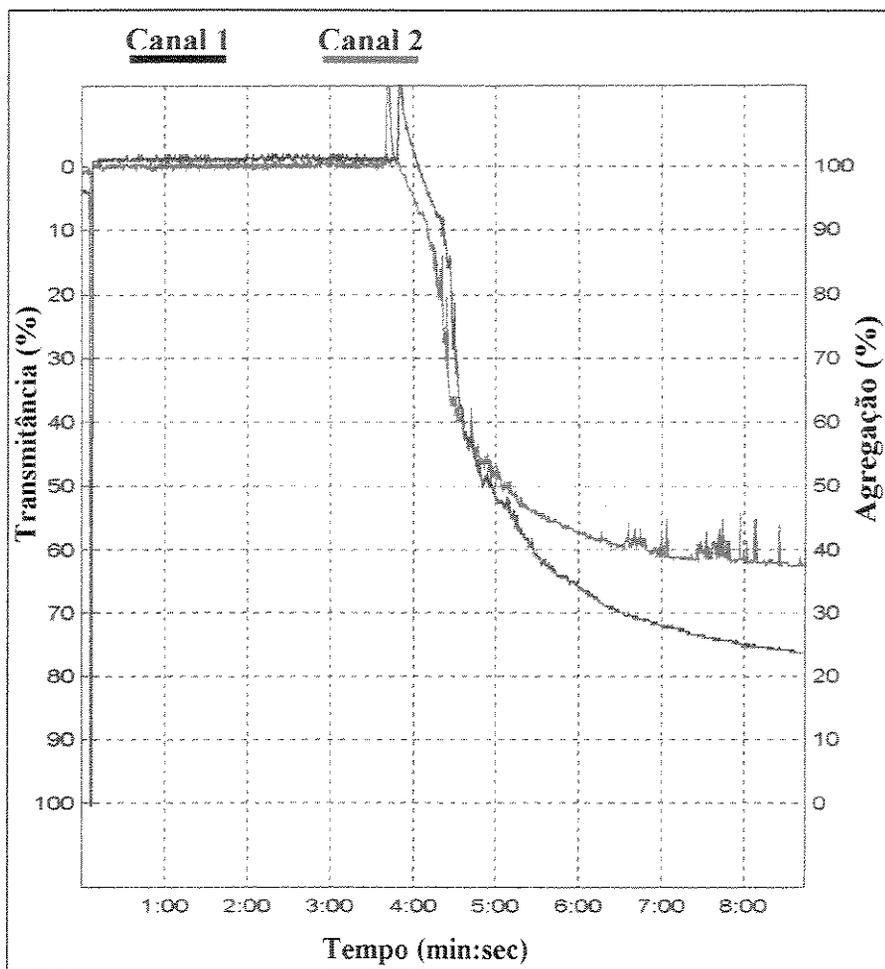


Figura 12: Efeito de ACLEC no processo de agregação plaquetária induzido por colágeno. **Canal 1:** suspensão de plaquetas lavadas na presença de colágeno (1 mg/ml). **Canal 2:** suspensão de plaquetas lavadas na presença de colágeno (1 mg/ml) e ACLEC (2 mg/ 70µl).

4.2 - Fungos

ACLEC teve sua propriedade testada em relação à inibição ou não do crescimento de alguns fungos como *Colletrichium musae*, *Colletrichium lindemuthianum*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Fusarium oxysporum* (Figura 13). Pelo gráfico abaixo, podemos concluir que ACLEC (800 µg/ml) não possuiu uma atividade inibitória satisfatória em relação ao desenvolvimento desses fungos até um período de 44 horas.

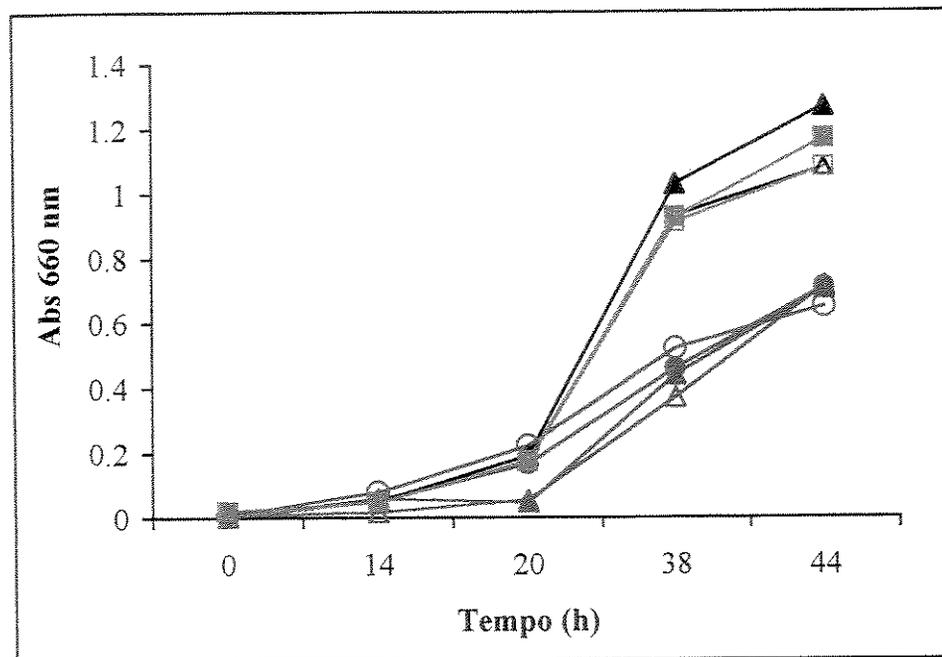


Figura 13: Efeito de ACLEC no crescimento de *C. musae*, *C. lindemuthianum*, *S. cerevisiae* e *F. oxysporum*. Controle de *C. musae* (△), ACLEC + *C. musae* (▲), Controle de *C. lindemuthianum* (○), ACLEC + *C. lindemuthianum* (●), Controle de *S. cerevisiae* (▽), ACLEC + *S. cerevisiae* (▲), Controle de *F. oxysporum* (□), ACLEC + *F. oxysporum* (■). Os experimentos foram realizados em triplicata e a avaliação das leituras, os erros padrões e coeficientes de variação foram calculados. A leitura foi realizada a 660 nm.

4.3 – Coleóptera: *C. maculatus*

A lectina ACLEC foi incorporada em sementes artificiais aos níveis de 0,1, 0,5, 1,0, 2,0 e 3,0% e oferecidas as fêmeas do coleóptera *Callosobruchus maculatus*. Os resultados de incorporações de ACLEC sobre o desenvolvimento do inseto supramencionado estão evidenciados nas **Figuras 14 e 15**. Observou-se uma redução das larvas sobreviventes de aproximadamente 28% quando em concentração de 1% e aproximadamente 35% quando em concentrações de 2% e 3% de ACLEC. Uma redução também foi observada quanto ao peso médio dessas larvas sobreviventes, cerca de aproximadamente 19% quando em concentrações de 2,0 e 3,0%.

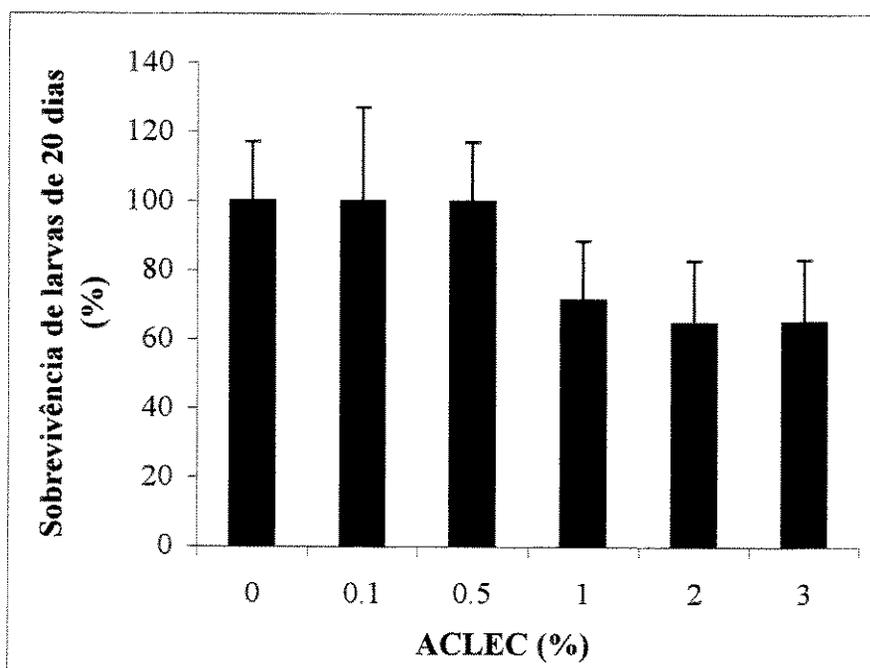


Figura 14: Sobrevivência de larvas de *C. maculatus* de 20 dias em sementes artificiais contendo quantidades crescentes da lectina ACLEC. Sementes controle contendo somente farinha de sementes de *Vigna unguiculata* (variedade setentão). Cada semente apresentava 4 ovos.

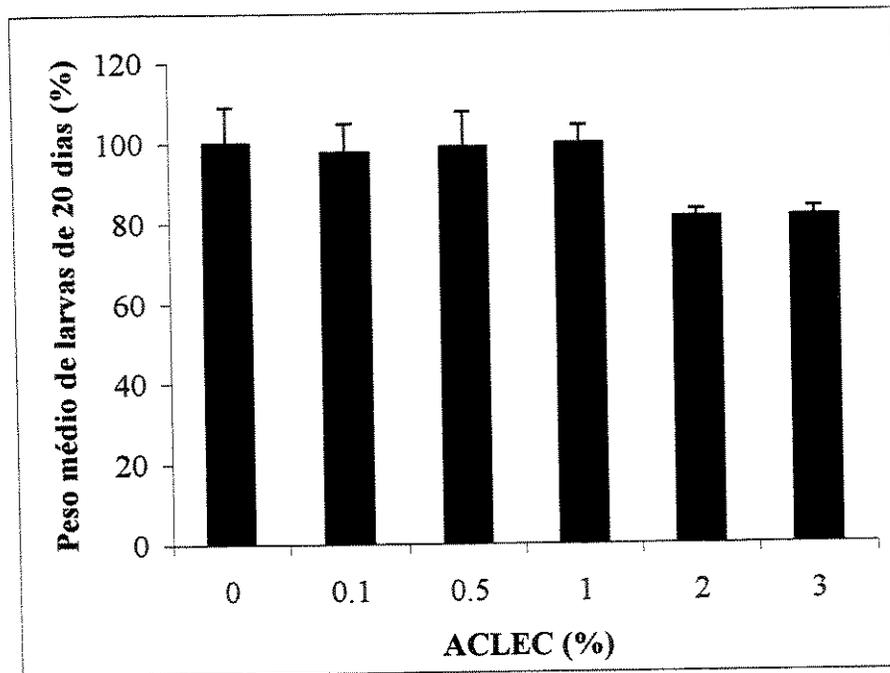


Figura 15: Peso médio de larvas de *C. maculatus* de 20 dias em sementes artificiais contendo quantidades crescentes da lectina ACLEC. Sementes controle contendo somente farinha de sementes de *Vigna unguiculata* (variedade setentão). Cada semente apresentava 4 ovos.

4.3 - Lepidóptera: *A. kuehniella*

A lectina ACLEC foi incorporada na dieta artificiais aos níveis de 0,5, 1,0, e 2,0% e oferecidas as larvas do lepidóptera *Anagasta kuehniella*. Os resultados das incorporações de ACLEC sobre o desenvolvimento do inseto acima mencionado estão evidenciados nas **Figuras 16 e 17**. Observou-se um efeito deletério tanto sobre o número de larvas sobreviventes quanto sobre o seu peso médio com uma redução de 50% a partir de 1% de incorporação, evidenciando um alto efeito tóxico de ACLEC sobre essas larvas. Na **Figura 18** está ilustrado o efeito de ACLEC no comprimento dessas larvas sobreviventes comparadas com o controle.

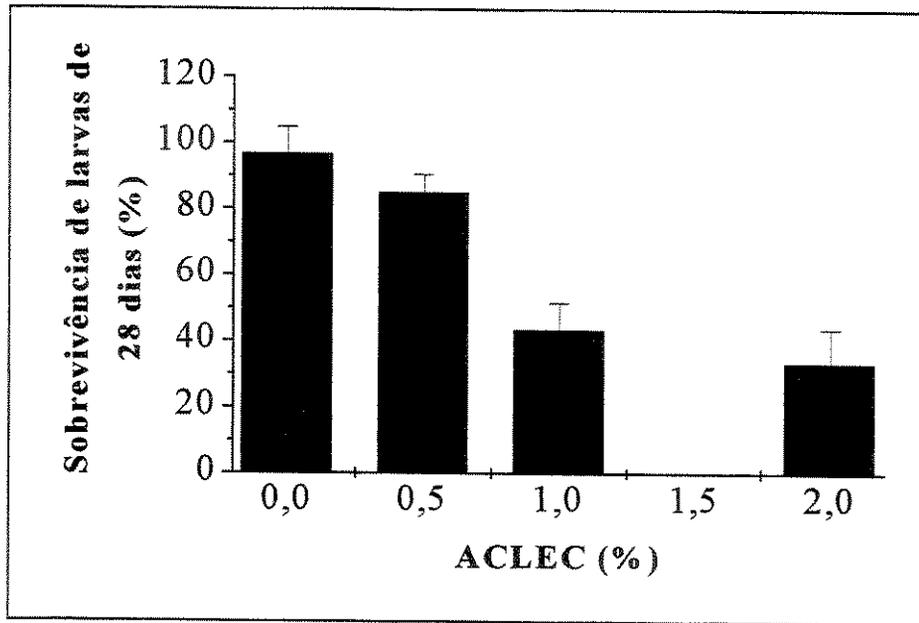


Figura 16: Número de larvas sobreviventes de larvas de *A. kuehniella* em dietas artificiais contendo quantidades crescentes da lectina ACLEC e em dieta controle. Para cada experimento foram deixados 5 ovos.

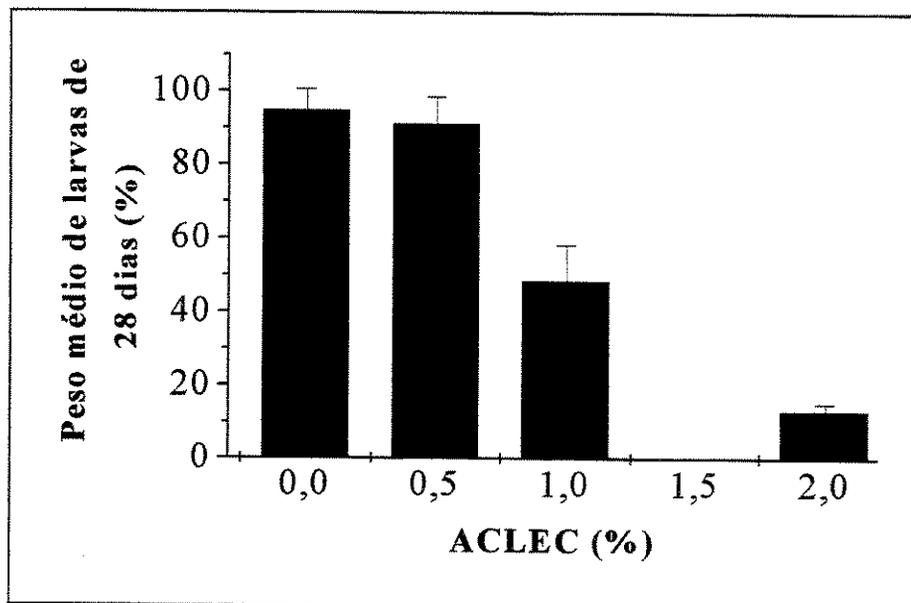


Figura 17: Peso médio das larvas sobreviventes de larvas de *A. kuehniella* em dietas artificiais contendo quantidades crescentes da lectina. Para cada experimento foram deixados 5 ovos.

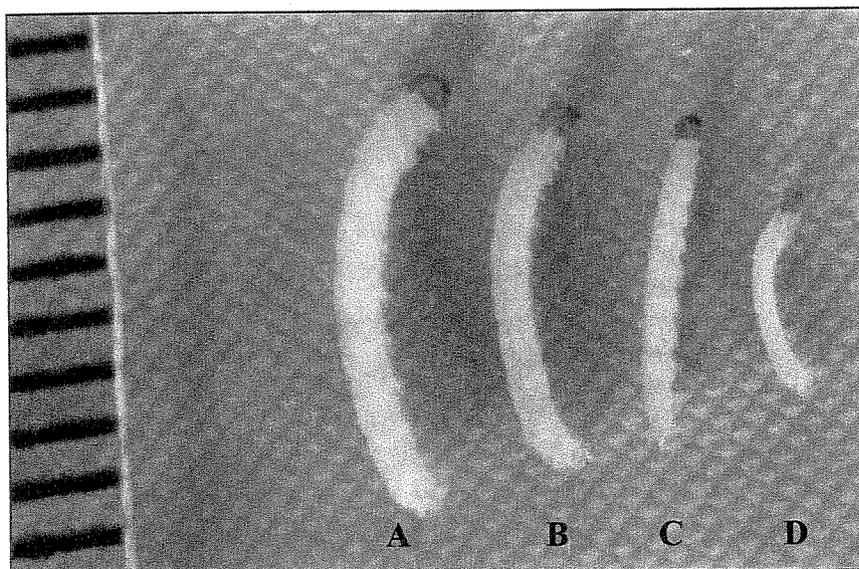


Figura 18: Efeito inibitório de ACLEC sobre larvas de *A. kuehniella* em dietas artificiais contendo quantidades crescentes da lectina. Amostras: **A** – larvas controle; **B** – 0,5% de ACLEC; **C** – 1% de ACLEC, **D** – 2% de ACLEC.

VI - DISCUSSÃO

Lectinas são uma classe de proteínas ou glicoproteínas estruturalmente diversas, apresentando como característica comum à capacidade de ligar-se a carboidratos, específica e reversivelmente, bem como aglutinar eritrócitos (Van Damme *et al.*, 1998).

Embora as lectinas tenham sido identificadas e caracterizadas de várias espécies de plantas e tipos de órgãos, a maior contribuição para o nosso entendimento de suas propriedades, têm sido pelo estudo de lectinas de sementes de leguminosas (Sharon *et al.*, 1990).

O interesse em lectinas de sementes pode também ser atribuído à grande importância das leguminosas como fonte de proteínas para a dieta humana e animal. Embora os níveis de lectinas em sementes de legumes sejam em torno de 0,1-5,0% do total de proteínas nas sementes, o valor em torno de 50% tem sido relatado em algumas espécies tais como no gênero *Phaseolus* (Puzstai *et al.*, 1977).

Até o presente, detalhou-se o conhecimento molecular e as propriedades bioquímicas e físico-químicas de várias lectinas, seus carboidratos ligantes, incluindo açúcar, especificidade e suas aplicações na agricultura e em pesquisas biomédicas (Van Damme *et al.*, 1998), além de suas variadas funções biológicas como, atividade viral, fungicida, inseticida e bactericida.

Em virtude das vastas informações hoje conhecidas, sobre os vários tipos de lectinas encontradas nas mais variadas espécies de plantas, tivemos por objetivo analisar sementes de uma espécie característica do cerrado pertencente à família Annonaceae da espécie *Annona coriacea*, mais comumente conhecida como Marolo.

A extração das lectinas de *A. coriacea* foi realizada a partir da farinha tratada com hexano. O tratamento com hexano permitiu diminuir o efeito da gordura presente em alta concentração nessas sementes e que poderiam interferir nas etapas de purificação subsequente, sem prejuízo para a atividade hemaglutinante.

Essa farinha após seca foi submetida à extração, utilizando tampão fosfato de potássio monobásico 0,1 M, pH 7,6, para a obtenção de lectinas. Outros tipos de soluções também são utilizados para a extração de lectinas, como: soluções salinas (Cavada *et al.*, 1998, Machuka *et al.*, 1999a) e precipitação por sulfato de amônio (Moreira *et al.*, 1998). A solução de extração dessas proteínas, assim como o tampão de eluição foi determinado para a preservação da propriedade biológica.

O mais simples caminho para a detecção de lectina é através de sua habilidade em hemaglutinar ou precipitar glicoconjugados. A atividade hemaglutinante pode ser acentuada, em alguns casos, pelo tratamento das células com enzimas proteolíticas e/ou neuraminidases (Moreira *et al.*, 1991).

Mediante ensaios de hemaglutinação com extrato bruto de sementes de *A. coriacea*, observamos uma atividade hemaglutinante para hemácias humanas e de várias espécies animais.

A propriedade hemaglutinante de EB tornou-se evidenciada para todos os tipos sangüíneos do sistema ABO (**Tabela IV**), do mesmo modo como em lectinas de *Artocarpus hirsuta* (Gurjar *et al.*, 1998) e em *Ricinus communis* (Lin *et al.*, 1980). A atividade hemaglutinante de ACLEC, assim como a lectina de *Artocarpus incisa* (Moreira *et al.*, 1998), teve sua atividade evidenciada para vários eritrócitos animais (**Tabela V**), observando uma atividade hemaglutinante para todos os eritrócitos utilizados, porém, EB possui maior especificidade para os eritrócitos de caprino.

Com esses resultados obtidos com o EB, etapas de purificação foram realizadas através de métodos clássicos, como coluna de exclusão molecular (Sephadex G-75) e coluna de fase-reversa (sistema HPLC).

As colunas de gel filtração têm sido um dos principais passos utilizados por alguns autores na purificação de algumas lectinas de plantas (Padma *et al.*, 1999; Cavada *et al.*, 2000) assim como a utilização de outros tipos de resinas como colunas de troca iônica (Wang *et al.*, 1999). Dessa forma, a purificação de ACLEC foi inicialmente realizada pela utilização de coluna de gel filtração Sephadex G-75, da qual foram eluídos três picos protéicos (**Figura 4**) e analisada a atividade hemaglutinante destas frações. Os resultados

indicaram que apenas os dois primeiros picos de proteínas, em sua forma líquida, apresentaram atividade. Porém, apenas o segundo pico, o qual foi denominado ACL-2, foi escolhido para posterior estudo, devido a sua alta atividade hemaglutinante e pureza (**Figura 6, Linha 2**). Esse método de purificação mostrou-se muito eficiente para a purificação de ACLEC.

O processo em cromatografia de fase reversa tem sido utilizado para a purificação de muitas lectinas como as lectinas presentes em *Araucaria brasiliensis* (Datta *et al.*, 1991), *Phaseolus acutifolius* (Pratt *et al.*, 1990), *Talisia esculenta* (Freire *et al.*, 2001) e isolectinas de gérmen de trigo (Huesing *et al.*, 1991). Esse processo de purificação tem apresentado um alto grau de pureza das 7lectinas, cerca de 90%, além da atividade hemaglutinante permanecer estável ou até mais evidente. Entretanto, várias lectinas perdem sua atividade quando submetidas a esse tipo de cromatografia devido à ação do acetonitrila.

Para a purificação de uma das lectinas de *A. coriacea*, ACL-2, realizou-se uma cromatografia em coluna de fase reversa μ -Bondapak C18. A cromatografia de fase reversa utilizando um gradiente linear confirmou a presença de apenas um pico de proteína (**Figura 5**) eluído com 46% de acetonitrila e que foi denominado ACLEC. Após liofilização, ACLEC teve sua atividade hemaglutinante testada, onde observou que esta lectina permaneceu estável em sua atividade.

A análise da pureza da lectina ACLEC de *A. coriacea* obtida pelos processos de purificação acima descritos foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS 12,5% (**Figura 6**), onde podemos avaliar a homogeneidade da amostra ACLEC obtida nas duas etapas de purificação (cromatografia de exclusão molecular em coluna Sephadex G-75 e cromatografia de fase reversa-HPLC). A fração proveniente da coluna de exclusão molecular (**Linha 2**) da mesma maneira como a fração obtida da coluna de fase reversa (**Linha 3**) apresentaram duas bandas de pesos moleculares de 21,6 kDa e 16 kDa, respectivamente. A fração ACLEC quando em presença de agente redutor, DTT 1 M, apresentou as duas bandas de proteínas com massas moleculares 16 kDa e 11,4 kDa (**Linha 4**). Esses resultados sugerem que ACLEC trata-se de um Heterodímero e que a

subunidade de 21,6 kDa é formada por duas cadeias de peso molecular em torno de 11 kDa ligadas covalentemente.

A massa molecular de ACLEC, de 12 kDa, foi determinada por filtração em gel em coluna Superdex G-75 (sistema FPLC) calibrada com vários marcadores com pesos moleculares variando entre 200-12,4 kDa (**Figura 7**), apresentando-se com um peso molecular menor do que o esperado para um heterodímero. Esse fenômeno é comum na determinação da massa molecular de lectinas vegetais. Lectina de bulbos de *Dutch Iris* (Mo *et al.*, 1994) apresentou esse mesmo comportamento demonstrado pela ACLEC. A lectina de Íris é uma proteína de 27 e 34 kDa, determinado por SDS-PAGE, mas que em gel de filtração apresentou uma massa molecular de 45 kDa. Esse comportamento pode ser devido às interações hidrofóbicas entre a lectina e o gel da matrix, fato bastante comum em lectinas vegetais (Mo *et al.*, 1994; Moreira *et al.*, 1997; Moreira *et al.*, 1998).

A determinação do conteúdo de carboidrato em ACLEC foi realizado pelo método de Dubois *et al.* (1956) onde constatou a presença de 3,8% de carboidrato nesta fração. A baixa concentração de carboidrato observada em ACLEC, também foi obtida em algumas lectinas de plantas como em *Araucaria brasiliensis* (2,9%) (Datta *et al.*, 1991), *Maackia amurensis* (2,9%) (Van Damme *et al.*, 1997a) e em lectinas de *Artocarpus hirsuta* (6,25%) (Gurjar *et al.*, 1998).

Assim como em lectinas de *Trichosanthes anguina* (Komath *et al.*, 1996) e *Phaseolus acutifolius* (Pratt *et al.*, 1990), a propriedade hemaglutinante de ACLEC foi analisada por ensaios de hemaglutinação utilizando-se hemácias humana (sistema ABO) as quais foram padronizadas a 2%. Os resultados observados na **Tabela VI** mostram uma grande afinidade desta fração protéica por todos os tipos sanguíneos humanos testados. A análise da atividade de ACLEC utilizando-se hemácias animais (**Tabela VII**) padronizadas a 2%, também mostrou uma especificidade para todas as hemácias de animais utilizadas, mas apresentou uma maior especificidade para hemácias de caprino. A existência de uma especificidade distinta por eritrócitos entre as lectinas, condiz diretamente a sua propriedade funcional (Pratt *et al.*, 1990).

Uma das principais características desta classe de proteínas é a habilidade e especificidade em interagir-se com carboidratos, e assim, combinar-se com glicocomponentes da superfície celular (Moreira *et al.*, 1997). A determinação desta especificidade a carboidratos é realizada pelo método de inibição da atividade hemaglutinante utilizando-se uma série de monossacarídeos e dissacarídeos, comparando os açúcares com base da mínima concentração para que ocorra a inibição da atividade hemaglutinante ou reação de precipitação (Moreira *et al.*, 1990). Este método é semiquantitativo, e pode proporcionar informações quanto à habilidade relativa de vários sacarídeos em inibir a atividade de lectinas (Padma *et al.*, 1999).

A especificidade de ACLEC por carboidrato foi analisada utilizando-se onze tipos de carboidratos, ilustrados na **Tabela VIII**. Os resultados obtidos através de ensaio de hemaglutinação demonstraram que a atividade hemaglutinante de ACLEC foi inibida por quase todos os carboidratos utilizados. Os carboidratos rafinose e sacarose não foram capazes de inibir a atividade hemaglutinante de ACLEC em uma concentração de 100 mM. Os carboidratos mais potentes para a inibição da atividade hemaglutinante de ACLEC foram D-glicose e D-manose a uma concentração de 0,39 mM, sugerindo que ACLEC pertença a classificação das lectinas específicas a manose/glicose como classificado por Peumans *et al.* (1998), como lectinas de *Dioclea altissima* (Moreira *et al.*, 1997), *Canavalia ensiformes*, *Dioclea grandiflora*, *Cratylia mollis* (Peumans *et al.*, 1998). Através da afinidade existente de ACLEC por quase todos os carboidratos testados podemos concluir que a lectina de *Annona coriacea* (ACLEC) possui uma variedade de sítios combinantes de carboidratos, os quais mediam a hemaglutinação, porém com maior especificidade para manose e glicose (Moreira *et al.*, 1997; Koike *et al.*, 1995).

A caracterização físico-química de ACLEC foi realizada utilizando variação de temperatura e pH, enzimas proteolíticas, íons metálicos, agentes desnaturantes como uréia e DTT, metaperiodato de sódio e deglicosilação por TFMS também estão sendo realizados para a determinação da estrutura e estabilidade de muitas lectinas.

A estabilidade de ACLEC a diferentes condições de pH é notavelmente estável a uma ampla faixa de pH 2,0-10,0 (**Figura 8**), sugerindo assim, grande resistência a

extremos de pH. Resultados similares foram obtidos com lectinas de *Araucaria brasiliensis* (Datta *et al.*, 1991), *Artocarpus lakoocha* (Wongkham *et al.*, 1995) e *Viscum album* (Peumans *et al.*, 1996) que permaneceram estáveis a extremos de pH.

A estabilidade térmica de ACLEC é ilustrada na **Figura 9**, onde às mudanças na atividade específica é demonstrada. A lectina de *A. coriacea*, ACLEC, assim como em lectina de *Vatairea macrocarpa* (Cavada *et al.*, 1998) e *Talisia esculenta* (Freire *et al.*, 2001), apresentam-se relativamente estáveis ao aquecimento de 37°-80°C. A redução da atividade hemaglutinante de ACLEC é observada a 90°C e 100°C, com um decréscimo de 35% e 50%, respectivamente.

Em algumas lectinas de *Escherichia coli* (Bhuiyan *et al.*, 1995) e em *Sphenostyles stenocarpa* (Machuka *et al.*, 1999a), a adição de proteases como pronase e tripsina afetou a atividade hemaglutinante dessas lectinas. O tratamento com proteases é utilizado para clivar glicoproteínas em peptídeos sem afetar a estrutura do carboidrato, resultando em oligopeptídeos (Gilg *et al.*, 1996). Desse modo, as enzimas proteolíticas pronase e tripsina foram utilizadas na atividade hemaglutinante de ACLEC e os resultados ilustrados na **Tabela IX** indicam que apenas a enzima proteolítica tripsina inibiu a hemaglutinação induzida por ACLEC diferentemente do observado no tratamento de ACLEC com a enzima proteolítica pronase, a qual não inibiu a atividade hemaglutinante. Estes resultados mostram que a tripsina é mais eficiente para a clivagem e inibição da atividade hemaglutinante de ACLEC, assim como observado em algumas plantas (Machuka *et al.*, 1999) e bactérias (Mouton *et al.*, 1989).

Várias classes de lectinas requerem íons divalentes para a sua atividade hemaglutinante, como os íons Ca^{2+} e Mn^{2+} , as quais utilizam estes íons para estabilizar os sítios ligantes com os açúcares ligantes (Weis *et al.*, 1996). Porém, o tratamento da proteína nativa com esses ácidos promove a remoção dos íons metálicos além de destruir a habilidade dessas proteínas em ligar-se a carboidratos (Sharon *et al.*, 1990), sendo um processo reversível.

Analisando a atividade hemaglutinante de algumas lectinas como em *Cajanus cajan* (Ahmad *et al.*, 1999) e *Dioclea altissima* (Moreira *et al.*, 1997) relacionada com a

necessidade de íons para sua atividade (metaloproteínas), ensaios com a lectina (ACLEC) também foram realizados utilizando-se EDTA (25 mM) e EGTA (25 mM). Os resultados, ilustrados na **Tabela IX**, mostram que a incubação desses íons com ACLEC, não promovem a inibição da atividade hemaglutinante de ACLEC, ou seja, não ligam ao domínio da lectina. ACLEC assim como em lectinas de *Artocarpus incisa* (Moreira *et al.*, 1998) e *Artocarpus lakoocha* (Wongkham *et al.*, 1998), classificando-as como proteínas não dependentes de íons metálicos.

Juntamente com os demais agentes utilizados para a caracterização físico-química de ACLEC, foram utilizados agentes redutores como DTT (10 mM) e uréia (8 M) (**Tabela IX**), esses agentes redutores possuem a capacidade de clivar as pontes dissulfeto e as pontes de hidrogênio, respectivamente. A lectina ACLEC quando tratada com o agente redutor DTT (10 mM) não perdeu a sua atividade hemaglutinante, sugerindo que a sua resistência esteja relacionada com a presença de pontes dissulfeto intra-cadeia ou que as pontes afetadas pela redução estejam relativamente distantes do sítio ativo da lectina (Lehle *et al.*, 1996). Do mesmo modo, quando ACLEC foi tratada com uréia (8 M), esse agente redutor não influenciou na atividade hemaglutinante da lectina, sugerindo que a interação entre as pontes de hidrogênio presentes na proteína não parece ser essencial para a sua atividade hemaglutinante.

O tratamento oxidativo de lectinas utilizando como agente oxidante metaperiodato de sódio tem sido descrito por alguns autores como Bhuiyan e colaboradores (1995), o qual utilizando-se lectina presente em bactéria *E. coli* demonstrou através de ensaios de hemaglutinação que esse agente oxidante não influenciava na atividade da lectina. Da mesma maneira, outros ensaios utilizando o mesmo agente oxidante foram realizados com lectina de *Staphylococcus epidermis* (Rupp *et al.*, 1995) e novamente foi demonstrado a ineficiência desse agente. Outros estudos relacionados com oxidação de carboidratos com metaperiodato de sódio estão sendo utilizados para avaliar uma provável antigenicidade do carboidrato presente na molécula, como em glicoproteínas de *Taenia solium* onde a antigenicidade de algumas de suas glicoproteínas foram diminuídas (Obrégon-Henao *et al.*, 2001).

Seguindo o mesmo tratamento, a lectina purificada de *Annona coriacea*, ACLEC, foi submetida à oxidação pelo mesmo agente oxidante. Através do ensaio de hemaglutinação observou-se que este agente oxidante não foi eficiente na inibição da atividade hemaglutinante de ACLEC (**Tabela IX**). Com todas essas informações pode-se concluir que as glicoproteínas que não tenham sua atividade hemaglutinante afetadas por metaperiodato de sódio possam ter na sua parte protéica o agente responsável pela atividade hemaglutinante (Mouton *et al.*, 1989). Para comprovação da análise obtida pelo ensaio de hemaglutinação, ACLEC tratada com o agente oxidante foi analisada em gel de poli-acrilamida em presença de SDS (12,5%) (**Figura 10**) juntamente com a proteína nativa (**Linha 1**), pudemos observar que ACLEC tratada (**Linha 2**) realmente não teve sua estrutura e mobilidade afetada pelo agente oxidante. A partir destes resultados, podemos concluir que ACLEC é resistente a oxidação por metaperiodato, ou seja, os carboidratos N-ligantes não foram fragmentados pela ação do agente oxidante. Podemos nos encorajar em dizer que a atividade da lectina não foi afetada pelo tratamento oxidativo ou pela pouca ou nenhuma presença de grupamentos glicol, já que a suscetibilidade dos carboidratos ao metaperiodato varia de acordo com a presença de grupos glicol em suas vizinhanças (Obrégon-Henao *et al.*, 2001).

A deglicosilação de glicoproteínas é necessária para numerosos estudos, tais como a determinação estrutural do grupo polipeptídico, estabilização da estrutura e função dos carboidratos (Sojar *et al.*, 1987). O reagente químico na sua forma anidra, ácido trifluorometanosulfônico (TFMS), tem sido empregado para a deglicosilação. O reagente tem por característica hidrolizar as ligações glicosídicas que envolve os açúcares neutros mais do que daqueles que envolvam N-acetilhexosamina. De maneira a impedir qualquer reação secundária, tal como a alquilação das ligações polipeptídicas durante a deproteção dos grupamentos, foi empregado como reagente secundário uma base, anisol (Sojar *et al.*, 1987).

A lectina ACLEC foi submetida a deglicosilação utilizando TFMS e anisol (2:1, v/v) como agentes deglicosilantes. Através de ensaio de hemaglutinação constatou-se que esse tratamento inibiu a atividade hemaglutinante da lectina (**Tabela IX**). Para

comprovação do resultado obtido pelo ensaio de hemaglutinação, ACLEC tratada foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS (12,5%) juntamente com a ACLEC em sua forma nativa (**Figura 10**). Por análise do SDS-PAGE podemos concluir que o tratamento de deglicosilação de ACLEC promoveu uma modificação estrutural assim como na heterogeneidade aparente, resultando em uma pequena diminuição na mobilidade da lectina (**Linha 3**), quando comparada com ACLEC nativa (**Linha 1**) e a redução do número de bandas protéicas. Essa redução de bandas em ACLEC tratada com TFMS é devido à remoção dos resíduos de carboidratos que poderiam estar constituindo a maior porção da banda protéica de alto peso diferentemente da banda de baixo peso a qual sofreu apenas uma diminuição da mobilidade (Karp *et al.*, 1982), indicando que ACLEC teve sua conformação e afinidade mudada pela utilização desses agentes deglicosilantes. Este comportamento difere da lectina de *Aspergillus nidulans* (Chen *et al.*, 1996) e na deglicosilação de algumas glicoproteínas (Edge *et al.*, 1981) as quais possuem além de modificação estrutural apresentam um decréscimo na massa molecular.

Na análise de ACLEC, o valor do triptofano não foi detectado pelo processo utilizado. A composição global dos aminoácidos, apresentados na **Tabela X** evidencia alta presença de resíduos de Arg e Gly, além de Cys e três resíduos de Met. O aminoácido histidina apresenta-se em baixa quantidade e os resíduos do aminoácido fenilalanina não se mostram presentes em ACLEC. Os demais aminoácidos apresentam-se em uma baixa concentração. ACLEC apresentou uma composição semelhante à de *Urtica dioica* (Beintema *et al.*, 1992), *Abrus precatorius* (Chen *et al.*, 1992), *Aloe arborescens* (Koike *et al.*, 1995) e *Ricinus communis* (Lin *et al.*, 1980).

A análise do N-terminal da lectina ACLEC obtida de sementes de *Annona coriacea* (subunidade 16 kDa), teve sua homologia comparada com a de outras lectinas de plantas pela utilização de bancos de dados eletrônicos. A seqüência do N-terminal obtida de ACLEC (**Tabela XI**) apresentou alta quantidade de resíduos conservados com regiões de outras lectinas de plantas de seqüência já determinada (LECRPA1 α , LecCIA1 α , MALBI, LECMAHB, LECSJABMII α).

ACLEC evidenciou em seu N-terminal a seqüência de: **DNQRSFSFNRFNAA-PNENDLLFQGDASVSST**. Esta seqüência mostra homologia em torno de 50% com algumas lectinas reportadas na literatura, tal como *Robinia pseudoacacia* (Van Damme *et al.*, 1995a; Yoashida *et al.*, 1994), *Maackia amurensis* (Van Damme *et al.*, 1997a), *Cladrastis lutea* (Van Damme *et al.*, 1995b) e em *Sophora japonica* (Van Damme *et al.*, 1997b) (**Tabela XI**). A conservação de alguns resíduos de aminoácidos e a presença dos resíduos R(5), A(14) e A(15) em ACLEC, os quais são ausentes em outras lectinas, indica uma diferenciação evolucionária desta espécie. Estes resultados oferecem compreensão da evolução aumenta as informações em relação às plantas de cerrado.

As lectinas, as quais se ligam a receptores específicos em eritrócitos, linfócitos e uma variedade de outras células, causam a aglutinação dessas células ou levam a proliferação dos linfócitos (Ganguly *et al.*, 1980). ACLEC foi analisada quanto ao seu efeito em induzir ou inibir a agregação plaquetária induzida por Ristocetina e por Colágeno. Nas **Figuras 11 e 12**, estão ilustrados os resultados obtidos com os agentes agonistas Ristocetina e Colágeno, respectivamente. Nos testes de agregação plaquetária ACLEC, assim como lectina de lentilha (Ganguly *et al.*, 1980), não teve ação sobre a agregação em células lavadas. Quando em presença dos agonistas Ristocetina (2 mg/ml) e Colágeno (1mg/ml), ACLEC foi incapaz de inibir a agregação promovidas por esses agonistas, em uma concentração de 2 mg/ 70 µl. Dados diferentes dos encontrados para ACLEC, tem sido apresentados em lectinas de *Phaseolus coccineus*, *Ricinus communis* e aglutinina do germen de trigo (Greenberg *et al.*, 1974), as quais promovem a agregação plaquetária.

Devido às atividades biológicas das lectinas ou lectina-like estarem ligadas a inibição do crescimento de fungos (Gozaia *et al.* 1993; Verheyden *et al.* 1995), como a aglutinina de *Urtica dioica* (Broekaert *et al.*, 1989) e a do germen de trigo (WGA) que inibem o crescimento *in vitro* de alguns fungos, ACLEC foi incubada em meio de cultura juntamente com os fungos *Colletotrichum lindemuthianum*, *Colletotrichum musae*, *Fusarium oxysporum* e *Saccharomyces cerevisiae* para a determinação de sua atividade fungicida. Com os resultados obtidos na **Figuras 13**, podemos concluir que ACLEC não

possui um efeito inibitório, ou seja, não afeta o crescimento dos fungos, assim como observado em uma proteína heveína-like de *Sambucus nigra* (Van Damme *et al.*, 1999) e em lectina de *Pisum sativum* L. (Ye *et al.*, 2001).

Entre os fatores de defesa de plantas, há grandes evidências que as lectinas proporcionam a defesa destas contra insetos e outros herbívoros. O papel potencial das lectinas no controle de insetos tem sido realizado por experimentos utilizando sementes ou dietas artificiais contendo preparações de lectinas as quais são incorporadas na dieta e sementes ou aplicadas topicamente (Peumans *et al.*, 1995).

Diante do exposto, a lectina ACLEC foi incorporada em sementes artificiais a variadas concentrações e oferecidas ao coleoptera *C. maculatus*. O estudo revelou que a lectina ACLEC não exerce um efeito tóxico significativo sobre o número de larvas sobreviventes (**Figura 14**) ou peso médio (**Figura 15**) a concentração de até 3%. Podendo apenas ter um efeito antinutricional para esses insetos. Resultados similares também têm sido obtidos pela utilização de lectinas de *Glycine max*, *Vicia villosa* e *Dolichos biflorus* (Murdock *et al.*, 1990) quando oferecidas a esse bruquídeo como dieta artificial com uma concentração de 1% de cada lectina. Diferentemente, as lectinas de *Triticum aestivum*, *Solanum tuberosum*, *Datura stramonium* e *Arachis hypogaeae* (Murdock *et al.*, 1990) e em *Urtica dioica* (Huesing *et al.*, 1991) possuem um alto efeito tóxico às larvas desse bruquídeo.

Com o mesmo objetivo analisado para o coleóptero, ACLEC foi incorporada na dieta artificial do lepidoptera *A. kuehniella* a variadas concentrações. O estudo revelou que ACLEC possui um alto efeito tóxico sobre essas larvas, atingindo uma redução de 50% de sobrevivência (LD₅₀) a nível de 1% de incorporação, aumentando ainda mais, quando em concentrações superiores a 1% (**Figura 16**). A **Figura 17** evidencia o forte efeito deletério sobre o peso médio das larvas sobreviventes que se alimentaram da dieta contendo ACLEC, com uma redução de 50% de seu peso (WD₅₀) a 1% de incorporação, essa perda no peso foi representada pela diminuição do comprimento e largura das larvas quando comparada com as do controle (**Figura 18**), mostrando um alto grau de inibição pela atuação da lectina. Do mesmo modo, outras lectinas de plantas também possuem um efeito

detrimental sobre outros lepidópteros como as lectinas de *Arachis hypogea* sobre *Chilo partellus* (Law *et al.*, 1997), *Galanthus nivalis*, *Iris hybrid*, *Listera ovata* e *Bryonia dioica* sobre *Maruca vitrata* (Machuka *et al.*, 1999b) e *Canavalia ensiformes* sobre *Laconobia oleraceae* (Fitches *et al.*, 1997).

Por mais que o epitélio intestinal dos insetos seja recoberto por sítios ligantes a carboidratos, nem todas as lectinas possuem a capacidade de ligarem-se a esses sítios, devido à toxicidade das lectinas ser específicas. Esta especificidade também pode estar ligada a fraca conservação das posições dos carboidratos nas proteínas entre as espécies, observando que lectinas que são tóxicas para uma determinada espécie de insetos não necessariamente sejam tóxicas para outras espécies (Triguerós *et al.*, 2000). A toxicidade das lectinas também pode ser atribuída por modificações que possam ocorrer à absorção de proteínas necessárias ao inseto, inibição de proteínas funcionais (enzimas) ou até mesmo, modificações dos sítios ativos das proteínas.

Em conclusão, tem-se a purificação e caracterização bioquímica de uma lectina presente em sementes de *A. coriacea*, denominada ACLEC, a qual apresenta uma maior afinidade pelos carboidratos manose e glicose. Esta lectina apresenta uma certa resistência no desenvolvimento *in vivo* de larvas do lepidoptera *A. kuehniella*. Estes resultados nos levam a sugerir que esta lectina possa ser empregada para estudo mais específicos, que envolvam o mecanismo de defesa de plantas ao ataque de insetos.

A busca de produtos naturais, que possam ser usados como agentes potencialmente úteis ao combate de pragas e patógenos que causam prejuízos a produtos agrícolas comercialmente utilizados pelo homem, contribui para amenizar os problemas do uso de inseticidas e fungicidas sintéticos no combate de pragas e doenças que, além de serem onerosos para a maioria dos produtores, resultam em contaminação ambiental induzindo o surgimento de espécies resistentes (Macedo *et al.*, 2000).

VII – BIBLIOGRAFIA

- Ahmad, S.; Khan, R. H.; Ahmad, A. (1999). Physiocochemical characterization of *Cajanus cajan* lectin: effect of pH and metal ions on lectin carbohydrate interaction. *Biochim. Biophys. Acta* **1427**: 378-384.
- Ajouba, A.; Causse, H.; Van Damme, E. J. M.; Peumans, W. J.; Cambillau, C.; Rougé, P. (1994). Interactions of plant lectins with the components of the bacterial cell wall peptidoglycan. *Biochem. Syst. Ecol.* **22**: 153-59.
- Baba, K.; Ogawa, M.; Nagano, A.; Kuroda, H.; Sumiya, K. (1991). Development changes in the bark lectins of *Sophora japonica*. *Planta* **181**: 462-470.
- 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 cytomegalopovirus replication *in vitro*. *Antiviral Research* **18**: 191-207.
- Barbieri, L.; Batelli, G. B.; Stirpe, F. (1993). Ribosome-inactivating proteins from plants. *Biochem. Biophys. Acta* **1154**: 237-282.
- Barondes, S. H.; Cooper, D. N. W.; Gitt, M. A.; Leffler, H. (1994). Galectins: Structure and function of a large family of animal lectins. *J. Biol. Chem.* **269**: 20807-20810.
- Beintema, J. J.; Peumans, W. (1992). The primary structure of stinging nettle (*Urtica dioica*) agglutinin. A two-domain member of the hevein family. *FEBS Lett.* **299**, 131-134.
- Bhuiyan, S. H.; Rahman, H.; Haider, K. (1995). Study of hemagglutinating property of enteroinvasive *Escherichia coli* from various geographical locations. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* **48**: 193-198.
- Bohlmann, H.; Clausen, S.; Behnke, S.; Giese, H.; Hiller, C.; Reihman-Philipp, U.; 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 mechanisms of plants. *EMBO J.* **7**: 1559-1565.
- Born, G. V. R. (1962). Quantitative investigations into the aggregation of blood platelets. *Physiol.* **162**: 67-68.

- Bradford, M. A. (1976). A rapid and sensitive method for quantitation of micogram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochem.* **72**: 248-254.
- Brady, P. G.; Vannier, A. M.; Banwell, J. G. (1978). Identification of the dietary lectin, wheat germ agglutinin, in human intestinal contents. *Gastroenterol.* **75**: 236-239.
- Brattsten, L. B. (1991). Bioengineering of crop plants and resistant biotype evolution in insects: counter-acting coevolution. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* **17**: 253-267.
- Broekaert, W. E.; Parijs, J. V.; Leyns, E.; Joos, H.; Peumans, W. J. (1989). A chitin-binding lectin from stinging nettle rhizomes with antifungal properties. *Science* **245**: 1100.
- Broekaert, W. F.; Marien, W.; Terras, F. R. G.; De Bolle, M. F. C.; Proost, P.; Van Damme J. *et al.* (1992). Antimicrobial peptides from *Amaranthus caudatus* seeds with sequence homology to the cysteine/glycine-rich domain of chitin-binding proteins. *Biochem.* **31**: 4308-4314.
- Cavada, B. S.; Santos, C. F.; Grangeiro, T. B.; Nunes, E. P.; Sales, P. V. P.; Ramos R. L. *et al.* (1998). Purification and characterization of a lectin from seeds of *Vatairea macrocarpa* Duke. *Phytochemistry* **49**: 675-680.
- Cavada, B. S.; Madeira, S. V. F.; Calvete, J. J.; Souza, L. A. G.; Bonfim, L. R.; Dantas, A. R. *et al.* (2000). Purification, chemical and immunochemical properties of a new lectin from mimosoideae (*Parkia discolor*). *Prep. Biochem. Biotech.* **30** (4): 271-280.
- Chen, Y.-L.; Chow, L.-P.; Tsugita, A.; Lin, J.-Y. (1992). The complete primary structure of abrin-a B chain. *FEBS Lett.* **309**: 115-118.
- Chen, J.; Saxton, J.; Hemming, F. W.; Peberly, J. F. (1996). Purification and partial characterization of the high and low molecular weight form (S- and F-form) of invertase secreted by *Aspergillus nidulans*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1296**: 207-218.
- Chignard, M.; Le Couedic, J. P.; Tence, M.; Vargaftig, B. B.; Benveniste, J. (1979). The role of platelet-activating factor in platelet aggregation. *Nature* **279**: 799-800.
- Chrispeels, M. J.; Raikhel, N. V. (1991). Lectins, lectin genes and their role in plant defense. *The plant Cell.* **3**: 1-9.
- Cornelissen, B. J.; Melchers, L. S. (1993). Strategies for control of fungal diseases with transgenic plants. *Plant Physiol.* **101**: 702-712.
- Czapla, T. H.; Lang, B. A. (1990). Effect of plants lectins on the larval development of European corn borers (Lepidoptera: Pyralidae) and Southern corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). *J. Econ. Entomol.* **83**: 2480-5.

- Datta, P. K.; Figuerosa, M. O. D. C. R.; Lajolo, F. M. (1991). Purification and characterization of two major lectins from *Araucaria brasiliensis* syn. *Araucaria angustifolia* seeds (Pinhão). *Plant Physiol.* **97**: 856-862.
- De Oliveira, J. T. A.; Cavada, B. S.; Moreira, R. A. (1991). Isolation and parcial characterization of a lectin from *Cratylia floribunda* Mart. Seeds. *Rev. Brasil. Botânica* **14**: 63-68.
- Diaz, C.; Melchers, L. S.; Hooykaas, P. J. J.; Lugtenberg, B. J. J.; Kijne, J. W. (1989). Root lectin as a determinant of host-plant specificity in the *Rhizobium*- legume symbiosis. *Nature* **338**: 579-581.
- Down, R. E.; Gatehouse, A. M. R.; Hamilton, W. D. O.; Gatehouse, J. A. (1996). Snowdrop lectin inhibits development and decreases fecundity of the glasshouse potato aphid (*Aulacorthum solani*) when administered in vitro and via transgenic plants both in laboratory and glasshouse trials. *J. Ins. Physiol.* **42**: 1035-1045.
- Down, R. E.; Ford, L.; Woodhouse, S. D.; Raemackers, R. J. M.; Leitch, B.; Gatehouse, J. A.; Gatehouse, A. M. R. (2000). Snowdrop lectin (GNA) has no acute toxic affects on a beneficial insect predator the 2-spot ladybird (*Adalia bipunctata*). *J. Insect Physiol.* **46**: 379-391.
- Dubois, M.; Gilles, K. A.; Hamilton, J. K.; Rebers, P. A.; Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **28**: 350-356.
- Edge, A. S. B.; Faltynek, C. R.; Hof, L.; Reichert, L. E.; Weber, P. (1981). Deglycosylation of glycoproteins by trifluoromethanesulfonic acid. *Anal. Biochem.* **118**: 131-137.
- Eiseman, C. H.; Donaldson, R. A.; Pearson, R. D.; Cadagon, L. C.; Virocolo, T.; Tellam, R. L. (1994). Larvicidal acticity of lectins on *Lucilia cuprina*: mechanism of action. *Entomol. Exp. Appl.* **72**: 1-11.
- Fitches, E.; Gatehouse, A. M. R.; Gatehouse, J. A. (1997). Effects of snowdrop lectin (GNA) delivered via artificial diet and transgenic plants on the development of the Toato Moth (*Lacanobia oleracea*) larval in the laboratory and glasshouse trials. *J. Insect Physiol.* **43** (8): 727-739.
- Fitches, E.; Woodhouse, S. D.; Edwards, J. P.; Gatehouse, J. A. (2001). In vitro and in vivo binding of snowdrop (*Galathus nivalis*-GNA) and jackbean (*Canavalia ensiformes*-Con A) lectins within tomato moth (*Lacanobia oleracea*) larval; mechanisms of insecticidal action. *J. Insec. Physiol.* **47**:777-787.
- Freire, M. G. M.; Gomes, V. M.; Corsini, R. E.; Machado, O. L.; de Simone, S. G.; Novello, J. C.; Marangoni, S.; Macedo, M. L. R. (2001). Isolation and partial

characterization of a novel lectin from *Talisia esculenta* seeds that interferes with fungal growth. *Plant Physiol. Biochem.* **In press**

- Gabius, H. J. (1994). Non-carbohydrate binding partner/domains of animal lectins. *Int. J. Biochem.* **26**: 469-477.
- Ganguly, P.; Fosset, N. G. (1980). Interaction of lentil lectin with human platelets. Evidence against Glycoprotein II as aggregation mediator. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **92**: 499-504.
- Gatehouse, A. M. R.; Barbieri, L.; Stirpe, F.; Croy, R. R. D. (1990). Effects of ribosome inactivating proteins on insect development-differences between Lepidoptera and Coleoptera. *Entomol. Exp. Appl.* **54**: 43-51.
- Gatehouse, A. M. R.; Down, R. E.; Powell, K. S. *et al.* (1996). Transgenic potato plants with enhanced resistance to the peach-potato aphid *Myzus persicae*. *Entomol. Exp. Appl.* **79**: 295-307.
- Gatehouse, A. M. R.; Gatehouse, J. A. (1998). Identifying proteins with insecticidal activity use of encoding genes to produce insect-resistant transgenic crops. *Pestic. Sci.* **52**: 165-175.
- Gatehouse, A. M. R.; Davison, G. M.; Stewart, J. N.; Gatehouse, L. N.; Kumar, A., ; Geoghegan, I. E.; Birch, N. E.; Gatehouse, J. A. (1999). Concanavalin A inhibits development of tomato moth (*Lacanobia oleracea*) and peach-potato aphid (*Myzus persicae*) when expressed in transgenic potato plants. *Mol. Breeding* **5**: 153-165.
- Gilg, D.; Riedl, B.; Zier, A.; Zimmermann, M. F. (1996). Analytical methods for the characterization and quality control of pharmaceutical peptides and proteins, using erythropoietin as an example. *Pharmaceutical Acta Helveticae* **71**: 383-394.
- Goldstein, I. J.; Hughes, R. C.; Monsigny, M.; Ozawa, T.; Sharon, N. (1980). What should be called a lectin? *Nature* **285**:66.
- Gozia, A.; Ciopraga, J.; Bentia, T.; Lungu, M; Zamfiresae, I.; Tudor, R.; Roseanu, A.; Nitu, F. (1993). Antifungal properties of lectin and new chitinases from potato tubers. *Comptes Rendus* **316**: 788-792.
- Greenberg, J. H.; Jamilson, G. A. (1974). The effects of various lectins on platelet aggregation and release. *Biochem. Biophys. Acta* **345**: 231-242.
- Gullan, P. J.; Cranston, P. S. (1994). The insects: an outline of entomology. Chapman & Hall pp. 2-491.

- Gurjar, M. M.; Khan, M. I.; Gaikwad, S. M. (1998). α -Galactoside binding lectin from *Artocarpus hirsuta*: characterization of the sugar specificity and binding site. *Biochem. Biophys. Acta* **1381**: 256-264.
- Habibi, J.; Backus, E. A.; Czaplá, T. H. (1993). Plant Lectins affect survival of the Potato Leafhopper (Homoptera: Cicadellidea). *J. Econ. Entomol.* **86**(3): 945-951.
- Habibi, J.; Backers, E. A.; 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.
- Harper, S. M.; Crenshaw, R. W.; Mullins, M. A.; Privalle, L. S. (1995). Lectin binding to insect brush-border membranes. *J. Econ. Entomol.* **88** (5): 1197-1202.
- Huesing, J. E.; Murdock, L. L.; Shade, R. E. (1991). Effect of wheat germ isolectins on development of cowpea weevil. *Phytochemistry.* **30**: 785-788.
- Janzen, D. H.; Juster, H. B.; Liener, I. E. (1976). Insecticidal action of the phytohemagglutinin in black beans on a bruchid. *Science* **192**: 795.
- Karp, D. R.; Atkinson, J. P.; Shreffler D. C. (1982). Genetic variation in glycosylation of the fourth component of murine complement. *J. Biol. Chem.* **267** (13): 7330-7335.
- King, T. P.; Pusztai, A.; Clarke, E. M. W. (1980). Immunocytochemical localization of ingested kidneybean (*Phaseolus vulgaris*) lectins in rat gut. *Histochem. J.* **12**: 201-208.
- Knox, R. B.; Clarke, A.; Harrison, S.; Smith, P.; Marchalonis, J. J. (1976). Cell recognition in plant: determinants on the stigma surface and their pollen interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**: 2788.
- Koike, T.; Beppu, H.; Kuzuya, H. K.; Shimpo, K.; Suzuki, M.; Titani, K.; Fujita, K. (1995). A 35 kDa mannose-binding lectin with hemagglutinating and mitogenic activities from "kidachi aloe" (Miller var. *Natalensis* Berger). *J. Biochem.* **118**, 1205-1210.
- Komath, S. S.; Nadimpalli, S. K.; Swamy, M. (1996). Purification in high yield and characterization of the galactose-specific lectin from the seeds of snake gourd (*Trichosanthes anguina*). *Biochem. Mol. Biol. Int.* **39**: 243-252.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lamb, F. I.; Roberts, L. M.; Lord, J. M. (1985). Nucleotide sequence of cloned cDNA coding for preprorin. *Eur. J. Biochem.* **148**: 265-270.
- Law, I. J.; Kfir, R. (1997). Effect of mannose-binding lectin from peanut and pea on the stem borer *Chilo partellus*. *Entomol. Exp. Appl.* **82**: 261-265.

- Lee, H. I.; Brokaert, W. F.; Raickel, N. V. (1991). Co- and post-translational processing of the hevein preprotein of latex of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *J. Biol. Chem.* **266**: 15944-15948.
- Lehle, K.; Kohnert, U.; Stern, A.; Popp, E.; Jaenick, R. (1996). Effect of disulfide bonds on the structure, function, and stability of the trypsin/TPA inhibitor from *Erythrina caffra*: site-directed mutagenesis, expression, and physicochemical characterization. *Nature Biotech.* **14**: 476-480.
- Lin, T.-S.; Li, 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**: 123-150.
- Lorenzi, H. (1992). Árvores Brasileiras – Manual de identificação e Cultivo de Plantas nativas do Brasil. Editora Plantum LTDA: 1.
- Lü-Lü, J. S. S.; Galperin, M. Y.; Drake, D.; Taylor, K. G.; Dayle, R. J. (1992). Chelating agents activity and prevent expression of Streptococcal glucar binding lectins. *Infect. Immun.* **60**: 3807-3.
- Macedo, M. L. R.; Coelho, M. B.; Freire, M. G. M.; Machado, O. L. T.; Marangoni, S.; 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** (4): 225-231.
- Macforlane, E. D.; Mills, D. C. B. (1975). The effects of ATP on platelets: evidence against the central role of released ADP in primary aggregation. *Blood* **46**: 309-320.
- Machuka, J. S.; Okeola, O. G.; Van Damme, E. J. M.; Chrispeels, M. J.; Van Leuven, F.; Peumans, W. J. (1999a). Isolation and partial characterization of galactose-specific lectins from African yam beans, *Sphenostyles stenocarpa* Harms. *Phytochemistry* **51**: 721-728.
- Machuka, J.; Van Damme, E. J. M.; Peumans, W. J.; Jackai, L. E. N. (1999b). Effect of plant lectins on larval development of the legume pod borer, *Maruca vitrata*. *Entomol. Exp. Appl.* **93**: 179-187.
- Majerus, P. W.; Brodie, G. N. (1972). The binding of Phytohemagglutinins to human platelet plasm membrane. *J. Biol. Chem.* **247**: 4253-4257.
- Mialonier, G.; Privat, J. P.; Monsigny, M.; Kohlen, G.; Durand, R. (1973). Isoliment, propriétés physico-chimiques at localization *in vivo* d'une phytohemagglutinine (lectine) de *Phaseolus vulgaris* L. (var. rouge). *Physiol. Veg.* **11**: 519-537.

- Mirelman, D.; Galun, E.; Sharon, N.; Lotan, R. (1975). Inhibition of fungal growth by wheat germ agglutinin. *Nature* **256**: 414-416.
- Mitchell, R. H. (1975). Inositol phospholipids and cell surface receptor function. *Biochem. Biophys. Acta* **415**: 851-857.
- Mo, H.; Van Damme, E.J.M.; Peumans, W.J.; Goldstein, I.J. (1994). Isolation and characterization of an N-acetyl-D-galactosamine-binding lectin from dutch iris bulbs which recognizes the blood A disaccharide (GalNAc α 1-3Gal). *J. Biol. Chem.* **269**: 7666-7673.
- Montfort, W.; Villafranca, J. E.; Monzingo, A. F.; Ernst, S.; Katzin, B., *et al.* (1987). The three-dimensional structure of ricin at 2.8 Å. *J. Biol. Chem.* **262**: 5398-5403.
- 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. and Cavada, B. S. (1984). Lectin from *Canavalia brasiliensis* Mart. Isolation, characterization and behavior during germination. *Biol. Plant* **26**: 113-120.
- Moreira, R. A.; Cavada, B. S.; De Oliveira, J. T. A.; Ainouz, I. L. (1990). Plant Lectins. *Proceeding of the first Brazilian Congress on proteins- COBRAP 90*, 73-96.
- Moreira, R. A.; Ainouz, I. L.; De Oliveira, J. T. A.; Cavada, B. S. (1991). Plant lectins, chemical and biological aspects. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **86** (suppl. II): 211-218.
- Moreira, R. A.; Monteiro, A. C. O.; Horta, A. C. G.; Oliveira, J. T. A.; Cavada, O. (1997). Isolation and characterization of *Dioclea altissima* var. Megacarpa seed lectin. *Phytochemistry* **46**, 139-144.
- Moreira, R. A.; Castelo-Branco, C. C.; Monteiro, A. C. O.; Tavares, R. O.; Beltramini, L. M. (1998). Purification and partial characterization of a lectin from *Artocarpus incisa* L. seeds. *Phytochemistry* **47**: 1183-1188.
- Mouton, C.; Bouchard, D.; Deslauriers, M; Lamonde, L. (1989). Immunochemical identification and preliminary characterization of a nonfimbrial hemagglutinating adhesin of *Bacteroides gingivalis*. *Infec. Imm.* **57** (2): 566-573.
- Murdock, L. L.; Huensing, J. E.; Nielsen, S. S.; Pratt, R. C.; Shade, R. E. (1990). Biological effects of plant lectins on the cowpea weevil. *Phytochem.* **29**: 85-89.
- Nagata, Y.; Burger, M. M. (1972). Wheat germ agglutinin. Isolation and crystalization. *J. Biol. Chem.* **247**: 2248-2250.

- Ni, Y.; Tizard, I. (1996). Lectin-carbohydrate interaction in the immune system. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **55**: 205-223.
- Obrégon-Henao, A.; Gil, D. L.; Gómez, D. I.; Sanzón, F.; *et al.* (2001). The role of N-linked carbohydrates in the antigenicity of *Taenia solium* metacestode glycoproteins of 12, 16 and 18 kDa. *Mol. Biochem. Parasitol.* **114**: 209-215.
- Olgivie, M. L.; Byl, J. W.; Gartnerm, T. K. (1989). Platelet Aggregation is Stimulated by Lactose-Inhibitable Snake Venom Lectins. *Thrombosis and Haemostasis* **62** (2): 704-707.
- Paes, N. S.; Gerhardt, I. R.; Coutinho, M. V.; Yokoyama, M.; *et al.* (2000). The effect of arcelin-1 on the structure of the midgut of bruchid larval and immunolocalization of the arcelin protein. *J. Insect Physiol.* **46**: 393-402.
- Padma, P.; Komath, S. S.; Nadimpalli, S. K.; Swamy, M. J. (1999). Purification in high yield and characterization of a new galactose-specific lectin from the seeds of *Trichosanthes cucumerina*. *Phytochemistry* **50**: 363-371.
- Peumans, W. J.; De Ley, M.; Broekaert, W. F. (1984). Na unusual lectin from stinging nettle (*Urtica dioica*) rhizomes. *FEBS Lett.* **177**: 99-103.
- Peumans, W. J.; Van Damme, E. J. M. (1995). The role of lectins in plant defense. *Histochem. J.* **27**: 253-271.
- Peumans, W. J.; Verhaert, P.; Pfüller, U.; Van Damme, E. J. M. (1996). Isolation and partial characterization of a small chitin-binding lectin from mistletoe (*Viscum album*). *FEBS Lett.* **396**: 261-265.
- Peumans, W. J.; Winter, H. C.; Bemmer, V.; Van Leuven, F.; Goldstein, I. J.; Truffa-Bachi, P.; Van Damme, E. J. M. (1997). Isolation of a novel plant lectin with an unusual specificity from *Calystegia sepium*. *Glycoconjugate J.* **14**: 259-265.
- Peumans, W. J.; Van Damme, E. J. M. (1998). Plant lectins: versatile proteins with important perspectives in Biotechnology. *Biotech. Genetic Engineering Reviews* **15**: 199-225.
- Powell, K. S.; Gatehouse, A. M. R.; Hilder, V. A.; Gatehouse, J. A. (1993). Antimetabolic effects of plant lectins and fungal enzymes on the nymphal stages of two important rice pests, *Nilaparvata lugens* and *Nephotettix cinciteps*. *Entomol. Exp. Appl.* **66**: 119-26.
- Powell, L. D.; Varki, A. (1995). I-type lectins. *J. Bio. Chem.* **270**: 14234-14246.
- Powell, K. S.; Spence, J.; Bharathi, M.; Gatehouse, J. A.; Gatehouse, A. M. R. (1998). Immunohistochemical and development studies to elucidated the mechanisms of action

- of the snowdrop lectin on the rice brown planthopper *Nilaparvata lugens* (Stal). *J. Ins. Physiol.* **44**: 529-539.
- Pratt, R. C.; Singh, N. K.; Shade, R. E.; Murdock, L. L.; Bressan, R. A. (1990). Isolation and partial characterization of a seed lectin from therapy bean that delays bruchid beetle development. *Plant Physiol.* **93**: 1453-1459.
- Pusztai, A.; Palmer, R. (1977). Nutricional Evaluation of kidney beans (*Phaseolus vulgaris*); The toxic Principle in *J. Sci. Food Agric.* **28**: 620-623.
- Pusztai, A.; Bardocz, S. (1996). Biological affects of plant lectins on the gastrointestinal tract: metabolic consequences and applications. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **8**: 149-165.
- Rahbé, Y.; Sauvion, N.; Febvay, G.; Peumans, W. J.; Gatehouse, A. M. R. (1995). Toxicity of lectins and processing of ingested proteins in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Entomol. Exp. Appl.* **76**: 143-155.
- Rao, K. V.; Rathore, K. S.; Hodges, T. K.; Fu X. *et al.* (1998). Expression of snowdrop lectin (GNA) in transgenic rice plants confers resistance to rice brown planthopper. *Plant J.* **15**: 469-477.
- Richards, A. G.; Richards, P. A. (1977). The peritrophic membranes of insects. *Ann. Rev. Entomol.* **22**: 787-91.
- Rüdiger, H. (1998). Plant lectins- more than just tools for glycoscientists: occurrence, structure, and possible functions of plant lectins. *Acta Anat.* **161**: 130-152.
- Rupp, M. E.; Sloot, N.; Meyer, H.-G.; Han, J.; Gatermann, S. (1995). Characterization of the hemagglutination of *Staphylococcus epidermis*. *J. Infectious Diseases* **172**: 1509-18.
- Ryan, C. A. (1990). Genes for improving defenses against insects and pathogens. *Ann. Rev. Phytophatol.* **28**: 425-449.
- Sato, S.; Hughes, R. C. (1994). Regulation of secretion and surface expression of MAC-2, a galactoside-binding protein of macrophages. *J. Biol. Chem.* **269**: 4424-4430.
- Sauvion, N.; Rahbe, Y.; Peumans, W. J.; Van Damme, E. J. M.; Gatehouse, J. A.; Gatehouse, A. M. R. (1996). Effects of GNA and other mannose binding lectins on development and fecundity of the peach-potato aphid *Myzus persicae*. *Entomol. Appl.* **79**: 285-293.
- Sequeira, L.; Graham, T. L. (1977). Agglutination of avirulent strains *Pseudomonas solanacearum* by potato lectin. *Physiol. Plant Pathol.* **11**: 43-54.

- Sharon, N.; Lis, H. (1990). Legume lectins-a large family of homologous proteins. *FASEB Journal* **4**: 3198-3208.
- Singh, R. S.; Tiwary, A. K.; Kennedy, J. F. (1999). Lectins: sources, activities and applications. *Crit. Rev. Biotech.* **19** (2): 145-178.
- Sojar, H. T.; Bahl, O. P. (1987). Chemical deglycosilation of glycoproteins. *Methods in Enzymology* **138**: 341-350.
- Tennent, G. A.; Pepys, M. B. (1994). Glycobiology of the pentraxins. *Biochem. Soc. Trans.* **22**: 74-79.
- Triguerós, V.; Wang, M.; Père, D.; Paquercau, L.; *et al.* (2000). Modulation of a lectin insecticidal activity by carbohydrates. *Arch. Ins. Biochem. Physiol.* **45**: 175-179.
- Van Damme, E. J. M.; Allen, A. K.; Peumans, W. J. (1987). Isolation and characterization of a lectin with exclusive specificity towards mannose from snowdrop (*Galathus nivalis*) bulbs. *FEBS Letters* **215**: 140-144.
- Van Parijs, J.; Broekaert, W. F.; Goldstein, I. J.; Peumans, W. J. (1991). Hevein: na antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. *Planta* **183**: 258-262.
- Van Damme, E. J. M.; Barre, A.; Smeets, K.; Torrekens, S.; van Leuren, F.; Rouge, P.; Peumans, W. J. (1995a). The bark of *Robinia pseudoacacia* contains a complex mixture of lectins. Characterization of the proteins and the cDAN clones. *Plant Physiol.* **107**: 833-843.
- Van Damme, E. J. M.; Barre, A.; Bemmer, V.; Rouge, P.; van Leuren, F.; Peumans, W. J. (1995b). A lectina 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.; van Lauren F.; Peumans, W. J. (1997a). Isolation, characterization and moecular cloning of the bark lectins from *Maackia amurensis*. *Glycoconj. J.* **14**: 449-456.
- Van Damme, E. J. M.; Barre, A.; Rouge, P.; Peumans, W. J. (1997b). Molecular cloning of the bark and seed lectins from the Japanese pagoda tree (*Sophora japonica*). *Plant Mol. Biol.* **33**: 523-536.
- Van Damme, E. J. M.; Peumans, W. J.; Rougé, P. (1998). Plant lectins: a composite of several distinct families os structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. *Crit. Rev. Plant Sci.* **17** (6): 575-692.

- Van Damme, E. J. M.; Charels, D.; Roy, S.; *et al.* (1999). A gene encoding a hevein-like protein from elderberry fruits is homologous to PR-4 and class V chitinase genes. *Plant Physiol.* **119**: 1547-1556.
- Van Parijs, J.; Broekaert, W. F.; Goldstein, I. J.; Peumans, W. J., 1991. Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. *Planta* **183**: 258-262.
- Vargaftig, B. B.; Chignard, M.; Benveniste, J. (1981). Present concepts on the mechanisms of platelets aggregation. *Biochem. Pharmacol.* **30**: 263-271.
- Vasconcelos, I. M.; Firmino, F.; Moreira, R. A.; Cavada, B. S.; Guimarães, F. A.; Oliveira, J. T. A. (1989). Nutricional studies of *Canavalia brasiliensis* Mart. *Seeds. Cien. Cult.* **415**: 786.
- Verheyden, P.; Pletinckx, J.; Maes, D.; Pepermans, H. A. M.; Wyns, L.; Willem, R.; Martins, J. C. (1995). HNMP study of the interaction of N, N', N''-triacetyl chitotriose with Ac-AMP2, a sugar-binding antimicrobial protein isolated from *Amaranthus caudatus*. *FEBS Lett.* **370**: 245-249.
- Wang, M. B.; Boulter, D.; Gatehouse, J. (1994). Characterizations and sequencing of cDNA clone encoding the phloem protein PP2 of *Cucurbita pepo*. *Plant Mol. Biol.* **24**: 159-170.
- Wang, H. X.; Ng, T. B.; Ooi, V. E. C. (1999). Studies on purification of a lectin from fruiting bodies of the edible shiitake mushroom *Lentinus edodes*. *Int. Biochem. Cell Biol.* **31**: 595-599.
- Weis, W. I.; Drickamer, K. (1996). Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. *Annu. Rev. Biochem.* **65**: 441-73.
- Wongkham, S.; Wongkham, C.; Boonsiri, P.; Simasathiansophon, S.; Trisonthis, C.; Atissok, K. (1995). Isolectins from seeds of *Artocarpus lakoocha*. *Phytochemistry* **40**, 1331-1334.
- Ye, X.; Ng, T. B. (2001). Isolation of lectin and albumin from *Pisum sativum* vr. macrocarpon ser. cv. sugar snap. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **33**: 95-102.
- Yoshida, K.; Baba, K.; Yamamoto, N.; Tazaki, K. (1994). Cloning of a lectin cDNA and seasonal changes in levels of the lectin and its mRNA in the inner bark of *Robinia pseudoacacia*. *Plant. Mol. Biol.* **25**: 845-853.
- Youle, R. J.; Huang, A. H. C. (1976). Protein bodies from the endosperm of castor bean subfraction protein components, lectins and changes during germination. *Plant Physiol.* **58**: 703-709.

Young, M. N.; Jhonston, R. A. Z.; Szabo, A. G.; Watson, D. C. (1989). Homology of the D-galactose-specific lectins from *Artocarpus integrifolia* and *Maclura pomifera* and the role of an unusual small polypeptide subunit. *Biochem. Biophys. Acta* **270**: 596-603.