



**UFBA - UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

WILIAN ROSÁRIO DE OLIVEIRA

**LECTINAS DE *Crotalaria spectabilis* R.: ISOLAMENTO,
PURIFICAÇÃO E ATIVIDADE AGLUTINANTE EM *Leptospira
biflexa* (SAPRÓFITO) e *L. interrogans* (PATOGENICA).**

Salvador
2014

WILIAN ROSÁRIO DE OLIVEIRA

**LECTINAS DE *Crotalaria spectabilis* R.: ISOLAMENTO,
PURIFICAÇÃO E ATIVIDADE AGLUTINANTE EM *Leptospira*
biflexa (SAPRÓFITA) e *L. interrogans* (PATOGENICA).**

Dissertação apresentada à Universidade Federal da Bahia, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Instituto de Ciências da Saúde, para obtenção do título de mestre.

Orientador (a): Dra. Suzana Telles da Cunha Lima

Co-orientador: Dr. Evandro José Lima Rego

Salvador
2014

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de Saúde do SIBI /UFBA.

O48 Oliveira, Wilian Rosário de
Lectinas de *Crotalaria spectabilis* R: isolamento, purificação e atividade aglutinante em *Leptospira biflexa* (saprófita) e *L. interrogans* (patogênica) / Wilian Rosário de Oliveira. – Salvador, 2014.

44 f. : il.

Orientadora: Dra. Suzana Telles da Cunha Lima.

Co-Orientador: Dr. Evandro José Lima Rego.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde, 2014.

1. Lectinas. 2. *Crotalaria*. 3. *Leptospira*. I. Lima, Suzana Telles da Cunha II. Rego, Evandro José Lima. III. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU- 577.112

WILIAN ROSÁRIO DE OLIVEIRA

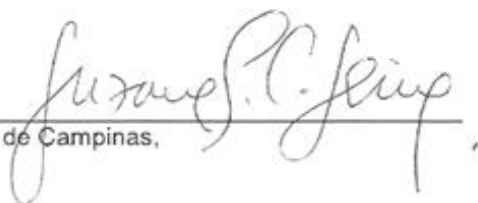
LECTINAS DE *Crotalaria spectabilis* R.: ISOLAMENTO,
PURIFICAÇÃO E ATIVIDADE AGLUTINANTE EM *Leptospira*
biflexa (SAPRÓFITA) e *L. interrogans* (PATOGENICA)

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em
Biotecnologia pelo Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

Aprovada em 30 de maio de 2014.

BANCA EXAMINADORA:

Suzana Telles da Cunha Lima – Orientadora
Doutora em Biologia Vegetal pela Universidade Estadual de Campinas,
UNICAMP, Brasil.
Universidade Federal da Bahia.



Milton Ricardo de Abreu Roque
Doutor em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada) pela Universidade Estadual Paulista Júlio de
Mesquita Filho,
UNESP, Brasil.
Universidade Federal da Bahia.



Geruza de Oliveira Ceita
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Estadual de Feira de Santana,
UEFS, Brasil.
Universidade do Estado da Bahia.



AGRADECIMENTOS

A Aialvo Oliveira, Joselita Oliveira e Hector Hugo Oliveira, meus queridos pais e irmão bem como a toda a minha família.

Aos orientadores Dra. Suzana Telles da Cunha Lima e Dr. Evandro José Lima Rego, pela excelente orientação, compromisso com a pesquisa, como também amizade e confiança.

A Dra. Paula Carvalhal Lage Von Buettner Ristow, pela colaboração científica, assim como facilitação da estrutura para realização deste estudo.

A Dr. Bruno Lopes Bastos, pela colaboração e auxílio na resolução de muitas dificuldades durante a pesquisa.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Instituto de Ciências da Saúde (ICS) da Universidade Federal da Bahia (UFBA), que contribuíram na minha formação acadêmica ao longo do curso.

A Antônio Candé, Áurea Almeida, Cíntia Almeida, Edgard Freitas, Gabriel Santos, Larissa Vasconcelos, Luã Reis, Priscyla Ribeiro e Victor Fraga, integrantes do Grupo de Pesquisa: *Bioprospecção Molecular* do Laboratório de Biologia Molecular Carmem Lemos (LBM) da UFBA, bem como a todos os meus colegas de sala que direta ou indiretamente contribuíram na minha formação acadêmica.

Aos funcionários da Universidade Federal da Bahia (UFBA), que me auxiliaram em diversos aspectos técnicos do trabalho.

A CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo apoio financeiro, através da bolsa de mestrado.

Aos laboratórios da UFBA: LABIOMAR - Laboratório de Biologia Marinha e Biomonitoramento Ambiental, LAPEMM - Laboratório de Pesquisa em Matéria Médica, LAGEV - Laboratório de Genética e Evolução Vegetal, LCTV - Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais e ao GPSQ - Grupo de Pesquisa em Síntese Química e Bioatividade Molecular pela colaboração nas pesquisas.

OLIVEIRA, Wilian Rosário de. Lectinas de *Crotalaria spectabilis* R.: Isolamento, Purificação e Atividade Aglutinante em *Leptospira biflexa* (Saprófita) e *L. interrogans* (Patogênica). 44 f. il. 2014. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciência da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador-BA, 2014.

RESUMO

Lectinas são proteínas que se ligam especificamente a resíduos de açúcar e estão envolvidas no processo de reconhecimento celular e sinalização em diversas vias metabólicas. O objetivo deste estudo foi isolar, purificar e investigar a atividade biológica das lectinas de *Crotalaria spectabilis* R. quanto a sua capacidade de hemaglutinação e aglutinação das linhagens bacterianas: *Leptospira biflexa* e *L. interrogans*. Para extração das proteínas, as sementes foram moídas e suas células lisadas em solução NaCl 0,15 M. Após essa etapa, as proteínas foram precipitadas com acetona e sulfato de amônio, dialisadas, liofilizadas e purificadas por cromatografia de filtração e troca iônica. A quantificação proteica foi realizada pelo método de Bradford e o perfil eletroforético obtido por SDS-PAGE. Para testar a atividade biológica das lectinas foram utilizados ensaios de hemaglutinação bem como de aglutinação das linhagens bacterianas. Em nossos resultados, o método de precipitação proteica por acetona resultou em maior extração quando comparado ao método por sulfato de amônio. A lectina de *C. spectabilis* R. apresentou um peso molecular de 30 kDa e os ensaios de hemaglutinação foram positivos para a proteína. Assim, concluímos que nas sementes de *C. spectabilis* R. existem lectinas com capacidade de reconhecer receptores presentes na membrana de eritrócitos humanos e promover aglutinação celular. Por fim, as lectinas da planta *C. spectabilis* R. também foram capazes de aglutinar *L. interrogans* e *L. biflexa*, sendo esta resposta mais acentuada na linhagem patogênica.

Palavras-chave: Lectinas. *Crotalaria*. *Leptospira*.

OLIVEIRA, Wilian Rosário de. *Crotalaria spectabilis* R. Lectins: Isolation, Purification and agglutinant activity in *Leptospira biflexa* (Saproling) and *L. interrogans* (Pathogenic). 44 f. il. 2014. Dissertation (master's degree) – Health Science Institute, Federal University of Bahia, Salvador-BA, 2014.

ABSTRACT

Lectins are proteins that bind carbohydrate residues with affinity and are involved in the process of cell recognition and signaling in different metabolic pathways. The aim of this study was to isolate, purify and investigate the biological activity of the *Crotalaria spectabilis* R. lectins in terms of hemagglutination and agglutination capacity of the bacterial strains: *Leptospira biflexa* and *L. interrogans*. For protein extraction, the seeds were milled and their cells lysed in 0,15 M NaCl solution. After this step, the proteins were precipitated with acetone and ammonium sulfate, dialyzed, lyophilized and purified by filtration chromatography and ion exchange, respectively. Protein quantification was performed by the Bradford method and the electrophoretic profile by SDS-PAGE. For testing the biological activities of lectins, hemagglutination assays were used as well agglutination of the bacterial strains. In our results, protein precipitation method by acetone resulted in higher yield when compared to ammonium sulfate. The *C. spectabilis* R. lectin presented a molecular weight of 30 kDa and the hemagglutination assays were positives for the protein. Thus, we conclude that in the *C. spectabilis* R. seeds there are lectins with capacity to recognize receptors present in the human erythrocytes membrane and to promote cell agglutination. At last, the seed lectin *C. spectabilis* R. was also able to agglutinate *L. interrogans* and *L. biflexa*, this response being stronger in the pathogenic strain.

Keywords: Lectins. *Crotalaria*. *Leptospira*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Estrutura das lectinas de vegetais.....	15
Figura 2	Ciclo epidemiológico.....	18
Figura 3	Patogenia e diagnóstico da leptospirose.....	19
Figura 4	Perfil cromatográfico da cromatografia de filtração.....	25
Figura 5	Perfil cromatográfico da cromatografia de troca iônica.....	25
Figura 6	Representação do gráfico de rendimento proteico.....	26
Figura 7	Perfis obtidos da eletroforese em gel de poliacrilamida.....	27
Figura 8	Diferenças entre os perfis das bandas de PCD e PSAD.....	28
Figura 9	Placa de microtitulação com eritrócitos intactos.....	29
Figura 10	Aglutinados observados em aumento de 64 x.....	30
Figura 11	Aglutinados observados em aumento de 160 x.....	31
Figura 12	Aglutinados observados em aumento de 320 x.....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação das lectinas de plantas.....	14
Tabela 2	Atividade antibacteriana das lectinas.....	33

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	12
2.1	LECTINAS.....	12
2.1.1	Função	12
2.1.2	Nomenclatura	13
2.1.3	Classificação	13
2.1.4	Síntese e distribuição nos tecidos vegetais	14
2.1.5	Estruturas	14
2.1.6	Composição química	15
2.1.7	Ligação com receptores	16
2.1.8	Aplicações	16
2.2	LEPTOSPIROSE.....	17
3	METODOLOGIA	20
3.1	MATERIAIS.....	20
3.2	EXTRAÇÃO PROTEICA.....	20
3.3	PRECIPITAÇÃO PROTEICA.....	20
3.4	DIÁLISE.....	21
3.5	LIOFILIZAÇÃO.....	21
3.6	CROMATOGRAFIA DE FILTRAÇÃO E TROCA IÔNICA	21
3.7	DOSAGEM DE PROTEÍNAS.....	22
3.8	ELETROFORESE POR SDS-PAGE.....	22
3.9	ENSAIO DE HEMAGLUTINAÇÃO.....	22
3.10	ENSAIO DE AGLUTINAÇÃO BACTERIANA.....	23
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1	MATERIAL BIOLÓGICO OBTIDO.....	24
4.2	CROMATOGRAFIA DE FILTRAÇÃO E TROCA IÔNICA.....	24
4.3	QUANTIFICAÇÃO PROTEICA.....	26
4.4	DETERMINAÇÃO DO PERFIL ELETROFORÉTICO.....	27
4.5	ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE.....	28
4.6	ATIVIDADE AGLUTINANTE DE BACTÉRIAS.....	30
5	CONCLUSÃO	34
	REFERÊNCIAS	35
	ANEXO A - Patente depositada no INPI	43

1 INTRODUÇÃO

Lectinas são proteínas com capacidade de se ligarem a carboidratos (REGO et al., 2002) e suas funções, em plantas, estão associadas aos mecanismos de defesa contra insetos bem como patógenos microbianos (DE HOFF; BRILL; HIRSCH, 2009).

As lectinas das plantas avaliadas neste estudo foram extraídas de *Crotalaria spectabilis* R. pertencente à família Fabaceae, subfamília Papilionoideae, ordem Fabales compreendendo cerca de 727 gêneros e 19.325 espécies (LEWIS et al., 2005).

O conhecimento da bioatividade das moléculas de espécies do gênero *Crotalaria* são de interesse farmacêutico, industrial e biotecnológico por apresentarem substâncias antibacterianas (CAMPO; SMEDLEY; EISNER, 2005), anti-inflamatórias, anti-hepatotóxicas (AHMED; AL-HOWIRINY; MOSSA, 2006) bem como antivirais (PACHECO; SILVA-LÓPEZ, 2010).

O objetivo deste estudo foi a purificação das lectinas de *Crotalaria spectabilis* R. através da extração, isolamento, padronização dos métodos de purificação, determinação do perfil cromatográfico e caracterização da atividade hemaglutinante e aglutinante de *Leptospira biflexa* e *L. interrogans*.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 LECTINAS

Lectinas, de acordo com Peumans e Van Damme (1995), são proteínas de origem não imune, com pelo menos um domínio não enzimático, capazes de se ligar especificamente a resíduos de carboidratos, de forma reversível.

2.1.1 Função

As lectinas estão presentes em todos os organismos: em vírus, por exemplo, para que possam infectar células animais, são necessárias interações das lectinas virais com glicanos específicos presentes na membrana celular (HU et al., 2012). Nas linhagens bacterianas, as lectinas estão envolvidas na fixação destes microrganismos aos tecidos dos hospedeiros, formação de mucos (SULÁK et al., 2011) e nos mecanismos de infecção (INOUE et al., 2003).

Em protozoários, a função das lectinas está associada ao reconhecimento celular, aumento da adesão às células do hospedeiro durante os estágios iniciais (VIEIRA et al., 2012) e ligação do parasita a outras células, microrganismos (WOOTTON et al., 2007) e tecidos, aumentando assim a virulência (VIEIRA et al., 2012). Nos fungos, as lectinas podem estar envolvidas nos processos de crescimento, dormência, mudanças morfológicas, infecções parasitárias bem como simbióticas com outros organismos, metabolismo e reconhecimento molecular durante os estágios primários da micorrização (CUNHA, 2010).

Nos invertebrados, as lectinas são encontradas na hemolinfa contribuindo na resistência a infecções como na adesão celular e na opsonização dos microrganismos invasores (LEE; SÖDERHÄLL, 2002), na formação de nódulos hemocíticos (ZIMMER, 2012) bem como na participação no processo de encapsulamento e melanização de parasitas (LING; YU, 2006). Já em vertebrados, as lectinas estão associadas a várias funções biológicas (KILPATRICK, 2002), relacionadas principalmente ao reconhecimento de moléculas mediadas por suas interações com glicídios (RAMBARUTH; DWEK, 2011). Por exemplo, defesa contra patógenos (KILPATRICK, 2002) bem como imunológica (RAMBARUTH; DWEK, 2011), participação

no tráfego de células (BOSCHER; DENNIS; NABI, 2011), ciclo celular, inibição celular por contato, apoptose, e desenvolvimento de órgãos (NUNES et al., 2012).

Por outro lado, em plantas, a bioatividade das lectinas está relacionada ao reconhecimento celular como em processos de simbiose entre bactérias do gênero *Rhizobium* e raízes de leguminosas (DE HOFF; BRILL; HIRSCH, 2009) e na compatibilidade do pólen durante a fertilização (CHRISPEELS; RAIKHEL, 1991). Além dessas propriedades, as lectinas de plantas fazem parte dos mecanismos de defesa do vegetal contra predadores (GAOFU et al., 2008), fungos (RIBEIRO et al., 2007), bactérias (RATANAPO; NGAMJUNYAPORN; CHULAVATNATOL, 2001) e vírus (WANG et al., 2013).

Devido à ocorrência em todos os organismos, as lectinas apresentam funções diferentes em uma ou mais espécies, assim estas macromoléculas são chamadas de multifuncionais.

2.1.2 Nomenclatura

Quanto a nomenclatura das lectinas, não se tem uma padronização (POVINELI; FINARDI FILHO, 2002). Assim, algumas lectinas são nomeadas com base no local onde as espécies foram isoladas ou purificadas, por exemplo, lectina isolada das sementes de *Crotalaria pallida* Aiton ou CpL (REGO et al., 2002). Outras são nomeadas a partir da especificidade ao carboidrato, isto é, lectina específica para D-galactose extraída do látex de *Synadenium carinatum* B. (SOUZA et al., 2005). Ou sua nomenclatura, baseia-se no nome científico ou popular da espécie, por exemplo, Heveina, uma lectina extraída do látex da seringueira *Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Müll. Arg. (VAN PARIJS et al., 1991).

2.1.3 Classificação

A classificação das lectinas de plantas é baseada nas sequências genéticas, estrutura da proteína e ligações aos carboidratos, sendo subdividida em sete famílias estruturalmente e evolutivamente relacionadas (ZANETTI, 2007) conforme tabela 1. Quanto a ligação ao açúcar específico, a classificação, baseia-se nos seguintes monossacarídeos: L-fucose, D-glicose, D-

mannose, D-galactose, N-acetil-D-galactosamina, N-acetil-D-glicosamina e ácido N-acetilneuramínico (VAN DAMME et al., 1998).

Tabela 1. Classificação das lectinas de plantas baseadas na especificidade da ligação aos glicídios, homologia de estruturas primárias e relação evolutiva (VAN DAMME et al., 1998).

Família das lectinas extraídas de plantas
Leguminosas
Curcubitáceas
Ligadoras de manose
Ligadoras de quitina
Relacionadas à jacalina
Relacionadas à amarantina
RIP's do tipo 2

***RIP: Proteínas inativadoras de ribossomos**

2.1.4 Síntese e distribuição nos tecidos vegetais

As lectinas de plantas são sintetizadas nos ribossomos, nos processos co-traducionais e pós-traducionais (RÜDIGER; GABIUS, 2001). No retículo endoplasmático são transportadas ao complexo de Golgi, onde serão empacotadas e secretadas para os vacúolos (RÜDIGER; GABIUS, 2001). Nestes, dividem-se em partes menores chamados de corpos proteicos, onde permanecem armazenadas na semente (RÜDIGER; GABIUS, 2001).

Em relação à distribuição nos tecidos vegetais, as lectinas estão presentes em todas as partes da planta; concentrando-se nas sementes (VENTURA, 2006). Nas outras partes da planta tal como folhas (SILVA et al., 2010), frutos (BOARI LIMA et al., 2008), caules, bulbos e cascas (TRINDADE, 2005), raízes, tubérculos, rizomas (ZANETTI, 2007) ou flores se encontram pequenas quantidades (VENTURA, 2006).

2.1.5 Estruturas

As lectinas de plantas são divididas em 4 classes (figura 1), conforme Peumans e Van Damme (1995), seguida de atualização por Van Damme et al. (1998): As merolectinas são

lectinas que têm pelo menos um CRD (domínio reconhecedor de carboidrato), ou seja, são monovalentes e conseqüentemente incapazes de precipitar glicoconjugados ou aglutinar células. As hololectinas são lectinas que possuem dois ou múltiplos CRDs idênticos ou muito similares estruturalmente sendo capazes de hemaglutinar eritrócitos e precipitar glicoconjugados. As quimerolectinas ou hemilectinas são lectinas que consistem de um ou mais CRDs e mais um domínio distinto com atividade catalítica ou com outra atividade biológica. Superlectinas são lectinas que apresentam pelo menos dois CRDs, diferentes das hololectinas devido ao fato de seus domínios serem capazes de reconhecer açúcares não relacionados estruturalmente.

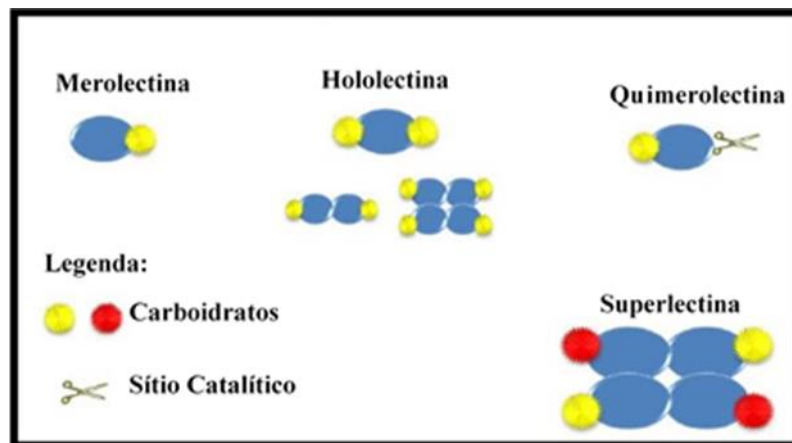


Figura 1. Estrutura das lectinas de vegetais em relação ao domínio reconhecedor de carboidrato, proposta por Peumans e Van Damme (1995), seguida de atualização por Van Damme et al. (1998) e adaptada por Simões (2011).

2.1.6 Composição química

Na estrutura das lectinas, as pontes de dissulfeto (GOMES, 2004), bem como íons metálicos divalentes (KAUSHIK; MOHANTY; SUROLIA, 2009), quando presentes são essenciais na ligação da proteína com o carboidrato. Assim, os cátions divalentes Ca^{++} , Mg^{++} , e/ou Mn^{++} quando presentes na estrutura das lectinas são responsáveis pela estabilização e função biológica destas proteínas (KAUSHIK; MOHANTY; SUROLIA, 2009).

Por outro lado, as lectinas que não requerem cátions divalentes (ZANETTI, 2007), em sua estrutura, possuem uma conformação estrutural necessária para o reconhecimento dos

glicídios. Outros fatores importantes que podem influenciar diretamente na estrutura química e função biológica das lectinas são o pH (DELATORRE et al., 2006) e a temperatura (ZANETTI, 2007).

2.1.7 Ligação com receptores

Algumas condições físico-químicas e inibidores podem afetar a associação das lectinas aos receptores dos eritrócitos interferindo na ligação. Por exemplo, Receptores insuficientes presentes na membrana da célula ou inacessíveis para ocorrer à ligação (SANTANA, 2004). Disponibilidade de glicídios presentes no meio inibe a ligação da lectina aos receptores na membrana dos eritrócitos (BATISTA, 2007). A remoção desses inibidores dos receptores da superfície da membrana deixa os sítios de ligação das proteínas livres para ligação (REGO, 2000).

Por fim, as lectinas podem aglutinar eritrócitos de espécies diferentes (PANDO et al., 2004) e às vezes apresentar diferenças entre indivíduos de mesma espécie (MACHUKA, 2000), ou ainda, não aglutinar eritrócitos humanos (PEUMANS; VAN DAMME, 1995) ou não possuir especificidade para um determinado grupo sanguíneo (REGO et al., 2002).

2.1.8 Aplicações

As lectinas podem ser utilizadas em técnicas de cromatografia de afinidade para isolamento bem como purificação de glicoproteínas, glicopeptídeos e glicanos como nos trabalhos de Kaji et al. (2007) e glicolipídios por Murthy, Voelcker e Jayaraman (2006). Essas propriedades das lectinas também tem possibilitado a conjugação com outras moléculas como enzimas (CHUNG et al., 2005), na utilização de marcadores fluorescentes (STRATHMANN; WINGENDER; FLEMMING, 2002) e em pesquisas histológicas (YIM; ONO; IRIMURA, 2001) para identificação de microrganismos (ATHAMNA et al., 2005) através da microscopia. Na conjugação das lectinas com polímeros sintéticos atuando como agentes anticancerígenos (ANDRADE et al., 2004). Além dessas propriedades, as lectinas são utilizadas como fonte de dados complementares, quando há indefinições quanto a uma classificação taxonômica em

plantas (REGO et al., 2002). Quando comparado a sequência de aminoácidos de *Crotalaria pallida* A. com as de *C. brownie*, *C. falcata*, *C. fertilis*, *C. hookeri*, *C. mucronata*, *C. pisiformis*, *C. striata*, *C. tinctoria* e *C. zuccariniana*, estas nove espécies passaram a ser sinônimas de *C. pallida* A. por apresentarem semelhanças nessas sequências (REGO et al., 2002).

Na busca de substâncias contra patógenos essas moléculas têm mostrado dados promissores como observado nas lectinas extraídas das sementes de *Crotalaria paulina* S., que apresentaram atividade inibitória sobre *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e *X. axonopodis* pv. *passiflorae* (PANDO et al., 2004). *X. axonopodis* pv. *phaseoli* e *X. axonopodis* pv. *passiflorae* são linhagem bacterianas que limitam a produção de feijões e maracujás (NAKATANI; LOPES; CAMARGO, 2009) respectivamente. Essa proteína também apresentou capacidade inibitória sobre a atividade proteolítica da placa bacteriana supragengival e na dentina (GARCIA, 2002). Já as lectinas de *C. juncea* L. foram imobilizadas em colunas cromatográficas para purificação de partículas do vírus bovino da diarreia, o que ajudou na compreensão da interação patógeno - hospedeiro (MORENO-LOPEZ et al., 1981). A capacidade das lectinas de aglutinar os vírus é devido à ligação específica a receptores presentes na superfície dos vírus (SWANSON et al., 2010).

2.2 LEPTOSPIROSE

A leptospirose é uma doença causada por *L. interrogans* que é considerada por pesquisadores como um problema econômico e de saúde pública mundial, principalmente nos países em desenvolvimento (BREINER et al., 2009). Por outro lado, as leptospiras de vida livre ou não patogênica possuem características moleculares similares as espécies patogênicas que são importantes nos estudos de ambos os grupos.

Os principais reservatórios da leptospirose são os mamíferos e estas linhagens bacterianas possuem tropismo pelos túbulos proximais dos rins, onde depois serão excretados na urina (CASTRO et al., 2011). A forma mais frequente de contrair a leptospirose é através do contato direto com a urina contendo leptospira ou de forma indireta, na exposição de fontes de água principalmente oriundas de enchentes (SOARES et al. 2014) de acordo com figura 2. As

vias de entrada da leptospira patogênica no organismo são as mucosas dos olhos, nariz, garganta e cortes ou fissuras na pele (BREINER et al., 2009).

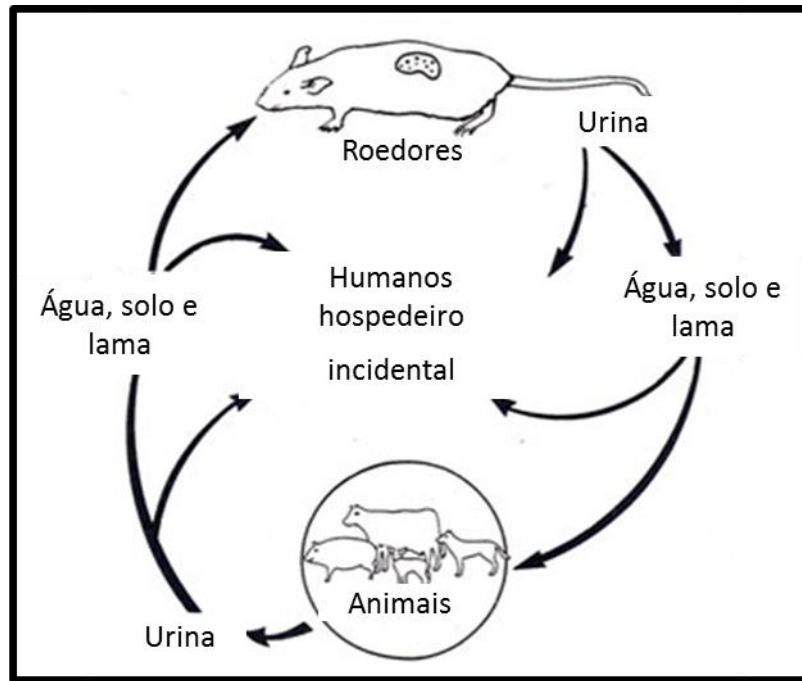


Figura 2. Ciclo epidemiológico - Fonte: Institut Pasteur¹.

O quadro clínico de um paciente com leptospirose apresenta na fase inicial infecções subclínicas, seguido de auto-limitada e final com hemorragia pulmonar, miocardite, insuficiência renal, hepática associada a icterícia (LEE et al., 2002) conforme figura 3. Os sintomas, nos seres humanos, irão variar a depender das espécies de leptospiras, sorovar, idade, estado de saúde e imunitário do paciente (BREINER et al., 2009).

O diagnóstico laboratorial da leptospirose é realizado na fase inicial por Reação em cadeia da polimerase (PCR) e tardio pelo Teste de imunoenensaio sorológico (Elisa-Igm) bem como o Teste de soroaglutinação microscópica (MAT), entretanto essas duas últimas técnicas possuem baixa sensibilidade na fase inicial da doença, pois os títulos de anticorpos podem ser indetectáveis ou muito baixos (RISTOW; LILENBAUM, 2010), ver figura 3.

¹Disponível em: < <http://www.pasteur.fr/en/research/microbiology/units-groups/biology-spirochetes/research-project> >. Acesso em: 20 fevereiro 2014.

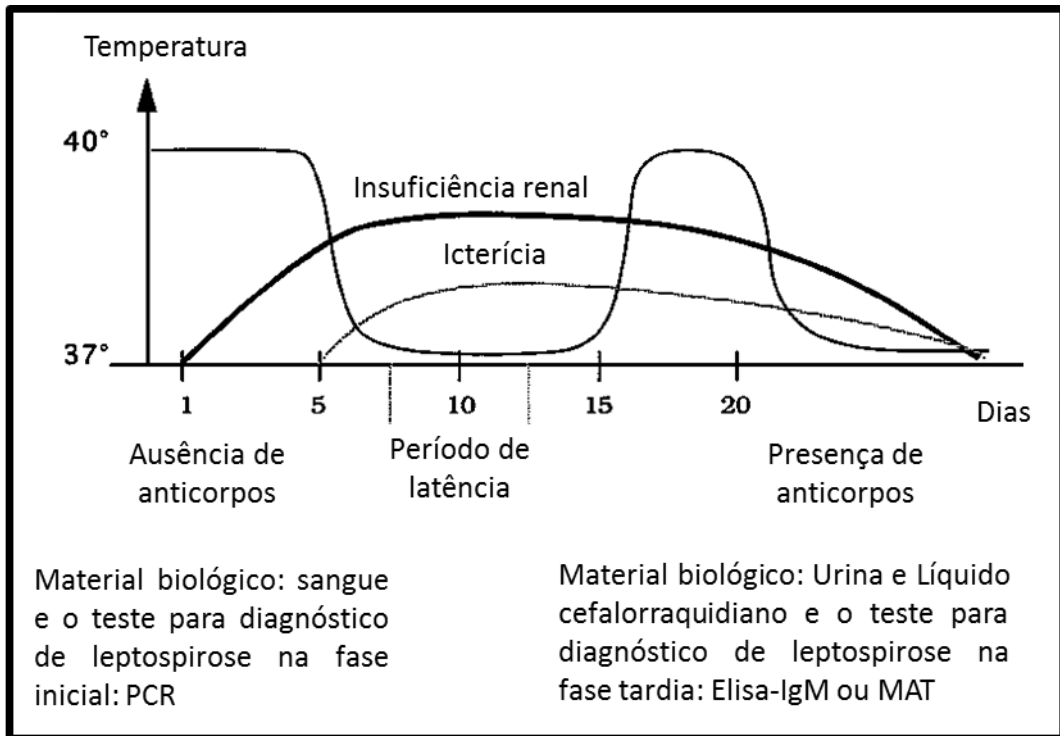


Figura 3. Patogenia e diagnóstico da leptospirose. Fonte: Clinical guidelines - Diagnostic and treatment manual².

Sendo assim, necessita-se de novas técnicas de diagnóstico principalmente na fase inicial da doença evitando o óbito de pacientes nos casos mais graves da doença (RISTOW; LILENBAUM, 2010).

²Disponível em: < Fonte: <http://www.nzdl.org/gsdImod?e=d-00000-00---off-0hdl--00-0---0-10-0---0---0direct-10---4-----0-11--11-en-50---20-about---00-0-1-00-0-0-11-1-1utfZz-8-00&cl=CL3.34&d=HASH989caf72304a596038f2a1.17&hl=0&gc=0>2> >. Acesso em: 20 fevereiro 2014.

3 METODOLOGIA

3.1 MATERIAIS

As sementes de *Crotalaria spectabilis* Roth foram doadas pelo Instituto Agronômico de Campinas, em Campinas, São Paulo e armazenadas num freezer a 4 °C, no Laboratório de Genética da Universidade do Estado da Bahia – Campus II, Alagoinhas, bem como no Laboratório de Biologia Molecular Carmen Lemos do Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia.

3.2 EXTRAÇÃO PROTEICA

Foram triturados 45 g de sementes da espécie *Crotalaria spectabilis* R., a este material, adicionou-se solução de NaCl (J. T. baker) à 0,15 M (1:10 g/v) (PANDO et al., 2004) sobre agitação, num agitador magnético (Quimis q221m), por 12 hs, em temperatura ambiente. Posteriormente, esse material foi centrifugado, numa centrífuga (Excelsa fanem 206 digital), a 14.000 rpm, durante 10 min, sendo o precipitado descartado, e o sobrenadante utilizado nas próximas etapas.

3.3 PRECIPITAÇÃO PROTEICA COM ACETONA E SULFATO DE AMÔNIO

O sobrenadante obtido da etapa anterior foi aliquoteado em duas partes (130 ml) e foi adicionado acetona (Química moderna) numa delas, sob agitação, a 4 °C, até a concentração final de 80% (v/v) por 5 h. Posteriormente, esse material foi centrifugado a 14.000 rpm, durante 10 min. Ao final, o sobrenadante foi descartado e o precipitado proteico espalhado, em placas de Petri, em temperatura ambiente (REGO et al., 2002). Aos outros 130 ml, adicionou-se sulfato de amônio (Synth), sob agitação a 4 °C até a concentração final de 80% (v/v) (BUSTOS, 2012)

por 5 h. Em seguida, esse material foi centrifugado a 14.000 rpm durante 10 min., o sobrenadante descartado e o precipitado proteico utilizado nas próximas etapas.

3.4 DIÁLISE

Os *pellets* obtidos das centrifugações foram ressuspensos em tampão Tris (J. T. baker) - HCl (Fmaia) 0,05 M, pH 8,0, num pHmetro (Digital pg 1800), e posteriormente dialisados, num saco de diálise (Inlab), contra água destilada, por 24 h, a 4 °C.

3.5 LIOFILIZAÇÃO

Os precipitados proteicos de ambas as amostras citadas da etapa anterior foram congelados a - 70 °C, e em seguida, liofilizados no liofilizador (Christ alpha 1-4/2-4 ldplus).

3.6 CROMATOGRAFIA DE FILTRAÇÃO E TROCA IÔNICA

Foi utilizado o sistema aberto de cromatografia em ambos os procedimentos. Para realização da cromatografia de filtração, empacotou-se a coluna com resina Sephadex A-100 (Ge healthcare) e esta foi equilibrada com Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0 contendo 0,15 M NaCl até que a absorvância à 280 nm do eluato atingisse valores inferiores à 0,02 nm. Em seguida, o material liofilizado (0,57 g) foi ressuspense em Tris-HCl, pH 8,0 contendo 0,15 M NaCl (2% do volume total da coluna) e aplicado na coluna. As frações foram coletadas em alíquotas de 10 ml e a leitura de absorvância foi realizada em espectrofotômetro (Femto 800 xi) a 280 nm (PANDO et al., 2004).

Empacotou-se a coluna de troca iônica com resina DEAE Sephadex A-50 (Ge healthcare), a qual foi equilibrada com tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0 até que a absorvância atingisse valores inferiores a 0,02 nm. As frações com atividade biológica da etapa anterior foram reunidas, liofilizadas, pesadas (o equivalente a 0,17g) e ressuspensas em Tris-HCl 0,05

M, pH 8,0. As proteínas foram eluídas da coluna de troca iônica, utilizando-se um gradiente de 0 a 0,5 M de NaCl, em tampão Tris-HCl, 0,05 M, pH 8,0. As frações foram coletadas e as leituras de absorvância foram realizadas em espectrofotômetro, à 280 nm (PANDO et al., 2004).

3.7 DOSAGEM DE PROTEÍNAS

As diferentes amostras obtidas durante as etapas de extração, precipitação, diálise, e cromatografias foram quantificadas pelo método de Bradford (1976), sendo a absorvância medida a 595 nm e comparadas a uma curva padrão de BSA (soro de albumina bovina) nas concentrações de 0 – 1,0 µg/µl.

3.8 ELETROFORESE POR SDS-PAGE

Os géis desnaturantes (SDS-PAGE) foram realizados conforme método de Laemmli (1970) na concentração de 12,5%, à 90 V. A coloração foi realizada pelo método utilizado por Mortz et al. (2001) com nitrato de prata usando marcadores (Invitrogen) para determinação dos pesos moleculares.

3.9 ENSAIO DE HEMAGLUTINAÇÃO

Foram coletados assepticamente 3 ml de sangue humano do tipo A, identificado e homogeneizado com solução de Alserver (1:3 v/v) bem como centrifugado por 10 min, a 2.500 rpm. Após descarte do sobrenadante, o *pellet* foi ressuspensado em solução salina (1:3 v/v) seguida de nova centrifugação nas mesmas condições (2.500 rpm/10 min), em temperatura ambiente. O procedimento foi realizado 4 vezes, até a completa lavagem dos eritrócitos.

Em placas de microtitulação (Sigma) foram adicionados 50 µl de solução salina NaCl 0,15 M em cada poço. Posteriormente, foram acrescentados 50 µl das amostras proteicas, nos primeiros poços da coluna e diluídas serialmente de 5 µg/µl (concentração inicial) até 0,005

$\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (concentração final) com oito repetições por amostras até o penúltimo poço. Após isso, adicionou-se em todos os poços 50 μl de suspensão de eritrócitos a 2,5 % (v/v). A última coluna representou o controle, sem material proteico. O mesmo procedimento foi realizado, em triplicata, com as lectinas obtidas durante as diferentes etapas de purificação. Os ensaios foram realizados com eritrócitos intactos.

As análises da placa de microtitulação foram realizadas após 2 h de incubação à temperatura ambiente.

3.10 ENSAIO DE AGLUTINAÇÃO BACTERIANA

Foram testados os eluatos com atividade biológica de *Crotalaria spectabilis* R. obtidos por cromatografia de filtração e troca iônica, em cultivos de leptospiros patogênicos e saprófitas, para observar o potencial aglutinante das lectinas nestas células. As cepas bacterianas foram doadas pelo Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz, FIOCRUZ-BA e o meio de crescimento foi o EMJH (Ellinghausen & McCullough Johnson & Harris). A metodologia utilizada foi de acordo com Jebor, Jalil (2013), Utarabhand, Rittidach e Pajit (2007) com modificações.

Dividiu-se a lâmina em quatro partes, em seguida, adicionou 20 μl (2×10^8 Células) do cultivo de *Leptospira interrogans* sorovar Lai Lai 56601 (contagem celular em câmara de Petroff-Hausser), em todas as partes desta. A primeira e a segunda parte da lâmina continham 20 μl da proteína sem diluição e diluída na proporção (1; 1:4), respectivamente. Já a terceira e a quarta tinham 20 μl do tampão de ressuspensão da proteína (NaCl 0,15 M) e 20 μl do cultivo de *L. interrogans* sorovar Lai Lai 56601, respectivamente, que representaram o controle.

As análises das lâminas foram realizadas no microscópio de campo escuro (Zeiss) com aumentos de 64 x, 160 x e 320 x em triplicatas. O mesmo procedimento foi realizado para *L. biflexa* sorovar Patoc Patoc 1.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 MATERIAL BIOLÓGICO OBTIDO

Foram obtidas amostras relacionadas as diferentes etapas de purificação, que incluíram: os extratos brutos, os precipitados com acetona e sulfato de amônio, o material dialisado e os eluatos advindos da cromatografia de filtração e de troca iônica, a partir das etapas de purificação proteica. A partir desses materiais, obteve-se o perfil proteico das etapas de purificação via SDS-PAGE, os quais revelaram o grau de pureza das amostras nos estágios subsequentes e auxiliaram na padronização de um protocolo que permitisse maior rendimento e pureza da proteína final.

4.2 CROMATOGRAFIA DE FILTRAÇÃO E TROCA IÔNICA

A figura 4 representa, o perfil cromatográfico da cromatografia de filtração em Sephadex A-100. O material eluído foi avaliado quanto a atividade hemaglutinante e o perfil eletroforético em SDS-PAGE. Os eluatos que demonstraram resultado positivo nos testes de hemaglutinação confirmaram a presença de lectinas nas sementes de *Crotalaria spectabilis* R. e seguiram para a cromatografia de troca iônica. As outras proteínas que não tiveram capacidade aglutinante foram descartadas.

A figura 5 representa, o perfil cromatográfico de cromatografia de troca iônica em DEAE Sephadex A-50, usando tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0 com gradiente de 0 a 0,5 M NaCl e fluxo de 5 ml/min.

Os eluatos com atividade biológica foram coletados e o perfil proteico determinado em SDS-PAGE. Essas frações com capacidade aglutinante confirmaram a presença de lectina nesta planta, demonstrando peso molecular equivalente ao encontrado previamente no gênero.

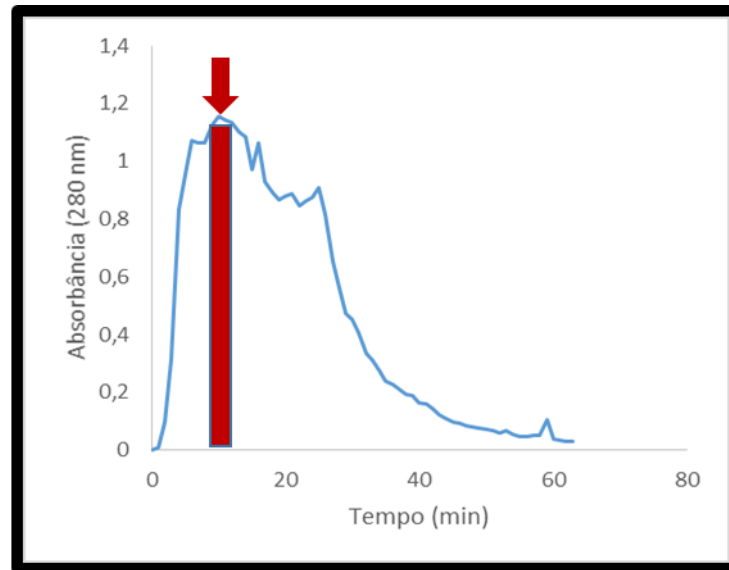


Figura 4. Representação do perfil cromatográfico das frações hemaglutinantes obtidas da cromatografia de filtração em Sephadex A-100, a área e a seta preenchidas em vermelho indicam o pico com atividade biológica.

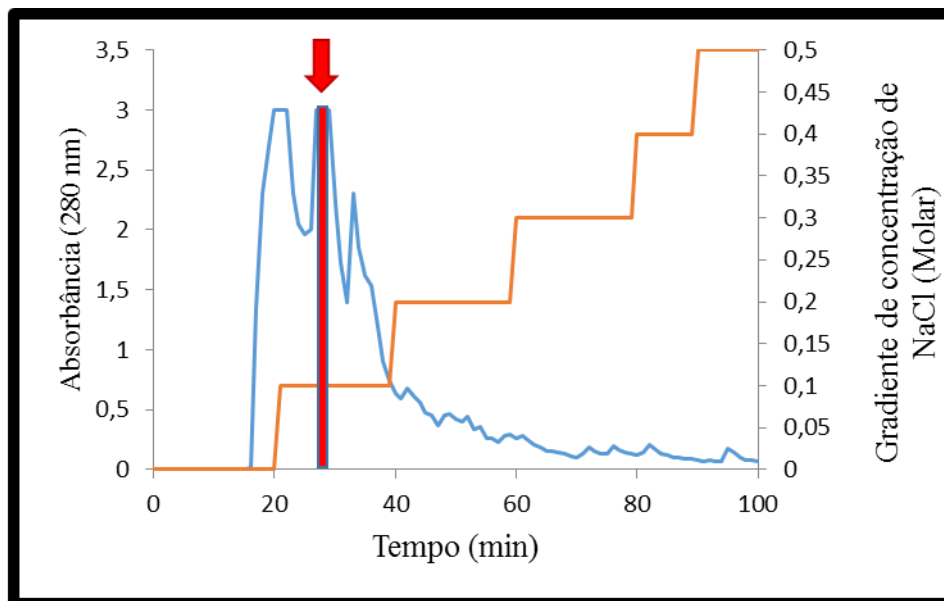


Figura 5. Perfil cromatográfico do eluato obtido da cromatografia de filtração em DEAE Sephadex A-50, a área e a seta preenchidas de vermelho representam o pico com atividade biológica da lectina.

4.3 QUANTIFICAÇÃO PROTEICA

Foram obtidos os rendimentos proteicos das frações extraídas das sementes de *Crotalaria spectabilis* R. nas diferentes etapas de purificação, conforme a figura 6.

A partir dos dados da quantificação foi possível padronizar a concentração de proteínas (em µg) aplicada no gel.

Pode ser observado também, na figura 6, que o método de precipitação proteica por acetona resultou em maior rendimento quando comparado ao método de precipitação por sulfato de amônio, além de não requerer uma etapa posterior de diálise, a qual é feita para a remoção de sais na amostra, antes de prosseguir para as etapas cromatográficas. Somado à isso, no perfil eletroforético em SDS-PAGE, pôde se observar um número menor de bandas na amostra precipitada com acetona, mostrando maior eficiência deste método. Assim, estas amostras foram selecionadas e prosseguiram para cromatografia de filtração.

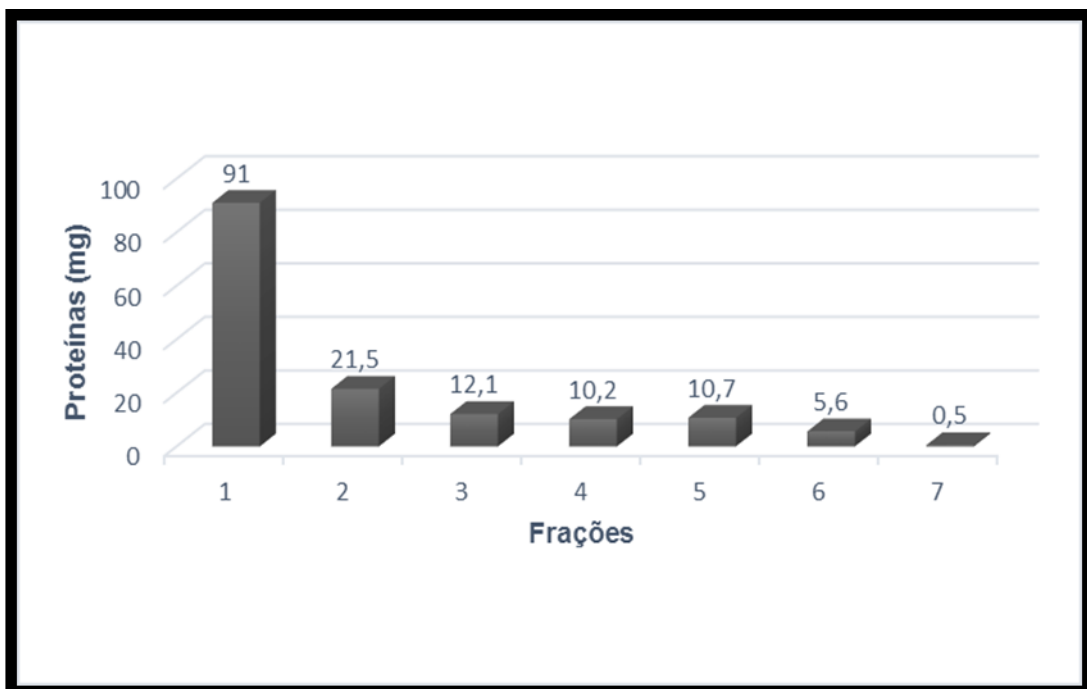


Figura 6. Gráfico de rendimento proteico: 1 (Extrato bruto); 2 (Precipitado a partir de acetona); 3 (Precipitado a partir de sulfato de amônio); 4 (Tratamento por acetona dializado); 5 (Tratamento por sulfato de amônio dializado); 6 (Eluato obtido da cromatografia de filtração); 7 (Eluato obtido da cromatografia de troca iônica).

4.4 DETERMINAÇÃO DO PERFIL ELETROFORÉTICO

O perfil eletroforético foi obtido por SDS-PAGE e análise do gel no programa Gel Analyzer 2010. Resultados confirmaram que o peso molecular aparente da lectina de *Crotalaria spectabilis* R. é de 30 kDa, conforme figura 7.

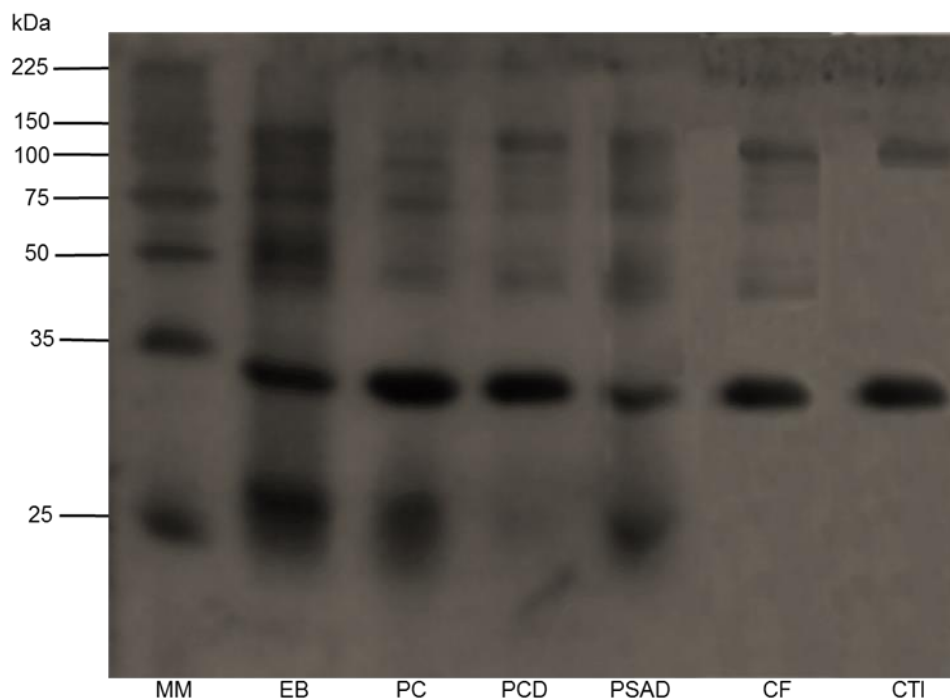


Figura 4. Perfis eletroforéticos obtidos por SDS-PAGE ao aplicar 4 μ g de proteínas em todas as *lanes* utilizando um gel de 12,5% sob condições redutoras: MM (Marcador de peso molecular); EB (Extrato bruto); PC (Precipitado cetônico); PCD (Precipitado cetônico dialisado); PSAD (Precipitado com sulfato de amônio dialisado); CF (Eluato obtido da cromatografia de filtração) e CTI (Eluato obtido da cromatografia de troca iônica).

Ao analisar, os perfis eletroforéticos das proteínas precipitadas por acetona após diálise, observou-se que estes se mostraram mais puros (menor número de bandas) do que aqueles provenientes da precipitação por sulfato de amônio (dialisado) (figura 8).

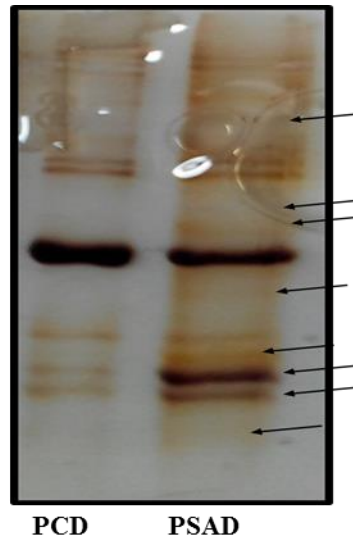


Figura 8. Diferenças no perfil proteico obtido dos dois métodos de precipitação: PCD (Precipitado por acetona dialisado) e PSAD (Precipitado com sulfato de amônio dialisado). As bandas equivalentes aos peptídeos são indicadas pelas setas.

Quando comparado o perfil eletroforético das lectinas de *Crotalaria spectabilis* R. com outras espécies do gênero *Crotalaria*: *C. paulina* S. (PANDO et al., 2004), *C. pallida* A. (REGO et al., 2002), *C. striata* D. (KHANG; JEAN-LUC; HOEBEKE, 1990), *C. juncea* L. (ERSSON, 1977), estes apresentam o mesmo peso de 30 kDa. Esse resultado corrobora com dados de lectinas de leguminosas obtidos na literatura, que apresentam geralmente de duas a quatro subunidades em torno de 25 a 30 kDa sendo que cada uma dessas subunidades possui um sítio de ligação para cada glicídio (SHARON; LIS, 1990).

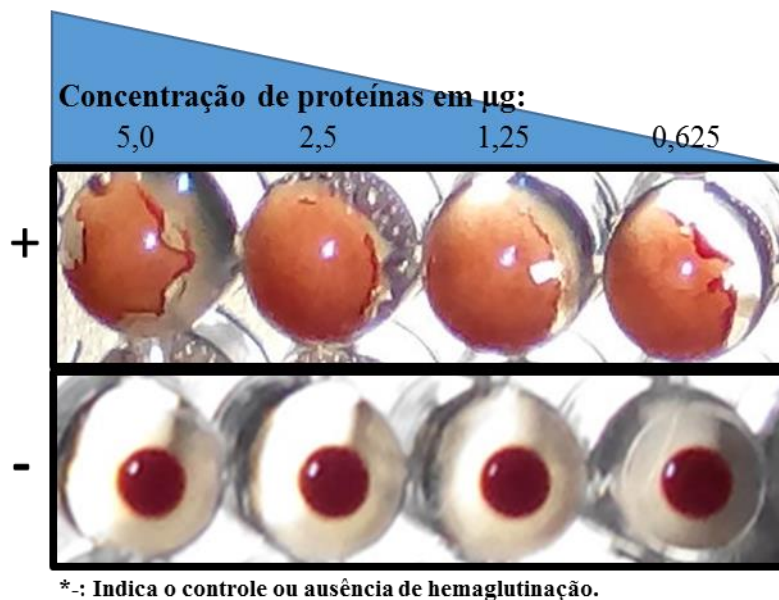
Com base nas análises da figura 7, verificou-se um nível razoável de purificação, observando-se apenas uma banda contaminante de alto peso molecular de aproximadamente 100 kDa, caracterizando o grau de pureza da lectina de *C. spectabilis* R. como parcialmente purificada.

4.5 ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE

Todas as frações obtidas das diferentes etapas de purificação: extrato bruto, precipitado cetônico e sulfato de amônio, bem como os eluatos advindos da cromatografia de filtração e de troca iônica foram positivas para atividade hemaglutinante. Esses resultados, confirmam a

presença de lectinas nas sementes de *Crotalaria spectabilis* R. corroborando com os dados de Rüdiger e Gabius (2001), pois os compostos presentes no extrato como terpenóides, alcaloides e outros, não apresentam capacidade de se ligar a carboidratos, aglutinar células e nem de precipitar glicoconjugados, o que é uma característica exclusiva das lectinas.

A confirmação da atividade hemaglutinante foi feita por visualização da formação, posterior a uma hora de incubação, de uma malha ou rede de hemácias que cobre o fundo e os lados dos poços. Por outro lado, foram considerados negativas as amostras onde se formou um botão compacto de células no fundo do poço, conforme a figura 9.



*-: Indica o controle ou ausência de hemaglutinação.

Figura 9. Placa de microtitulação com eritrócitos intactos tipo A⁺: + (Fileira com diluição seriada, indicando hemaglutinação).

Assim sendo, conclui-se que nas sementes de espécies do gênero *Crotalaria* existem proteínas capazes de reconhecer os receptores presentes na membrana dos eritrócitos humanos ligando-se a estes e promovendo a aglutinação celular. O isolamento e purificação parcial desta proteína foi feita pela primeira vez a partir de sementes desta espécie de leguminosa.

4.6 ATIVIDADE AGLUTINANTE DE BACTÉRIAS

As lectinas isoladas das sementes de *Crotalaria spectabilis* R. ou CsL mostraram resultados positivos para aglutinação em cultivos de *Leptospira interrogans* sorovar Lai Lai 56601 (Patogênica) e *L. biflexa* sorovar Patoc Patoc 1 (saprófitas) de acordo com as figuras 10 a 12.

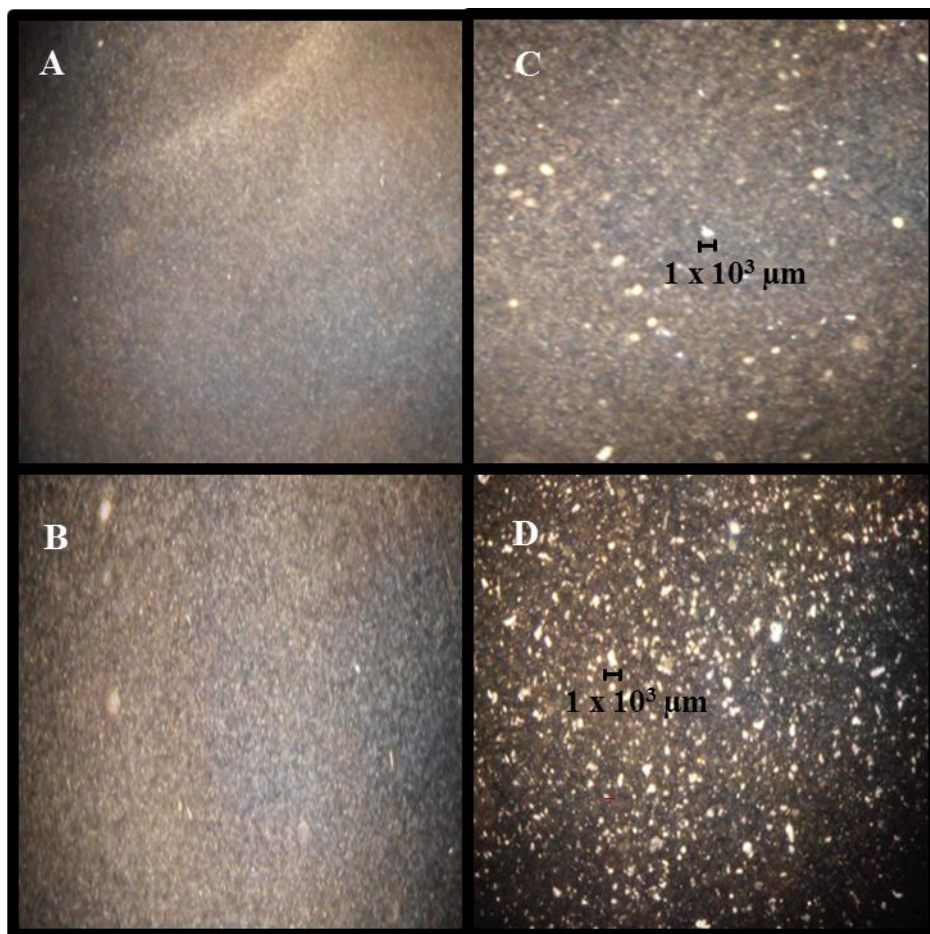


Figura 10. Teste de aglutinação com *Leptospira interrogans* (patogênicas) na presença de lectinas parcialmente purificadas de *Crotalaria spectabilis* R., em aumento de 64 x. A. Representação do controle com cultivo de *Leptospira*, sem a proteína; B. Controle com o tampão de ressuspensão da lectina (NaCl 0,15 M) com (A); C. Aglutinados entre as linhagens bacterianas e as lectinas diluída (1:4); D. Aglutinados entre as linhagens bacterianas com lectinas sem diluição.

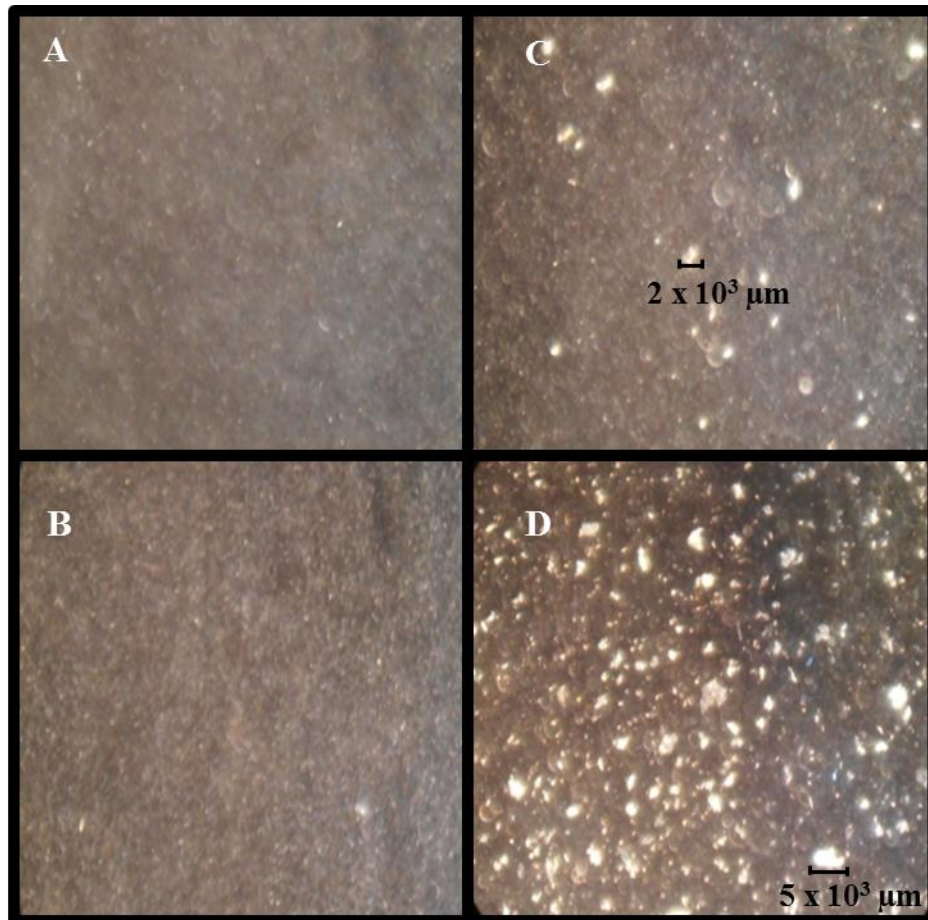


Figura 11. Teste de aglutinação com *Leptospira interrogans* e lectinas de *Crotalaria spectabilis* R. (aumento de 160 x). A. Controle com cultivo da linhagem bacteriana; B. Controle com tampão de ressuspensão da proteína (NaCl 0,15 M) com (A); C. Aglutinados da linhagem bacteriana com a lectina diluída (1:4); D. Aglutinados da linhagem bacteriana com lectinas sem diluição.

Os resultados indicam que ocorrem interações moleculares entre as lectinas da semente de *Crotalaria spectabilis* R. e as bactérias *Leptospira biflexa* e *L. interrogans*, possivelmente devido as ligações destas proteínas aos carboidratos ou glicoconjugados presentes na superfície das linhagens (figuras 11 – 12). Com base na figura 12, pode-se observar diferenças na formação dos aglutinados, em *Leptospira biflexa* com morfologia filamentosa e em *L. Interrogans* com formato de grumos, possivelmente devido as diferentes posições dos receptores de superfície nas linhagens bacterianas.

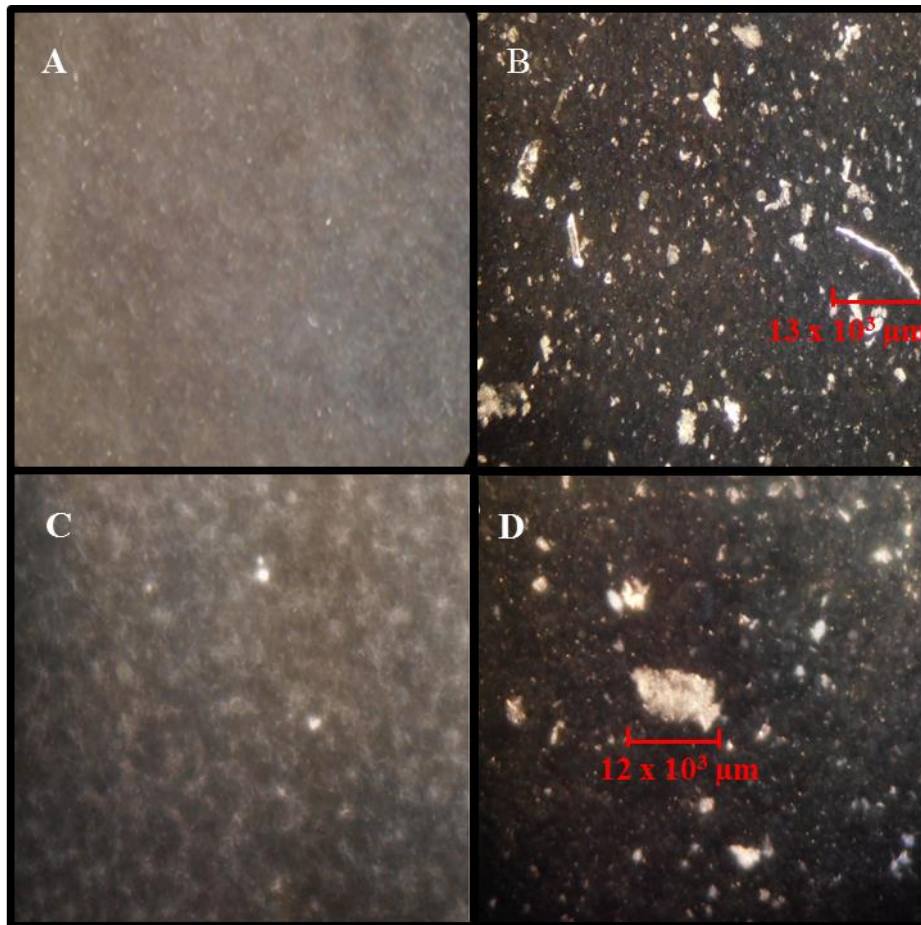


Figura 12. Representação de Aglutinados formados a partir de *Leptospira* na presença de lectinas de *Crotalaria spectabilis* R. (Em aumento de 320 x): A. Controle com cultivo de *L. biflexa*, sem proteína; B. Ligação da lectina de *C. spectabilis* R. com *L. biflexa*; C. Controle com cultivo de *L. interrogans*, sem lectina; D. Ligação da lectina de *C. spectabilis* R. com *L. interrogans*.

A interação lectina-bactéria é dependente dos receptores presentes na membrana destes procariotos e do reconhecimento específico das proteínas livres no meio (JEBOR; JALIL, 2013). Alguns trabalhos mostram a atividade bactericida desta proteína, por mecanismo de ação diferente dos antibióticos mais comuns (TALAS-OĞRAŞ et al., 2005). Sugere-se que a ligação da lectina com N-acetilglicosamina (RATANAPO; NGAMJUNYAPORN; CHULAVATNATOL, 2001) ou ácido N-acetilmurâmico está relacionado com a atividade aglutinante devido esses carboidratos estarem presentes nas superfícies das linhagem bacterianas (AYOUBA et al., 1994).

De acordo com os dados obtidos em nosso estudo, os ensaios *in vitro* com lectinas de *Crotalaria spectabilis* R. demonstraram atividade aglutinante contra *Leptospira biflexa* e *L. Interrogans*, sendo que esta bioatividade demonstrou ser mais intensa na espécie patogênica (figura 12). Quando comparou-se os resultados obtidos com o de outras lectinas, viu-se que essa

aglutinação pode ser reflexo de atividade bactericida, indicando que as lectinas desempenham um papel na defesa contra procariotos patogênicos (JEBOR; JALIL, 2013) (Tabela 2).

Tabela 2. Atividade aglutinante das lectinas

Lectinas	Bactérias	Atividade bactericida
MLL1	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. Mori	√
PmL	<i>Vibrio harveyi</i>	√
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	√
	<i>Vibrio vulnificus</i>	√
	<i>Vibrio cholera</i>	X
	<i>Escherichia coli</i>	X
	<i>Salmonella typhi</i>	X
CrpL	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. passiflorae	√
	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. phaseoli	√
CsL	<i>Leptospira interrogans</i>	√
	<i>Leptospira biflexa</i>	√

*(√): Atividade aglutinante

*(x): Ausência de atividade aglutinante

*MLL1: Lectina isolada da folha de *Morus alba* L. (RATANAPO; NGAMJUNYAPORN; CHULAVATNATOL, 2001)

*PmL: Lectina isolada da hemolinfa de *Penaeus merguensis* (UTARABHAND; RITTIDACH; PALJIT, 2007)

*CrpL: Lectina isolada da semente de *Crotalaria paulina* S. (PANDO et al., 2004)

*CsL: Lectina isolada da semente de *C. spectabilis* R.

Dessa forma, o estudo abordado possibilita que as lectinas de *Crotalaria spectabilis* R. funcionem como uma ferramenta molecular em novos estudos envolvendo *Leptospira biflexa* e *L. interrogans*. Também possibilita perspectivas, para que essas proteínas possam ser utilizadas em um teste diagnóstico rápido para detecção da doença em seus estágios iniciais, o que pode vir a evitar o óbito em alguns casos mais agressivos da doença.

5 CONCLUSÃO

O presente estudo realizou o isolamento e purificação parcial, pela primeira vez, de lectinas da semente de *Crotalaria spectabilis* R. através da cromatografia de filtração e de troca iônica. A proteína demonstrou ter peso molecular de 30kDa de acordo com resultado de SDS-PAGE após *batch* de cromatografias. Esse peso molecular é o mesmo encontrado para outras lectinas das sementes do mesmo gênero. Além dos testes de aglutinação sanguínea, regularmente feitos para se confirmar a identidade destas proteínas, outro, usando células de linhagens bacterianas causadoras da leptospirose, também foram executados. A capacidade aglutinante com linhagens bacterianas de leptospiros possibilita um novo diagnóstico da doença, ainda em estágios iniciais, quando os testes imunológicos não são eficientes, visto que ainda não houve tempo para produção de anticorpos. Somado a isso, como consequência desta capacidade aglutinante, levanta-se uma hipótese de que talvez estas proteínas impeçam a formação de biofilme, necessário para o estabelecimento da doença. Novos testes são necessários para confirmar estas possibilidades, assim como para se estabelecer um kit de diagnóstico rápido. Os mecanismos de ação das lectinas de *C. spectabilis* R. em *L. biflexa* e *L. interrogans*, bem como os mecanismos de interação destas proteínas com as linhagens bacterianas ainda precisam ser investigados. Assim, os dados obtidos neste estudo podem ser utilizados para que as lectinas de *C. spectabilis* R. funcionem como ferramenta molecular na descoberta de produtos biotecnológicos inovadores.

REFERÊNCIAS

AHMED, B.; AL-HOWIRINY, T. A.; MOSSA, J. S. Crotalic and emarginelic acids: Two triterpenes from *Crotalaria emarginella* and anti-inflammatory and anti-hepatotoxic activity of crotalic acid. **Phytochemistry Journal**, [S.l.], v. 67, n. 10, p. 956- 964, Apr. 2006.

ANDRADE, C. A. S. et al. Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 278, n. 2, p. 435-445, Jul. 2004.

ATHAMNA, A et al. Rapid identification of Mycobacterium species by lectin agglutination. **Journal of Microbiological Methods**, [S.l.], v. 65, n. 2, p. 209 - 15, May 2005.

AYOUBA, A. et al. Interactions of plant lectins with the components of the bacterial cell wall peptidoglycan. **Biochemical Systematics and Ecology**, [S.l.], v. 22, n. 2, p. 153 – 159, Mar. 1994.

BATISTA, F. A. H. **Isolamento e caracterização da lectina camptosemina extraída das sementes de *Camptosema ellipticum***. 2007. 88 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) - Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 2007.

BOARI LIMA, A. J. et al. Chemical characterization of the jaboticaba fruits (*Myrciaria cauliflora* Berg) and their fractions. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, [S.l.], v. 58, n. 4, p. 416 – 21, Dec. 2008.

BOSCHER, C.; DENNIS, J. W.; NABI, I. R. G. Glycosylation, galectins and cellular signaling. **Current Opinion in Cell Biology**, [S.l.], v. 23, n. 4, p. 383 - 393, Aug. 2011.

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**, [S.l.], v. 72, n. 1–2, p. 248 – 254, May 1976.

BREINER, D. D. et al. *Leptospira interrogans* Binds to Human Cell Surface Receptors Including Proteoglycans. **Infection and Immunity**, [S.l.], v. 77, n. 12, p. 5528 - 5536, Dec. 2009.

BUSTOS, J. A. R. **Uso dos extratos naturais de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) para tratamento de águas contendo resíduos orgânicos**. 2012. 124 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

CAMPO, M. L.; SMEDLEY, S. R.; EISNER, T. Reproductive benefits derived from defensive plant alkaloid possession in an arctiid moth (*Utetheisa ornatrix*). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S.l.], v. 102, n. 38, p. 13508 – 13512, Sep. 2005.

CASTRO, J. R. et al. Sorovares de *Leptospira spp.* predominantes em exames sorológicos de caninos e humanos no município de Uberlândia, Estado de Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba – MG, v. 44, n. 2, p. 217 - 222, Mar./Abr. 2011.

CHRISPEELS, M. J.; RAIKHEL, N. V. **Lectins, lectin genes, and their role in plant defense**. **The Plant Cell**, [S.l.], v. 3, n. 1, p. 1 – 9, Jan. 1991.

CHUNG, M.-C. et al. Latenciação e formas avançadas de transporte de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 41, n. 2, p. 155 – 180, Abr./Jun. 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-93322005000200004>>. Acesso em: 12 Fev. 2013.

CUNHA, D. C. S. **Purificação, caracterização e efeitos imunomodulatório e antiproliferativo de uma lectina do fungo *Clavaria cristata* (Holmsk) Pers.** 2010. 54 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2010.

DE HOFF, P. L, BRILL, L. M.; HIRSCH, A. M. Plant lectins: the ties that bind in root symbiosis and plant defense. **Molecular Genetics and Genomics**, [S.l.], v. 282, n. 1, p. 1 – 15, July 2009.

DELATORRE, P. et al. Crystal structure of a lectin from *Canavalia maritima* (ConM) in complex with trehalose and maltose reveals relevant mutation in ConA-like lectins. **Journal of Structural Biology**, [S.l.], v. 154, n. 3, p. 280 - 6, Apr. 2006.

ERTL, B. et al. Lectin-mediated bioadhesion: preparation, stability and caco-2 binding of wheat germ agglutinin-functionalized Poly(D,L-lactic-co-glycolic acid)-microspheres. **Journal of Drug Targeting**, [S.l.], v. 8, n. 3, p. 173 – 84, 2000.

ERSSON, B. A. Phytohemagglutinin from Sunn hemp seeds (*Crotalaria juncea*). II. Purification by a high capacity biospecific affinity adsorbent and its physicochemical properties. **Biochimica et Biophysica Acta**, [S.l.], v. 494, n. 1, p. 51 – 60, Sep. 1977.

GAOFU, Q. et al. In vitro assessment of plant lectins with anti-pinwood nematode activity. **Journal of Invertebrate Pathology**, [S.l.], v. 98, n. 1, p. 40 – 5, May 2008.

GARCIA, M. B. O. **Influência da lectina de *Crotalaria paulina* e lectina do veneno de serpente *Bothrops jararacuçu* sobre a atividade proteolítica da microbiota cariogênica.** 2002. 119 f. Tese (Doutorado em Biologia Funcional e Molecular) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

GOMES, C. E. M. **Purificação, Caracterização e atividade bioinseticida de um inibidor de tripsina de sementes de *Crotalaria pallida*.** 2004. 74 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2004.

HU, L. et al. Cell attachment protein VP8* of a human rotavirus specifically interacts with A-type histo-blood group antigen. **Nature**, [S.l.], v. 485, n. 7397, p. 256 – 9, Apr. 2012.

INOUE, K. et al. Structural analysis by X-ray crystallography and calorimetry of a haemagglutinin component (HA1) of the progenitor toxin from *Clostridium botulinum*. **Microbiology**, [S.l.], v. 149, n. 12, p. 3361 – 70, Dec. 2003.

JEBOR, M. A.; JALIL, Y. H. Interaction of Some Pathogenic Bacteria with *Phaseolus Vulgaris* L. Seeds Lectin (as Biosensor). **International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics**. [S.l.], v. 3, n. 3, p. 239 – 241, May 2013.

KAJI, H. et al. Mass spectrometric identification of *N*-linked glycopeptides using lectin-mediated affinity capture and glycosylation site-specific stable isotope tagging. **Nature Protocols**, [S.l.], v. 1, n. 6, p. 3019 – 3027, Jan. 2007.

KAUSHIK, S.; MOHANTY, D.; SUROLIA, A. The Role of Metal Ions in Substrate Recognition and Stability of Concanavalin A: A Molecular Dynamics Study. **Biophysical Journal**, [S.l.], v. 96, n. 1, p. 21 - 34, Jan. 2009.

KHANG, N. Q.; JEAN-LUC, G.; HOEBEKE, J. A blood group A specific lectin from the seeds of *Crotalaria striata*. **Biochimica et Biophysica Acta**, [S.l.], v. 1033, n. 2, p. 210 – 3, Feb. 1990.

KILPATRICK, D. C. Animal lectins: a historical introduction and overview. **Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects**, [S.l.], v. 1572, n. 2 - 3, p. 187 - 197, Sep. 2002.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, [S.l.], v. 227, n. 5259, p. 680 – 685, Aug. 1970.

LEE, S. Y.; SÖDERHÄLL, K. Early events in crustacean innate immunity. **Fish and Shellfish Immunology**, [S.l.], v. 12, n. 5, p. 421 - 437, May 2002.

LEE, S. H. et al. Cytotoxic Activities of *Leptospira interrogans* Hemolysin SphH as a Pore-Forming Protein on Mammalian Cells. **Infection and Immunity**, [S.l.], v. 70, n. 1, p. 315 - 322, Jan. 2002.

LEWIS, G. P. et al. **Legumes of the World**. 1 ed. Rotterdam: Royal Botanic Gardens, Kew, 2005.

LING, E.; YU, X. Q. Cellular encapsulation and melanization are enhanced by immulectins, pattern recognition receptors from the tobacco hornworm *Manduca sexta*. **Developmental and Comparative Immunology**, [S.l.], v. 30, n. 3, p. 289 – 299, 2006.

MACHUKA, J. Characterization of seed proteins of velvet bean (*Macuna pruriens*) from Nigeria. **Food Chemistry**, [S.l.], v. 68, n. 4, p. 421 – 427, Mar. 2000.

MORENO-LOPEZ, J.; KRISTIANSEN, T.; KARSNAS, P. Bovine viral diarrhea virus: affinity chromatography on *Crotalaria juncea* lectin. **Journal of Virological Methods**, [S.l.], v. 5, n. 2, p. 293 – 300, Apr. 1981.

MORTZ, E. et al. Improved silver staining protocols for high sensitivity protein identification using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis. **Proteomics** [S.l.], v. 1, n. 11, p. 1359 – 1363, Nov. 2001.

MURTHY, B. N.; VOELCKER, N. H.; JAYARAMAN, N. Evaluation of α -d-mannopyranoside glycolipid micelles–lectin interactions by surface plasmon resonance method. **Glycobiology**, [S.l.], v. 16, n. 9, p. 822 - 832, Jun. 2006.

NAKATANI, A. K.; LOPES, R.; CAMARGO, L. E. A. Variabilidade genética de *Xanthomonas axonopodis* pv. *Passiflorae*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 35, n. 2, p. 116 – 120, Abr./Jun. 2009.

NUNES, E. S. et al. Inactivation and fragmentation of lectin from *Bothrops leucurus* snake venom by gamma irradiation. **Radiation Physics and Chemistry**, [S.l.], v. 81, n. 4, p. 484 - 487, Apr. 2012.

PACHECO, J. S.; SILVA-LÓPEZ, R. E. S. Genus *Crotalaria* L. (Leguminosae). **Revista Fitos**, São Paulo, v. 5, n. 3, p. 43 – 52, Set. 2010.

PANDO, L. A. et al. Purification and characterization of a lectin from *Crotalaria paulina* seeds. **The Protein Journal**, [S.l.], v. 23, n. 7, p. 437 - 444, Oct. 2004.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, J. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**, [S.l.], v. 109, n. 2, p. 347 – 352, Oct. 1995.

POVINELI, K. L.; FINARDI FILHO, F. The multiple functions of plant lectins. **Journal of the Brazilian Society of Food and Nutrition**, São Paulo, v. 24, p. 135 - 156, Dez. 2002.

RAMBARUTH, N. D. S; DWEK, M. V. Cell surface glycan-lectin interactions in tumor metastasis. **Acta Histochemia**, [S.l.], v. 113, n. 6, p. 591 - 600, Oct. 2011.

RATANAPO, S.; NGAMJUNYAPORN, W.; CHULAVATNATOL, M. Interaction of a mulberry leaf lectin with a phytopathogenic bacterium, *P. syringae* pv *mori*. **Plant Science**, [S.l.], v. 160, n. 4, p. 739 – 744, Mar. 2001.

REGO, E. J. L. **Purificação e caracterização de uma lectina isolada das sementes de *Crotalaria pallida* Aiton**. 2000. 91 f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

REGO, E. J. L. et al. Lectins from seda of *Crotalaria pallida* (smooth rattlexbox). **Phytochemistry**, [S.l.], v. 60, n. 5, p. 441 – 446, July 2002.

RIBEIRO, S. F. F. et al. A new peptide of melon seeds which shows sequence homology with vicilin: Partial characterization and antifungal activity. **Scientia Horticulturae**, [S.l.], v. 111, n. 4, p. 399 – 405, Feb. 2007.

RISTOW, P.; LILENBAUM, W. Leptospirose: Atualização e perspectivas. **Revista da Sociedade Brasileira de Microbiologia in Foco**, São Paulo, n. 11, p. 17 – 27, Set./Out. 2010.

RÜDIGER, H.; GABIUS, H. Plant lectins: occurrence, biochemistry, functions and applications. **Glycoconjugate Journal**, [S.l.], v. 18, n. 8, p. 589 – 613, Aug. 2001.

SANTANA, M. A. **Isolamento, propriedades bioquímicas e estudos biológicos da lectina de sementes da *Macrotyloma axillare* (E. Meyer)**. 2004. 118 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Estrutural e Fisiológica) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2004.

SHARON, N.; LIS, H. Legume lectins - a large family of homologous proteins. **Federation of American Societies for Experimental Biology**, [S.l.], v. 4, n. 14, p. 3198 - 3208, Nov. 1990.

SILVA et al. Extração da lectina da folha de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e o efeito de cátions divalentes na atividade hemaglutinante. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 1, p. 103 - 107, Maio 2010.

SIMÕES, R. C. **Caracterização de lectinas de leguminosas por espectrometria de massa**. 2011, 91 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

SOARES, J. A. S. et al. Impactos da urbanização desordenada na saúde pública: leptospirose e infraestrutura urbana. **Polêmica**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 1, p. 1006 – 1020, Jan./Fev. 2014.

SOUZA, M. A. et al. Isolation and partial characterization of a D-galactose-binding lectin from the latex of *Synadenium carinatum*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 48, n. 5, p. 705 - 716, Sept. 2005.

STRATHMANN, M.; WINGENDER, J.; FLEMMING, H. C. Application of fluorescently labelled lectins for the visualization and biochemical characterization of polysaccharides in biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Microbiological Methods**, [S.l.], v. 50, n. 3, p. 237 – 248, Aug. 2002.

SULÁK, O. et al. *Burkholderia cenocepacia* BC2L-C is a super lectin with dual specificity and proinflammatory activity. **PLoS Pathogens**, Michigan, v. 7, n. 9, p. e1002238, Sep. 2011.

SWANSON, M. D. et al. Lectin Isolated from Bananas Is a Potent Inhibitor of HIV Replication. **Journal of Biological Chemistry**, [S.l.], v. 285, n. 12, p. 8646 - 8655, Mar. 2010.

TALAS-OĞRAŞ, T. et al. Antibacterial activity of seed proteins of *Robinia pseudoacacia*. **Fitoterapia**, [S.l.], v. 76, n. 1, p. 67 - 72, Jan. 2005.

TRINDADE, M. B. **Purificação, caracterização e estudos estruturais de duas novas lectinas ligantes de quitina das sementes do Gênero *Artocarpus***. 2005. 127 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

UTARABHAND, P.; RITTIDACH, W.; PAIJIT, N. Bacterial Agglutination by Sialic Acid-Specific Lectin in the Hemolymph of the Banana Shrimp, *Penaeus (Fenneropenaeus) merguensis*. **ScienceAsia**, [S.l.], v. 33, n.1, p. 41 - 46, 2007.

VAN DAMME, E. J. M. et al. Plant lectins: A composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological role. **Critical Reviews in Plant Sciences**, [S.l.], v. 17, n. 6, p. 575 - 692, 1998.

VAN PARIJS, J. et al. Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. **Planta**, [S.l.], v. 183, p. 258 – 262, Jul. 1991.

VENTURA, C. Â. **Estudo da Citotoxicidade em Células Animais Induzida pela ação da Lectina de Sementes de *Talisia esculenta***. 2006. 89 f. Dissertação (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

VIEIRA, P. B. et al. Mecanismos específicos de patogenicidade de protozoários de Mucosa: *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* e *trichomonas vaginalis*. **Revista do Hospital de Clínicas de Porto Alegre**, Porto Alegre, v. 32, n. 1, p. 58 - 70, 2012.

WANG, S. X. et al. Purification and Characterization of a Novel Lectin with Antiphytovirus Activities from the wild Mushroom *Paxillus involutus*. **Protein and peptide letters**, [S.l.], v. 20, n. 7, p. 767 – 74, Jul. 2013.

WOOTTON, E. C. et al. Biochemical prey recognition by planktonic protozoa. **Environmental Microbiology**, [S.l.], v. 9, n. 1, p. 216 – 222, Jan. 2007.

ZANETTI, G. D. **Lectina dos rizomas de *Arundo Donax* L.: purificação, caracterização, propriedades, imuno-histoquímica e separação das isoformas**. 2007. 262 f. Tese (Doutorado em Botânica) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

ZIMMER, K. R. **Atividade antibiofilme e antibiótica da cera dos ovos e de metabólitos produzidos por bactérias associadas ao carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***. 2012. 241 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

ANEXO A - Patente depositada no INPI (Núcleo de Inovação Tecnológica)

INPI INSTITUTO
 NACIONAL
 DA PROPRIEDADE
 INDUSTRIAL

31/07/2014

011140000199

15:03



00.000.2.2.14.0522761.8

200 - Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2014 018937 8

DIRPA	Tipo de Documento: Formulário	DIRPA	Página: 2
Título do Documento: Depósito de Pedido de Patente		Código: FQ001	Versão: 2
		Procedimento: DIRPA-PQ006	

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas:

1. **Depositante (71):**

1.1 Nome: UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

1.2 Qualificação: IES

1.3 CNPJ/CPF: 15180714/0001-04

1.4 Endereço Completo: RUA BASILIO DA GAMA, 06/08, CANELA, SALVADOR, BAHIA

1.5 CEP: 40110-040

1.6 Telefone: 71 3283-9095

1.7 Fax:

1.8 E-mail: nit-pi@ufba.br

 continua em folha anexa2. **Natureza:** Invenção Modelo de Utilidade Certificado de Adição3. **Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):**LECTINA DE CROTALÁRIA AGLUTINADORAS DE BACTÉRIAS LEPTOSPIRA. POSSÍVEL
INDICAÇÃO COMO MARCADORES EM DIAGNÓSTICO RÁPIDO DA LEPTOSPIROSE. continua em folha anexa4. **Pedido de Divisão: do pedido N°** **Data de Depósito:**5. **Prioridade:** Interna (66) Unionista (30)

O depositante reivindica a(s) seguinte(s):

País ou Organização do depósito	Número do depósito (se disponível)	Data de depósito

 continua em folha anexa



INPI INSTITUTO
NACIONAL
DA PROPRIEDADE
INDUSTRIAL

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Sistema de Gestão da Qualidade
Diretoria de Patentes

DIRPA	Tipo de Documento: Formulário	DIRPA	Página:
	Título do Documento: Depósito de Pedido de Patente	Código: FQ001	Versão: 2
		Procedimento: DIRPA-PQ006	

6. Inventor (72):

- Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seus nome(s), neste caso não preencher os campos abaixo.

6.1 Nome: WILIAN ROSÁRIO DE OLIVEIRA

6.2 Qualificação: MESTRE

6.3 CPF:

6.4 Endereço Completo: R. BARÃO DE GEREMOABO, 147, INST. BIO, UFBA, ONDINA, SSA-BA

6.5 CEP: 40170-290

6.6 Telefone:

6.7 FAX:

6.8 E-mail: mestrewilian@hotmail.com

continua em folha anexa

7. Declaração de divulgação anterior não prejudicial.

Artigo 12 da LPI – período de graça.

Informe no item 11.13 os documentos anexados, se houver.

8. Declaração na forma do item 3.2 da Instrução Normativa PR nº 17/2013:

- Declaro que os dados fornecidos no presente formulário são idênticos ao da certidão de depósito ou documento equivalente do pedido cuja prioridade está sendo reivindicada.

9. Procurador (74):

9.1 Nome:

9.2 CNPJ/CPF:

9.3 API/OAB:

9.4 Endereço Completo:

9.5 CEP:

9.6 Telefone:

9.7 FAX:

9.8 E-mail:

continua em folha anexa

10. Listagem de seqüências biológicas.

Informe nos itens 11.9 ao 11.12 os documentos anexados, se houver.