

OTIMIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE (AHE) DE EXTRATOS PROTÉICOS OBTIDOS DE SEMENTES DE *DIOCLEA BICOLOR* BENTH

METHODOLOGY OPTIMIZATION AND EVALUATION HEMAGGLUTINATING ACTIVITY (AHE) IN PROTEIN EXTRACTS OF *DIOCLEA BICOLOR* BENTH SEEDS

Paulo Abrão C. Maranhão

Biotecnologista, Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

José Ednézio da Cruz Freire

Mestre em Bioquímica, Universidade Federal do Ceará (UFC).

José Francisco C. Gonçalves

Doutor. Pesquisador do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (MCTI-INPA).

Andreia V. Fernandes

Doutora. Pesquisadora do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (MCTI-INPA)

RESUMO

Sementes de *Dioclea* spp. são conhecidas por conterem lectinas. Dentre as funções desempenhadas por essas (glico) proteínas, destacam-se as propriedades hemaglutinantes e de precipitação de glicoproteínas. A fim de determinar a melhor condição de extração de lectinas de sementes de *D. bicolor*, diferentes tampões de extração foram empregados. Dentre os tampões utilizados, neste estudo, o tampão fosfato de sódio 0,5 M, pH 8,0 (1:10 p/v), apresentou o melhor rendimento (0,096 mg/mL). Os ensaios hemaglutinantes (AHE) apresentaram atividade variando entre 23-27, com forte afinidade a açúcares da série galactose. O perfil protéico dos extratos por SDS-PAGE, revelaram bandas com massa molecular aparente em torno de 30 kDa. Os resultados sugerem que o uso do tampão fosfato de sódio 0,5 M, pH 8,0 (1:10 p/v) é o método mais eficiente e confiável para obtenção de lectinas de sementes de *D. bicolor*, bem como para posteriores análises de atividade biológica destas proteínas.

Palavras-chave: Fabaceae. Sementes. *Dioclea*. Lectinas. Isolamento e purificação.

ABSTRACT

Seeds from Dioclea spp. are known to contain lectins. Among the functions performed by this (glycol) protein, stand out the haemagglutination and precipitating glycoconjugates properties. In order to determine the best condition of extracting lectins from seeds of D. bicolor, different extraction buffers were employed. Among the buffers used in this study, the buffer of 0.5 M sodium phosphate, pH 8.0 (1:10 w/v) showed the best performance (0.096 mg/mL). The hemagglutination assays (AHE) showed activity ranging from 23-27, with high-affinity of the sugars galactose series. The protein profile of the extract by SDS-PAGE showed bands with apparent molecular weight around 30 kDa. The results suggest that the use of sodium phosphate buffer 0.5 M, pH 8.0 (1:10 w/v), is the most reliable and efficient for obtaining seed lectins D. bicolor method, as well as further analysis of the biological activity of this protein.

Keywords: Fabaceae. Seeds. *Dioclea*. Lectins. Isolation and purification.

Recebido em: 30/05/2014

Aceito em: 01/09/2014

1 INTRODUÇÃO

As lectinas podem ser definidas como sendo proteínas ou glicoproteínas de origem não imune, capazes de ligar-se de forma específica e reversível a carboidratos sem causar nenhuma mudança físico-química nesses açúcares. A classificação química dessas glicoproteínas se baseia em vários critérios, entretanto, dois deles se destacam: o primeiro se baseia no número de domínios de ligação a açúcares, dividindo as lectinas em merolectinas (um único domínio de ligação a carboidrato e incapaz de promover aglutinação celular), hololectinas (dois domínios de ligação a carboidratos homólogos, ambos capazes de aglutinar células), quimerolectinas (um ou mais domínios de ligação a carboidratos e um domínio de função distinta) e superlectinas (consistem de no mínimo dois domínios de ligação a carboidrato, porém, cada domínio reconhece carboidratos estruturalmente diferentes) (HAMID *et al.*, 2013) e, o segundo, baseado no tipo de carboidrato que as lectinas se ligam, podendo ser classificadas como lectinas ligantes de manose, manose/glicose, manose/maltose, galactose/N-acetilgalactosamina, fucose, ácido siálico, entre outros (MORENO *et al.*, 2008; ALENCAR *et al.*, 2013; BEZERRA *et al.*, 2013; HAMID *et al.*, 2013).

Dentre as funções mais conhecida das lectinas, destacam-se a sua capacidade em causar aglutinação de células e ou precipitação de glicoconjugados, sendo por essa razão, largamente utilizadas em aplicações biotecnológicas (LAM; NG, 2011). De todas as lectinas já conhecidas, destacam-se aquelas identificadas em sementes de leguminosas, as quais têm apresentado características estruturais muito conservadas (KOHARUDIN *et al.*, 2012), embora as lectinas possam divergir em sua especificidade aos açúcares. Estruturalmente, as lectinas extraídas de sementes de leguminosas tem apresentado entre 2 a 4 subunidades com pesos moleculares variando entre 25-30 kDa (OSTERNE *et al.*, 2014), existindo um domínio de ligação a açúcar e dois sítios de ligação a metais (Ca^{2+} e Mn^{2+}), localizado em cada su-

bunidade (ABHILASH *et al.*, 2013). Ademais, essas proteínas apresentam grande estabilidade a variações de temperatura e pH (LAM; HAN; NG, 2009).

A *Canavalia ensiformes* é uma leguminosa pertencente à família Fabaceae, subtribo Diocleinae e, de suas sementes foi identificada a Concanavalina A (Con A), atualmente, a lectina melhor caracterizada e com maior número de aplicações biomédicas (MATUS; WALTERS, 1976; WAN *et al.*, 2014). Outras espécies desta subtribo tiveram lectinas isoladas de suas sementes, incluindo, a espécie *Dioclea altissima*, *D. grandiflora*, *D. lehmani*, *D. rostrata*, *D. sericeae*, *D. violacea* e *Dioclea wilsonii* todas elas ligantes a glicose/manose e com propriedades físico-químicas e estruturais muito similares (MOREIRA *et al.*, 1983; RENATO *et al.*, 1997; PÉREZ, 1998; SIERRA; PÉREZ, 1999; RANGEL *et al.*, 2011; ALENCAR *et al.*, 2013; BEZERRA *et al.*, 2013). Em sementes de leguminosas o teor médio de lectinas varia entre 2% a 10% do conteúdo total de proteínas expressas (CHRISPEELS; RAIKHEL, 1991; PEUMANS; VAN DAMME, 1995; FERNANDES *et al.*, 2011).

A espécie *D. bicolor*, popularmente conhecida como olho de boi, é uma espécie de Fabaceae pertencente à subfamília Faboideae, tribo Phaseoleae e subtribo Diocleinae. O extrato proteico de sua semente, extraído com NaCl 0,15 M 10% p/v, tem apresentado difícil solubilização em soluções aquosas, provavelmente, devido ao elevado conteúdo de lipídeos e polissacarídeos na semente. Desta forma, é de grande importância investigar novos métodos de extração de proteínas que sejam favoráveis aos processos de isolamento e purificação.

Desta forma, este estudo tem como objetivo principal otimizar a melhor condição para extração de proteínas a partir de sementes de *D. bicolor*, além de determinar a atividade hemaglutinante (AHE), título hemaglutinante (TH), análise do perfil eletroforético das misturas protéicas em diferentes condições de extração.

2 PARTE EXPERIMENTAL

Esta pesquisa foi realizada, integralmente, no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Vegetal do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) durante o segundo semestre do ano de 2012. Os experimentos ocorreram em ambiente climatizado, a fim de garantir a viabilidade dos materiais utilizados. De um ponto de vista mais amplo, a metodologia desse estudo foi dividida em três etapas que, a saber, foram: extração protéica das sementes de *D. bicolor* utilizando dez condições de extração diferentes, ensaio de AHE de cada um dos extratos obtidos e obtenção do perfil eletroforético por SDS-PAGE.

2.1 Extração protéica

As sementes maduras e sem cascas de *D. bicolor*, concedidas pelo banco de sementes do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Vegetal (INPA/Campus III), foram trituradas em moinho analítico de facas até a completa pulverização, o qual foi submetido, em seguida, a diferentes metodologias de extração protéica, que foram: a utilização de diferentes soluções extratoras (glicina 0,1 M, acetato de sódio 0,2 M, fosfato de sódio 0,5 M e sulfato de amônio 1M), a variação nas concentrações de farinha de *D. bicolor* a ser extraído (variando entre 1:10 p/v e 1:15 p/v) e o tempo (2 horas ou 4 horas) mantidas sob leve agitação (100 rpm) constante.

Posteriormente, as suspensões foram submetidas à força centrípeta de 11.000 x g durante 20 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram dialisados contra água destilada durante 72 horas a 4°C, congelados e posteriormente liofilizados.

2.2 Quantificação de proteínas totais

Os extratos protéicos tiveram suas concentrações de proteínas estimadas segundo o método de Bradford (BRADFORD, 1976). Alíquotas de 50 µL do extrato protéico foram

incubadas durante 5 minutos à temperatura ambiente com 2,5 mL do reagente de *Bradford*, sendo a concentração de proteína estimada por meio da leitura espectrofotométrica a 595_{nm} (Espectrofotômetro UV/Visível Ultraspec 2100 pro, *Armestham Biosciences*), utilizando BSA como padrão.

2.3 Teste de atividade hemaglutinante (AHE)

2.3.1 Preparo dos eritrócitos

Amostras de 3 mL de sangue, obtidas de diferentes animais saudáveis (rato branco e coelho), provenientes do Biotério Central do INPA - *Campus I*, foram coletadas e homogeneizadas com 30 µL de heparina. Após a completa homogeneização, as amostras sanguíneas foram imediatamente transportadas em gelo para o Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Vegetal (LFBV/CDAM - *Campus III*) e, lavado com NaCl 0,15 M e submetido a força centrípeta de 3.000 x g, por 10 minutos a 4°C.

Esse procedimento foi repetido por três vezes consecutivas. O precipitado foi ressuspenso em NaCl 0,15 M, de modo a obter uma suspensão final de eritrócitos a 2% (v/v) (CAVADA *et al.*, 1996).

2.3.2 Detecção e inibição da AHE

A AHE foi determinada pelo método de diluição seriada em placas de microtitulação contendo 8 fileiras de 12 raias; inicialmente, a cada uma das raias adicionou-se 25 µL da solução salina (NaCl 0,15 M), em seguida 25 µL da amostra (extrato proteico na concentração 10 mg/mL em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,6 adicionado de NaCl 0,15 M) na primeira raia e, nas demais seguiu-se com diluição seriada até a última raia. Por último foram adicionados em cada raia 25 µL da suspensão de eritrócitos a 2% v/v, posteriormente as placas foram incubadas durante 30 minutos a 37°C e os resultados foram analisados a olho nu após 30 minutos a temperatura ambiente e, 12 horas após o período de incubação (MO-

REIRA; PERRONE, 1977).

O ensaio de inibição da AHE frente a diferentes carboidratos foi realizado como previamente descrito por Ramos (1997). Os extratos proteicos (10 mg/mL em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,6, adicionado de NaCl 0,15 M) que apresentaram AHE, sob as condições testadas (Tabela 1), foram incubadas com concentrações decrescentes de carboidratos (100 mM) e posteriormente, adicionou-se a cada raia uma suspensão de eritrócitos a 2% v/v nas placas de microtitulação. As placas foram incubadas e analisadas nas mesmas condições descritas anteriormente.

3 SDS – PAGE

Para obtenção do perfil protéico foram preparados géis de poliacrilamida, onde os géis de concentração e separação foram obtidos a partir de uma solução estoque de acrilamida a 30% p/v e de N-N'-metileno bis-acrilamida 0,8% p/v (LAEMMLI, 1970).

O gel de concentração a 5% p/v foi preparado em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8, e o gel de separação 12,5%, em tampão Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8, sendo acrescentado em ambos SDS 12,5% p/v.

A polimerização foi conseguida pela adição de TEMED e PSA 10% p/v. As amostras proteicas (10–20 µg) foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,0, contendo 1% p/v de SDS, 10% v/v de glicerol e 1% v/v de β-mercaptoetanol, e posteriormente, imersas em água em ebulição durante 10 minutos.

A eletroforese foi realizada em tampão de corrida Tris-HCl 0,025M, glicina 0,192M e SDS 0,1%, a 120 volts, 15 mA, durante 2 horas. Foram utilizados os marcadores de massas moleculares da Promega (220 kDa - 10 kDa). Após a eletroforese, os géis foram corados com *Coomassie Brilliant Blue* em ácido acético 0,1% v/v, metanol e água deionizada na proporção de 1:4:5 durante 2 horas e então, descorados em solução de ácido acético glacial, metanol e água deionizada na proporção de 1:4:5.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os extratos proteicos obtidos por diferentes processos de extração do material finamente pulverizado da semente de *D. bicolor* apresentaram diferentes concentrações de proteínas, indicando que um método de extração pode ser mais efetivo em relação a outro no que condiz a quantidade de proteínas totais (Tabela 1).

Tabela 01 - Otimização das condições para extração de proteínas de sementes de *Dioclea bicolor*, avaliação hemaglutinante (AHE) usando suspensão de eritrócitos de coelho 2% v/v.

Tratamento (tempo)	Mistura: semente/tampão	AHE	Especificidade	Teor de proteínas totais (mg/mL)
1 (2 horas)	Glicina 0,1 M pH 2,6 (1:15 p/v)	2 ⁶	Gal/N-Gal	0,027
2 (2 horas)	Acetato de sódio 0,2 M pH 4,0 (1:15 p/v)	2 ³	Gal/N-Gal	0,012
3 (2 horas)	Fosfato de sódio 0,5 M pH 6,0 (1:15 p/v)	2 ⁵	Gal/N-Gal	0,044
4 (2 horas)	Fosfato de sódio 0,5 M pH 8,0 (1:15 p/v)	2 ⁶	N-Gal	0,069
5 (2 horas)	Sulfato de amônio 1 M (1:15 p/v)	2 ⁵	Gal/N-Gal	0,030
6 (4 horas)	Glicina 0,1 M pH 2,6 (1:10 p/v)	2 ³	Gal/Lac/N-Gal	0,020
7 (4 horas)	Acetato de sódio 0,2 M pH 4,0 (1:10 p/v)	2 ⁴	Gal/Lac/N-Gal	0,022
8 (4 horas)	Fosfato de sódio 0,5 M pH 6,0 (1:10 p/v)	2 ⁴	Gal/Lac/N-Gal	0,028
9 (4 horas)	Fosfato de sódio 0,5 M pH 8,0 (1:10 p/v)	2 ⁵	Gal/Lac/N-Gal	0,096
10 (4 horas)	Sulfato de amônio 1 M (1:10 p/v)	2 ⁵	Gal/Lac/N-Gal	0,043

Fonte: Dados da pesquisa.

A condição de extração que apresentou o maior teor de proteínas totais foi a 9, com uma massa estimada de 0,096 mg/mL. Segui-

do pela condição 4, aproximadamente 0,069 mg/mL. Tanto a condição 9 quanto para a 4 utilizou-se, o fosfato de sódio 0,5 M pH 8,0, in-

dicando que as proteínas presentes na semente da *D. bicolor* possuem características básicas. Embora existam algumas lectinas isoladas do gênero *Dioclea* de caráter básico na literatura, como é o caso da Con A e DGL-I, grande parte delas apresenta caráter ácido (MELGAREJO; VEGA; PÉREZ, 2005).

A partir desses resultados, avaliamos que o fosfato de sódio 0,5 M pH 8,0 foi o melhor extrator de proteínas do material finamente pulverizado da semente de *D. bicolor*. O maior teor de proteína estimado para a condição 9 em comparação a condição 4 pode ser atribuída ao tempo de extração maior. Ressaltando-se que, a relação extrator/extrato, para esse caso, mostrou que a maior quantidade de extrator não aumentou a capacidade de extração de proteínas. Em outras condições também apresentaram teor médio de proteínas, por exemplo, as condições 3 e 10, que apresentaram, respectivamente, 0,044 e 0,043 mg/mL. O menor teor de proteínas foi visto na condição 2, apresentando aproximadamente 0,012 mg/mL.

A presença de hemaglutinação foi observada com eritrócitos de coelho 2% v/v para todas as condições testadas, porém algumas apresentaram um maior TH, que é a representação matemática para a quantidade de raias com hemaglutinação de uma determinada amostra. As condições 1 e 4 (Tabela 1) foram as que apresentaram os maiores TH, correspondendo a 2⁶, indicando que nessas condições indicam maiores concentrações de lectinas, ou que estão mais propensas a interagir com carboidratos.

A condição 4, além de possuir o segundo maior teor de proteínas totais (Tabela 1), também mostrou um dos melhores títulos hemaglutinantes em relação a todas as condições testadas (Tabela 1). Resultados similares foram vistos por Moreira e colaboradores (MOREIRA *et al.*, 1993), que notou um maior título hemaglutinante com pH 8,0 para oito espécies da subtribo *Diocleinae* (MOREIRA *et al.*, 1993).

Outras condições também apresentaram um alto TH em comparação com as condições 1 e 4, por exemplo, as condições 5, 9 e 10, cor-

respondendo a 2⁵. Enquanto que os menores TH foram visualizados nas condições 2 e 6, sendo iguais a 2³. Provavelmente, o TH de todas as condições seria maior com a adição dos íons Ca²⁺ e Mn²⁺ a todos os extratos, uma vez que esses íons são necessários para maioria da lectinas das sementes de leguminosas, a fim de ocasionarem uma melhor interação lectina-carboidrato (LORIS, 2002).

As amostras aquecidas durante 30 minutos a 37°C em todas as condições de extração neste estudo também apresentaram hemaglutinação, porém com um título hemaglutinante mais reduzido para todas as condições. Este resultado indica que a provável lectina da semente da *D. bicolor* é resistente a variações de temperaturas, diferentemente de grande maioria das lectinas de leguminosas, como observado por Oliveira *et al.* (2002), o qual conseguiu purificar uma lectina com afinidade a *D*-galactose de sementes de *Luetzelburgia auriculata* e ocorreu perda de função protéica depois de 5 minutos a 80°C.

A fim de determinar o carboidrato que a lectina (ou lectinas), objeto deste estudo, detém afinidade foi realizado o ensaio de inibição da AHE. Esse teste indicou que a lectina da semente de *D. bicolor* apresenta afinidade a *D*-galactose/Lactose/*N*-acetil-*D*-galactosamina (Tabela 1). Conclui-se, ainda, que para as condições 1, 2, 3, 4 e 5 há afinidade a *D*-galactose e *N*-acetil-*D*-galactosamina, com exceção da condição 4 que apresentou afinidade somente com a *N*-acetil-*D*-galactosamina. Para as condições restantes, houve afinidade a *D*-galactose, lactose e *N*-acetil-*D*-galactosamina.

A maior parte das lectinas isoladas do gênero *Dioclea* apresenta afinidade a açúcares da série glicose. Porém, estudos apontam um novo tipo de lectinas do gênero *Diocleinae* que se diferenciam das “clássicas” lectinas ligantes à glicose/manose. Uma das características desse novo grupo é a afinidade à lactose (CAVADA *et al.*, 1996; MELGAREJO; VEGA; PÉREZ, 2005).

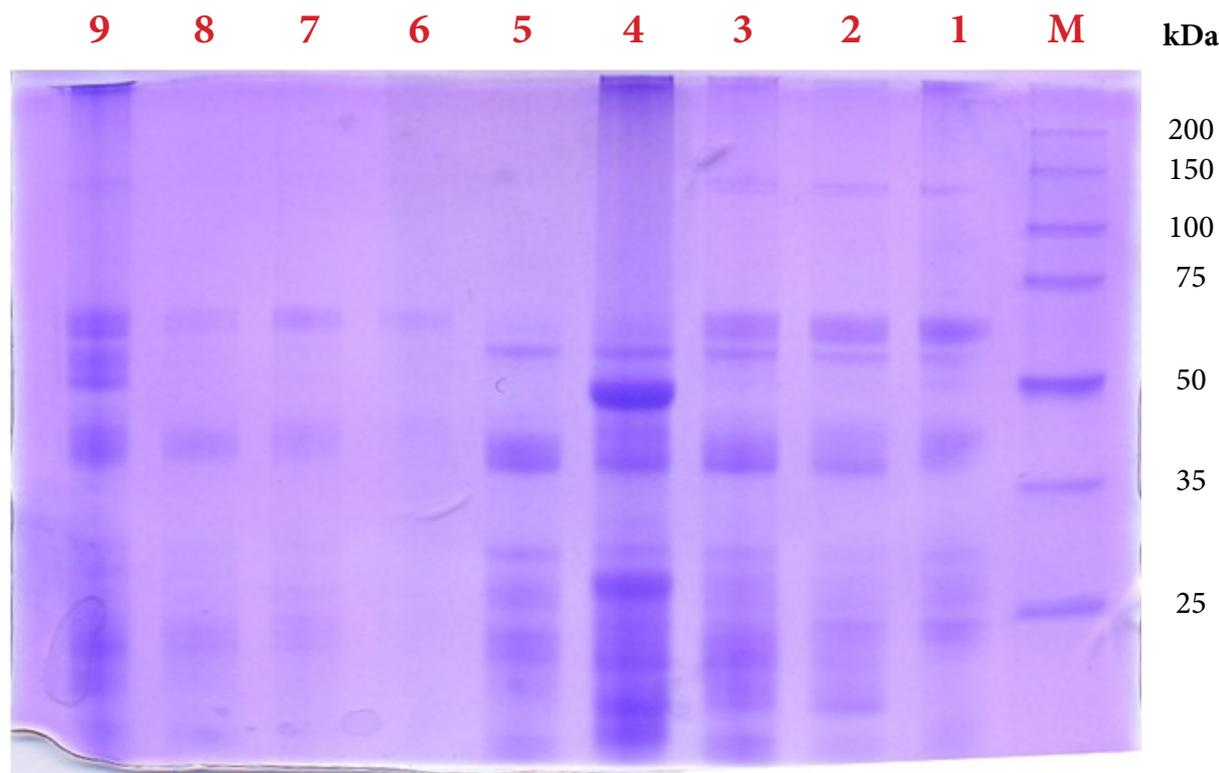
O perfil eletroforético das lectinas do gênero *Dioclea* geralmente apresentam três subunidades características (α , β , γ) com pe-

soos moleculares aparentes de 25-26 kDa, 13-14 kDa e 8-9 kDa. Entretanto os perfis das condições em estudo, obtidos por SDS-PAGE 12,5% p/v em condições desnaturantes (Figura 1), indicam a presença de uma única banda

protéica de, aproximadamente, 30 kDa, a qual corresponde à massa molecular característica do grupo de lectinas de leguminosas (LORIS, 2002).

O perfil eletroforético dos dez extratos

Figura 01 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% p/v em condições desnaturantes e redutoras dos diferentes extratos proteicos da semente de *Dioclea bicolor*. Os números indicam as condições nas quais os extratos foram obtidos (Tabela 1). M = Marcador molecular (Promega).



Fonte: Dados da pesquisa.

proteicos obtidos exibem proteínas com massa molecular em torno de 30 kDa, indicando que mesmo com o baixo rendimento obtido nas diferentes condições de extração, lectinas foram extraídas, o que pode se ver nos ensaios de AHE e inibição.

5 CONCLUSÕES

A homogeneização do material finamente pulverizado das sementes de *D. bicolor* com fosfato de sódio 0,5 M pH 8,0 durante 4 horas (condição 9) foi aquela que apresentou o maior teor de proteínas totais. Os extratos apresentaram AHE com eritrócitos de coelho, TH que variaram entre 23 a 27 e, afinidade a

açúcares da série galactose. O perfil proteico dos extratos apresentaram bandas com massa molecular em torno de 30 kDa. As condições 4 e 9, ambas utilizando fosfato de sódio 0,5 M pH 8,0, apresentaram os resultados mais satisfatórios quanto à concentração de proteínas totais e quanto ao ensaio de hemaglutinação. Indicando que sejam as melhores condições para extração e o isolamento da lectina presente na semente de *D. bicolor*.

REFERÊNCIAS

ABHILASH, J. *et al.* Metal ions in sugar binding, sugar specificity and structural stability of *Spatholobus parviflorus* seed lectin. **Journal of Molecular Modeling**, v. 19, n. 8, p. 3271-8, 2013.

- ALENCAR, N. M. N. *et al.* Neutrophil-infiltrated paw edema induced by mannose-binding Dioclea violacea lectin. **Pharmacological reports: PR**, v. 65, n. 1, p. 220–5, 2013.
- BEZERRA, M. J. B. *et al.* Crystal structure of Dioclea violacea lectin and a comparative study of vasorelaxant properties with Dioclea rostrata lectin. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 45, n. 4, p. 807–15, 2013.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–54, 1976.
- CAVADA, B. S. *et al.* Purification and partial characterization of a lectin from Dioclea virgata Benth seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 8, n. 1, p. 37–42, 1996.
- CHRISPEELS, M. J.; RAIKHEL, N. V. Lectins, lectin genes, and their role in plant defense. **The Plant Cell**, v. 3, n. 1, p. 1–9, 1991.
- FERNANDES, A. V. *et al.* Seeds of Amazonian Fabaceae as a source of new lectins. **Brazilian Society of Plant Physiology**, v. 23, n. 3, p. 237–44, 2011.
- HAMID, R. *et al.* Lectins: Proteins with diverse applications. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 3, p. 93–103, 2013.
- KOHARUDIN, L. M. I. *et al.* Structure-function analysis of a CVNH-LysM lectin expressed during plant infection by the rice blast fungus Magnaporthe oryzae. **Structure**, v. 19, n. 5, p. 662–74, 2012.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–5, 1970.
- LAM, S. K.; HAN, Q. F.; NG, T. B. Isolation and characterization of a lectin with potentially exploitable activities from caper (Capparis spinosa) seeds. **Bioscience Reports**, v. 29, p. 293–9, 2009.
- LAM, S. K.; NG, T. B. Lectins: production and practical applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 1, p. 45–55, 2011.
- LORIS, R. Principles of structures of animal and plant lectins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1572, p. 198–208, 2002.
- MATUS, A. I.; WALTERS, B. B. Type 1 and 2 synaptic junctions: Differences in distribution of Concanavalin A binding sites and stability of the junctional adhesion. **Brain Research**, v. 108, p. 249–56, 1976.
- MELGAREJO, L. M.; VEGA, N.; PÉREZ, G. Isolation and characterization of novel lectins from Canavalia ensiformis DC and Dioclea grandiflora Mart. ex Benth. seeds. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 17, n. 3, p. 315–24, 2005.
- MOREIRA, R. A. *et al.* Isolation and characterization of a lectin from the seeds of Dioclea grandiflora (Mart.). **Planta**, v. 158, n. 1, p. 63–9, 1983.
- MOREIRA, R. A. *et al.* Plant seed lectins. A possible marker for chemotaxonomy of the genus Canavalia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, p. 127–32, 1993.
- MOREIRA, R. A.; PERRONE, J. C. Purification and partial characterization of a lectin from Phaseolus vulgaris. **Plant physiology**, v. 59, p. 783–7, 1977.
- MORENO, F. B. M. B. *et al.* Identification of a new quaternary association for legume lectins. **Journal of structural biology**, v. 161, n. 2, p. 133–43, 2008.
- OLIVEIRA, J. T. A. *et al.* Purification and physicochemical characterization of a cotyledonary lectin from Luetzelburgia auriculata. **Phytochemistry**, v. 61, p. 301–10, 2002.
- OSTERNE, V. J. S. *et al.* Purification, partial characterization, and CNBr-sepharose immobilization of a vasorelaxant glucose/mannose lectin from Canavalia virosa seeds. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 7, p. 3342–53, 2014.
- PÉREZ, G. Isolation and characterization of a novel lectin from Dioclea lehmanni (Fabaceae) seeds. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 30, n. 7, p. 843–53, 1998.
- PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**, v. 109, p. 347–52, 1995.
- RAMOS, M. V. Biosynthesis and structural lectin features of the Phaseoleae, Diocleinae and the Viciaeae (Leguminosae = Fabaceae) under a phylogenetic perspective. **Journal of Comparative Biology**, v. 2, p. 129–36, 1997.
- RANGEL, T. B. A. *et al.* Crystallization and characterization of an inflammatory lectin purified from the seeds of Dioclea wilsonii. **Molecules**, v. 16, n. 6, p. 5087–103, 2011.
- RENATO, A. M. *et al.* Isolation and characterization of Dioclea altissima var. Megacarpa seed lectin. **Phytochemistry**, v. 46, n. 1, p. 5–10, 1997.
- SIERRA, A. Y.; PÉREZ, G. Extracción, purificación y caracterización de dos lectinas en semillas de Dioclea sericea. **Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales**, v. 23, n. 88, p. 445–54, 1999.
- WAN, Y. *et al.* Inhibitory effect of liposomal quercetin on acute hepatitis and hepatic fibrosis induced by concanavalin A. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 47, n. 8, p. 655–61, 2014.

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Vegetal (LFBV) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).