

**Purificação parcial e caracterização de uma lectina de sementes de
Crotalaria retusa L.**

**Partial purification and characterization of a lectin from *Crotalaria retusa*
L. seeds**

Luzia Aparecida Pando ¹, Gabriela Batista dos Santos Errico ², Laura Maria Santos do Nascimento³

¹ Laboratório de Bioquímica, Departamento de Ciências e Tecnologias (DCT), Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 45208-409, Jequié-Ba, Brasil

² Graduada em Farmácia, Departamento de Ciências e Tecnologias (DCT), Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 45208-409, Jequié-Ba, Brasil

³ Mestre em Farmácia, Universidade Federal da Bahia, 40170115, Salvador-BA, Brasil

Resumo

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas de origem não imune, que se ligam reversivelmente a carboidratos específicos e são amplamente distribuídas na natureza. Esse trabalho teve como objetivo a purificação parcial e caracterização de uma lectina de sementes de *Crotalaria retusa* L. (CrL). O extrato bruto foi obtido através da trituração das sementes e posterior homogeneização em solução de NaCl 0,15M. A lectina foi capaz de aglutinar todos os eritrócitos humanos testados, com uma concentração mínima de 7,81µg/ml. CrL foi inibida por L-fucose, N-acetilgalactosamina e D-galactose nas concentrações mínimas de 12,5mM, 25mM e 25mM, respectivamente, mas não foi dependente de cátions divalentes. CrL foi parcialmente purificada através de cromatografia de exclusão molecular em coluna de Sephadex G-75 e exibiu uma massa molecular de 30 kDa em eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). A lectina foi estável até 100°C por 30 minutos e a atividade hemaglutinante foi mantida entre o pH 7 e 9.

Palavras-chave: *Crotalaria retusa* L., atividade hemaglutinante, lectina, Faboideae.

Abstract

Lectins are proteins or glycoproteins of non-immune origin, which bind reversibly to specific carbohydrates and are widely distributed in nature. This work aimed the partial purification and characterization of a lectin from *Crotalaria retusa* L. seeds (CrL). The crude extract was obtained by

crushing the seeds and subsequent homogenization in 0.15M NaCl solution. The lectin was able to agglutinate all human erythrocytes tested, with a minimum concentration of 7.81µg/ml. CrL was inhibited by L-fucose, N-acetylgalactosamine and D-galactose in the minimum concentrations of 12.5mM, 25mM and 25mM, respectively, but it was not dependent on divalent cations. CrL was partially purified by size exclusion chromatography on Sephadex G-75 and exhibited a molecular mass of 30 kDa in polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The lectin was stable at 100°C for 30 minutes and the hemagglutinating activity was maintained at pH 7.0 – 9.0.

Keywords: *Crotalaria retusa* L., hemagglutinating activity, lectin, Faboideae.

Introdução

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas de origem não imune, sem atividade enzimática, que se ligam reversivelmente a carboidratos específicos ou a glicoproteínas, aglutinando células e/ou precipitando glicoconjugados [1,2]. Por causa dessa habilidade, essas proteínas podem ser facilmente detectadas através de ensaios de hemaglutinação [3,4].

As plantas são consideradas a maior fonte de lectinas [5], mas elas também são encontradas em fungos, líquens, microrganismos e animais [6]. Nas plantas, pode-se encontrar lectinas em diferentes tecidos, como tubérculos [7] raízes [8] folhas [9] frutos [10] e, predominantemente, em sementes, onde podem atuar como proteínas de reserva. [11]. A localização dessas proteínas em diferentes tecidos da planta sugere um papel fisiológico importante no mecanismo de defesa contra o ataque de insetos, [12] bactérias e fungos [6] e predadores herbívoros [13].

A disponibilidade de um grande número de lectinas com especificidade distinta de ligação a carboidratos, faz destas proteínas ferramentas moleculares valiosas no campo das pesquisas médicas e biológicas [4]. Muitas lectinas isoladas de plantas mostraram ter atividade na inibição do crescimento de células tumorais [14], na estimulação mitogênica de linfócitos [15], na agregação antiplaquetária, [16], na inibição do crescimento bacteriano e fúngico [6], na ação anti-inflamatória e analgésica, [17], na ação inseticida [12], e também, efetivas na purificação de glicoconjugados [18], entre tantas outras funções.

Em leguminosas, as lectinas são encontradas em abundância nas sementes, onde representam de 2 a 10% das proteínas solúveis [1, 19]. Embora essas proteínas apresentem diferenças na especificidade de ligação a carboidratos, elas compartilham muitas características estruturais e são, geralmente, compostas por 2 ou 4 subunidades com massas moleculares variando de 25 a 30 kDa [11,20].

A família Leguminosae (Faboideae) apresenta ampla distribuição biogeográfica e está subdividida em três subfamílias: Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae [16, 21]. O gênero *Crotalaria* pertence à subfamília Papilionoideae e está inserido na tribo Crotalarieae (Benth.). É considerado um

dos maiores gêneros da família Leguminosae, com espécies distribuídas em regiões tropicais e subtropicais, sendo numerosas na África, Índia, México e Brasil [21, 22,23]. As espécies desse gênero possuem considerável plasticidade, adaptando-se a diferentes condições ambientais, com ocorrência em variados tipos de habitats, e também são consideradas plantas invasoras, sendo facilmente encontradas em plantações de grãos e em pastagens [22,24].

No Brasil já foram encontradas aproximadamente quarenta espécies do gênero, entre as quais, *Crotalaria retusa* L, que são conhecidas popularmente pelos nomes “xique-xique”, “guizo-de-cascavel” e “chocalho-de-cascavel,” em referência ao ruído produzido pelas vagens secas que, quando tocadas, se assemelham ao emitido pela cauda da cascavel [24].

Apesar do grande número de espécies pertencentes ao gênero *Crotalaria*, poucas lectinas foram purificadas e caracterizadas: *Crotalaria juncea* [25,26], *Crotalaria striata* [27], *Crotalaria pallida* [28], *Crotalaria paulina* [29] e *Crotalaria medicaginea* [30]. Sendo assim, o objetivo desse estudo foi purificar parcialmente e caracterizar uma lectina de sementes de *Crotalaria retusa* L.

Materiais e Métodos

Material vegetal

As sementes de *Crotalaria retusa* L. foram fornecidas pelo Instituto Agronômico de Campinas - IAC, Campinas – SP e armazenadas em frascos hermeticamente fechados e acondicionadas em geladeira, a 10 °C.

Extração da lectina

Sementes maduras de *Crotalaria retusa* L. (50g) foram trituradas em um moinho analítico e a farinha obtida foi submetida à extração com NaCl 0,15M por 4 horas, sob agitação constante, em temperatura ambiente. A suspensão obtida foi centrifugada a 5000 x rpm, à 4°C por 20 minutos, sendo o precipitado descartado e o sobrenadante submetido à diálise com água destilada durante 24 horas, resultando no extrato bruto dialisado.

Dosagem de proteínas

A concentração de proteínas no extrato foi estimada pelo método descrito por Bradford [31], utilizando albumina do soro bovino (BSA) como padrão de proteína.

Ensaio de hemaglutinação

Coleta e preparação dos eritrócitos

As mostras de sangue humano (A, B, AB e O) foram coletadas na Enfermaria da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) e homogeneizadas em solução de Alsever [32]. Os eritrócitos foram lavados quatro vezes com solução salina NaCl 0,15 M (1:5 v/v) por centrifugação, a 1800 rpm por 10 minutos, à 10 °C. Em seguida, foi preparada uma suspensão de eritrócitos a 2% para ser utilizada nos ensaios de hemaglutinação.

Determinação da atividade hemaglutinante

A atividade hemaglutinante foi realizada com hemácias humanas (A, B, AB e O) em placas de microtitulação. A partir de 100 µl do extrato foram feitas diluições seriadas em 50 µl de NaCl 0,15 M e, em seguida, foram acrescentados 50 µl de hemácias a 2% (v/v). As leituras foram realizadas após 1 hora de incubação da placa à temperatura ambiente e foi determinada a concentração mínima de lectina que apresentava atividade hemaglutinante.

Ensaio de inibição por carboidratos

O ensaio de inibição por carboidratos foi conduzido em placas de microtitulação, utilizando D-frutose, D-glicose, D-manose, N-acetil-D-galactosamina, D-galatose, D-glicosamina, D-maltose, D-sacarose, methyl α -D-manose-pyranoside e L-fucose, na concentração inicial de 100 mM. 50 µl do extrato foram pré-incubados com igual volume de diluições seriadas dos carboidratos, em 50 µl de NaCl 0,15 M. As placas foram mantidas em repouso por 30 minutos à temperatura ambiente e, posteriormente, foram adicionados 50 µl de uma suspensão a 2% de eritrócitos humanos do tipo A. Após uma hora de incubação à temperatura ambiente, foi determinada a concentração mínima do carboidrato capaz de inibir a atividade hemaglutinante.

Efeito do agente quelante sobre a atividade hemaglutinante

Foram adicionados 50 µl da solução de ácido etileno diamino tetra-acético (EDTA 20 mM) em placas de microtitulação e diluídos serialmente em 50 µl de solução NaCl 0,15 M. Em seguida, 50 µl do extrato foram acrescentados à solução e, por último, 50 µl de suspensão a 2% de eritrócitos humano tipo A. O controle positivo foi realizado com 50 µl da lectina e 50 µl de suspensão celular, em NaCl 0,15 M, e o negativo com 50 µl da EDTA, 50 µl de suspensão celular, em 50 µl de NaCl 0,15 M. A leitura foi realizada após 1 hora de incubação à temperatura ambiente.

Purificação da lectina de *C. retusa*

O extrato bruto de *C. retusa* foi submetido à cromatografia de exclusão molecular em coluna de Sephadex G-75 (104 x 2,2cm), previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 0,05M / 0,15M NaCl, pH 8,0. A lectina, denominada CrL, foi eluída da coluna com o mesmo tampão de equilíbrio, utilizando um fluxo de 12ml por hora, sendo as frações monitoradas a 280 nm.

Eletroforese em SDS-PAGE 12,5%

A fração ativa foi analisada em SDS-PAGE, de acordo com o procedimento descrito por Laemmli [33] utilizando gel de poli(acrilamida em condições desnaturantes. Após a eletroforese, o gel foi corado com Coomassie brilliant blue R 250 por 4 horas e descorado em solução de ácido acético glacial, metanol e água na proporção de 1:4:5 (v/v/v). Como marcadores de massa molecular foram utilizados: fosforilase B (94 kDa), albumina de soro bovino (66 kDa), ovoalbumina (43 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa), e α -lactoalbumina (14,4 kDa).

Efeito da temperatura e pH sobre a atividade hemaglutinante

Para verificar o efeito da temperatura, 200 μ l da lectina foram adicionados em 8 microtubos e aquecidos por 30 minutos em diferentes temperaturas (37 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C, 80 °C, 90 °C e 100 °C). Após esse período, as amostras foram rapidamente colocadas em banho de gelo por 10 minutos e utilizadas no ensaio de hemaglutinação. Para determinar a estabilidade de CrL, foram utilizados vários tampões, variando do pH 2 a 10: (Citrato de Sódio 0,1M - pH 2,0; Citrato de Sódio 0,1M - pH 3,0; Citrato de Sódio 0,1M - pH 4,0; Citrato de Sódio 0,1M - pH 5,0; Fosfato de Sódio Monobásico 0,1M - pH 6,0; Fosfato de Sódio Monobásico 0,1 - pH 7,0; Tris/HCl - pH 8,0; Bicarbonato de Sódio 0,1M - pH 9,0 e Bicarbonato de Sódio 0,1M - pH 10,0). Um volume de 100 μ l da solução de lectina foi incubado com 100 μ l de cada tampão, por 1 hora a temperatura de 37 °C. As amostras foram ajustadas para o pH 7,6 para a realização do ensaio de hemaglutinação. Os controles positivos foram realizados com 50 μ l da lectina sem tratamento e 50 μ l de suspensão celular, em NaCl 0,15 M, e os negativos com 50 μ l de suspensão celular, em 50 μ l de NaCl 0,15 M.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O ensaio de hemaglutinação foi utilizado para detectar a presença de lectina no extrato de *Crotalaria retusa* L, pois essas proteínas facilmente interagem e formam ligações reversíveis com carboidratos presentes na superfície celular [4]. Considerando que lectinas podem apresentar especificidade para eritrócitos de diferentes tipagem sanguínea, foram utilizados nos ensaios os tipos sanguíneos A, B, AB e O, como mostrado na figura 1. A presença de atividade hemaglutinante foi

confirmada pela formação de uma rede de hemácias que cobriu os poços da placa de microtitulação, enquanto que a ausência pôde ser comprovada pela visualização de um botão compacto de hemácias no fundo dos poços.

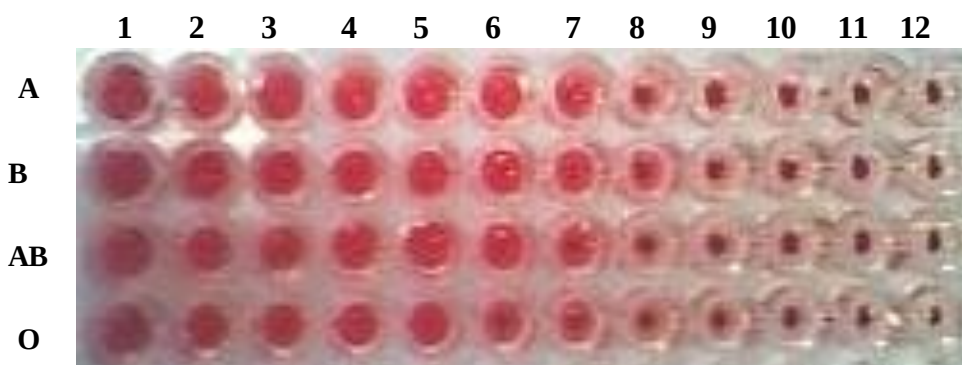


Figura 1: Ensaio de detecção da atividade hemaglutinante no extrato de *Crotalaria retusa*, utilizando eritrócitos humano A, B, AB e O.

A lectina não apresentou especificidade para um tipo particular de eritrócito, pois foi capaz de hemaglutinar todos os tipos sanguíneos e a concentração mínima requerida para aglutinação foi de 7,81µg da lectina. Diante desses resultados, não houve necessidade de utilizar todos os eritrócitos nos demais ensaios, e sim, aquele de maior acessibilidade, que foi o tipo A. Estudos realizados com lectinas presente nos extratos de *Crotalaria paulina* [29] e *Crotalaria medicaginea* [30], revelaram que ambas também aglutinaram todos os tipos sanguíneos. Por outro lado, lectinas isoladas de *Ulex europaeus* I e *Lotus tetragonolobus* [34], demonstraram especificidade para o tipo sanguíneo O, enquanto a lectina de *Crotalaria striata* mostrou ser específica para o tipo A [27]. Pando et al [35] isolaram uma lectina de *Delonix regia* não específica para grupos sanguíneos do sistema ABO.

A atividade hemaglutinante de CrL foi inibida na presença de 12,5mM de L-fucose, 25 mM de D-galactose e 25 mM de N-acetil-D-galactosamina. Os outros açúcares testados não apresentaram inibição da atividade hemaglutinante até a concentração de 100 mM. Lectinas isoladas de *Crotalaria striata* [27], *Crotalaria pallida* [28], *Crotalaria paulina* [29] e *Crotalaria medicaginea* [30], também foram inibidas por D-galactose e N-acetil-D-galactosamina, mas não por fucose. Lectinas específicas para L-fucose foram detectadas em *Ulex europaeus* I e *Lotus tetragonolobus* [34].

Lectinas de plantas geralmente necessitam de cátions divalentes (Ca^{2+} e Mn^{2+}) para exercerem atividade hemaglutinante [27, 28, 35,]. Contudo, verificou-se que a atividade de hemaglutinação de CrL não foi afetada na presença de 20 mM do agente quelante EDTA (Figura 2), indicando que essa lectina não é dependente de metais para se ligar a carboidratos. Pando et al. [29] observaram resultados semelhantes para lectina de *Crotalaria paulina*, que não teve sua atividade hemaglutinante inibida por agentes quelantes, assim como as lectinas isoladas de *Bauhinia forficata* [16] e *Bauhinia bauhinioides* [36].

Tabela1: Inibição da atividade hemaglutinante de CrL por carboidratos.

Açúcares	Concentração mínima inibitória (mM)
L-fucose	12,5
N-acetil-D-galactosamina	25,0
D-galactose	25,0
*Methyl α -D-manose-pyranoside	>100
*D-manose	>100
*D-glicosamina	>100
*D-frutose	>100
*D-maltose	>100
*D-glicose	>100
*D-sacarose	>100

*Não houve inibição até a concentração de 100 mM

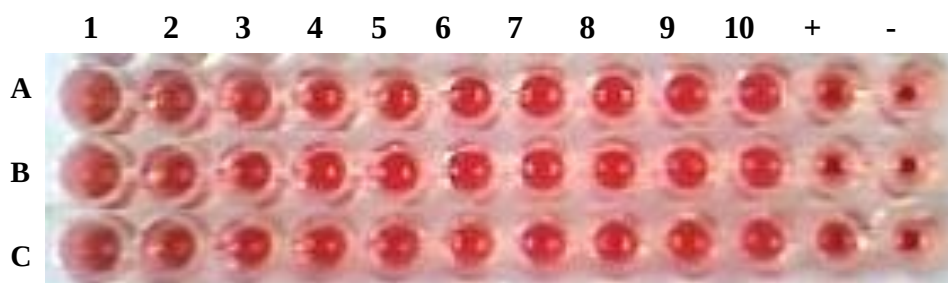


Figura 2: Efeito de EDTA na atividade hemaglutinante do extrato de *C. retusa* com eritrócitos humano tipo A. **A, B e C:** triplicata, + controle positivo, - controle negativo.

O perfil cromatográfico (figura 3) mostra apenas um pico, o qual contém as frações de 9 a 12 que, quando submetidas ao ensaio de atividade hemaglutinante, demonstraram resultados positivos, confirmando, assim, a presença de lectina nas amostras.

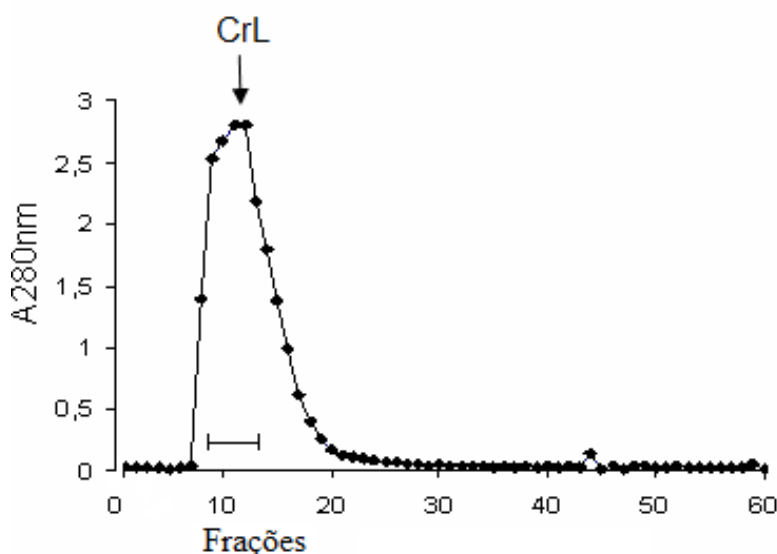


Figura 3: Cromatografia de exclusão molecular do extrato de *C. retusa* em coluna Sephadex G-75 (1,0 x 4,5 cm), equilibrada com tampão Tris HCl 0,05 M, pH 8,0. Os volumes coletados (2 ml) foram monitorados a 280 nm. A seta indica as frações com atividade hemaglutinante (9 – 12).

A análise eletroforética em condições desnaturantes (SDS-PAGE) pode ser observada na figura 4.

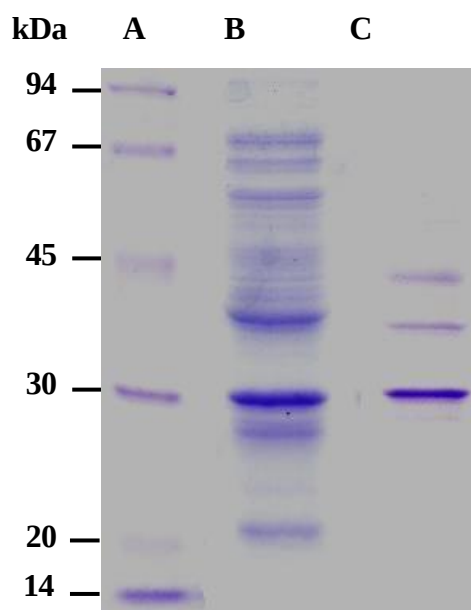


Figura 4: SDS – PAGE 12,5%. **(A)** Marcador molecular: 94 kDa - fosforilase B, 66 kDa - albumina de soro bovino, 43 kDa - ovoalbumina, 30 kDa - anidrase carbônica, 20,1kDa - inibidor de tripsina, e 14,4 kDa - α -lactoalbumina. **(B)** Extrato de *C. retusa*. **(C)** Frações contendo a lectina proveniente da cromatografia de exclusão molecular.

O extrato (linha B) apresentou várias bandas proteicas de diferentes massas moleculares, enquanto que a fração ativa (linha C) revelou apenas três bandas, o que caracteriza uma boa purificação, embora parcial. Comparando os dois perfis, pode-se observar uma forte banda proteica de 30 kDa, a qual

corresponde à massa molecular característica de lectinas que pertencem a família leguminosa [37]. Esses resultados são consistentes com os dados apresentados para lectinas isoladas de sementes do mesmo gênero, como as espécies *Crotalaria juncea* [26], *Crotalaria striata* [27], *Crotalaria pallida* [28] e *Crotalaria paulina* [29].

O estudo do efeito da temperatura e pH mostrou que a lectina foi termoestável e dependente de pH. CrL manteve sua atividade hemaglutinante após 30 minutos de incubação a 100°C, como pode ser observado na figura 5. Esses resultados estão de acordo com aqueles obtidos para lectinas de sementes de *Bauhinia forficata* [16], *Apuleia leiocarpa* [38] e *Eugenia uniflora* [39], que também foram termoestáveis até 100°C. Por outro lado, lectinas de sementes de *Crotalaria medicaginea* [29] e *Vatairea guianensis* [40] mantiveram suas atividades hemaglutinantes até as temperaturas de 60°C e 70°C, respectivamente. Com relação ao pH, a atividade de hemaglutinação de CrL não foi afetada na faixa de pH 7,0 - 9,0, porém, em pH abaixo de 7,0 e pH acima de 9,0, pode-se observar a perda desta atividade, como mostra a figura 6. Lectinas isoladas de sementes de *Canavalia bonariensis* [41] e *Canavalia virosa* [42], também foram estáveis na faixa de pH 7,0 a 9,0, enquanto que uma lectina isolada de semente de um cultivar de French bean [43] manteve-se ativa em uma ampla faixa de pH, de 1-13. Esses resultados demonstram que lectinas vegetais, especialmente da família leguminosa, apresentam atividade hemaglutinante em condições variáveis de temperatura e pH.

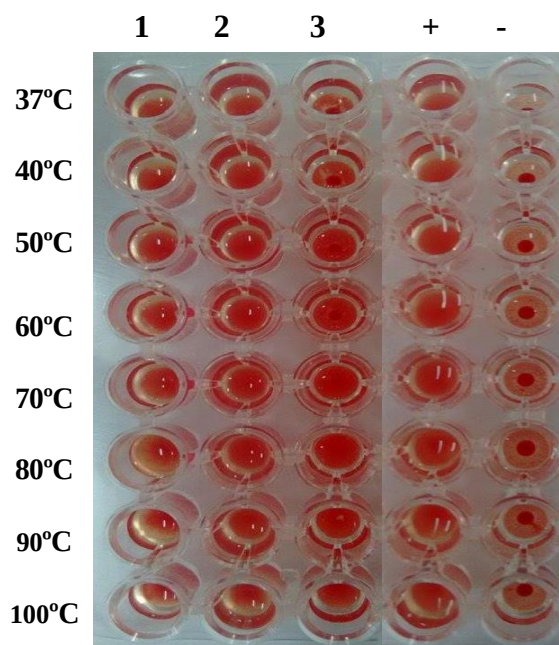


Figura 5: Efeito da temperatura na atividade hemaglutinante da lectina de *C. retusa* com eritrócitos humano tipo A. 1, 2 e 3: triplicata, + controle positivo, - controle negativo.

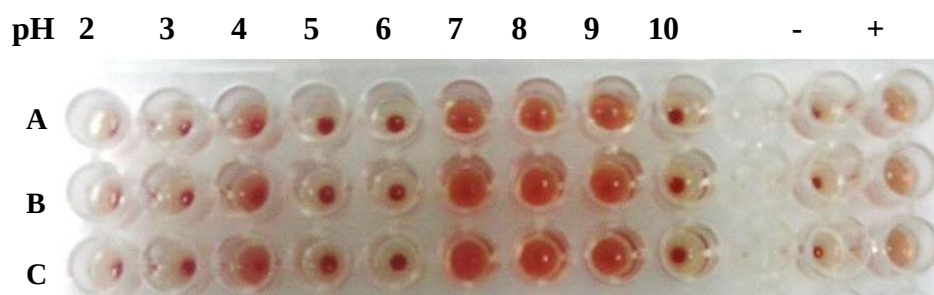


Figura 6: Efeito do pH na atividade hemaglutinante da lectina de *C. retusa* com eritrócitos humano tipo A. **A, B e C:** triplicata, + controle positivo, - controle negativo

Conclusão

Este estudo possibilitou a purificação parcial de uma lectina de semente de *C. retusa* com atividade hemaglutinante ótima na faixa de pH 7 a 9, e estável até 100°C. A proteína apresentou massa molecular de 30 kDa, como estimado por SDS-PAGE, e foi capaz de aglutinar todos os eritrócitos humanos. CrL teve sua atividade inibida na presença de L-fucose (12,5mM), N-acetilgalactosamina (25mM) e D-galactose (25mM), e não foi dependente de cátions divalentes para exercer hemaglutinação. Esses resultados indicam que CrL consegue reconhecer e se ligar a diferentes receptores de membrana, podendo ser uma ferramenta molecular importante para futuros estudos em aplicações biotecnológicas.

Agradecimentos

Ao Instituto Agrônomo de Campinas - IAC, Campinas – SP, pelo fornecimento das sementes de *Crotalaria. retusa* e à CAPES, FAPESB/UESB, pelo suporte financeiro.

Referências

- [1] Van Damme, E.J.M.; Peumans, W.J.; Barre, A.; Rouge, P. Plant lectins: A composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles, Crit. Rev. Plant Sci., 17 (1998) 575–692.
- [2] Sharon, N.; Lis, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules, Glycobiology, 14 (2004) 53R-62R.
- [3] Gabius, H.J. Glycans: bioactive signals decoded by lectins, Biochem. Soc. Trans, 36 (2008) 1491-1496.
- [4] Santos, A.F.S.; da Silva, M.D.C.; Napoleão, T. H.; Paiva, P.M.G.; Correia, M.T.S.; Coelho, L.C.B. B. Lectins: Function, structure, biological properties and potential applications, Current Topics in

Peptide & Protein Research, 15 (2014) 41-62.

[5] Charungchittrak, S.; Petsom, A.; Sangvanich, P. Antifungal and antibacterial activities of lectin from the seeds of *Archidendron jiringa* Nielsen, Food Chem, 126 (2011) 1025 – 1032.

[6] Santos, A.F.S.; Napoleão, T.H.; Bezerra, R.F.; Carvalho, E.V.M.M.; Correia, M. T. S.; Paiva, P.M. G.; Coelho, L.C.B.B. Strategies to obtain lectins from distinct sources, in: Berhardt, L.V. (Ed.), Advances in Medicine and Biology, v. 63, Nova Science Publishers, Inc., 2013, pp. 33-60.

[7] Kaur, M.; Singh, K.; Rup, P.J.; Saxena, A.K.; Khan, R.H.; Ashraf, M.T.; Kamboj, S.S.; Singh, J. A tuber lectin from *Arisaema helleborifolium* Schott with anti-insect activity against melon fruit fly, *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) and anti-cancer effect on Insecticide Activity of Lectins and Secondary Metabolites 593 human cancer cell., 445 (2006) Arch. Biochem. Biophys. 156-165.

[8] Souza, J.D.; Silva, M.B.R.; Argolo, A.C.C.; Napoleão, T.H.; Sá, R.A.; Correia, M.T.S.; Paiva, P.M.G.; Silva, M.D.C. & Coelho, L.C.B.B. A new *Bauhinia monandra* galactose-specific lectin purified in milligram quantities from secondary roots with antifungal and termiticidal activities. Int. Biodeterior. Biodegradation, 65 (2011b) 696-702.

[9] Costa, R.M.P.B.; Vaz, A.F.M.; Oliva, M.L.V.; Coelho, L.C.B.B.; Correia, M.T.S.; Carneiro-da-Cunha, M.G. 2010. A new mistletoe *Phthirusa pyrifolia* leaf lectin with antimicrobial properties. Process Biochem, 45:526-533.

[10] Wang, H.; Ng, T.B. A lectin with some unique characteristics from the samta tomato, Plant Physiol. Bioch, 44 (2006) 181-185.

[11] Rüdiger, H. Plant lectins – more than just tools for glycoscientists: occurrence, structure and possible functions of plant lectins, Acta Anat, 161 (1998) 130-152.

[12] Macedo, M.L.R; Oliveira, C.F.R; Oliveira, C.T. Insecticidal Activity of Plant Lectins and Potential Application in Crop Protection, Molecules, 20 (2015) 2014-2033.

[13] Peumans, W.J.; Van Damme, E.J.M. Lectins as plant defense proteins, Rev. Plant Physiol, 109 (1995) 347-352.

[14] Panda, P.K.; Mukhopadhyay, S.; Behera, B.; Bhol, C.S.; Dey, S.; Das, D.N.; Sinha, N.; Bissoyi, A.; Pramanik, K.; Maiti, T.K.; Bhutia, S.K. Antitumor effect of soybean lectin mediated through reactive oxygen species-dependent pathway, Life Sci, 111 (2014) 27–35.

- [15] Maciel, E.V.; , Araújo-Filho, V.S.; Nakazawa, M.; Gomes, Y.M.; Coelho, L.C.; Correia, M.T. Mitogenic activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes, *Biologicals*, 32 (2004) 57-60.
- [16] Silva, M.C.C.; Santana, L.A.; Mentele, R.; Ferreira, R.S.; Miranda, A.; Silva-Lucca, R.A. Purification, primary structure and potential functions of a novel lectin from *Bauhinia forficata* seeds, *Process Biochem*, 7 (2012) 41049-1059.
- [17] Araújo, R.M.S; Vaz, A.F.M.; Aguiar, J.S.; Coelho, L.C.B.B; Paiva, P.M.G; Melo, A.M.M.; Silva, T.G.; Correia, M.T.S. Lectin from *Crataeva tapia* bark exerts antitumor, antiinflammatory and analgesic activities. *Nat. prod. bioprospect*, 1 (2011) 97–100.
- [18] Cummings, R.D. Lectins as tools for glycoconjugate purification and characterization. In *Glycosciences: Status and Perspectives*; Gabius, H.-J., Gabius, S., Eds.; Chapman & Hall: London, UK, 1997; pp. 191–199.
- [19] Lam, S.K., Ng, T.B. Lectins: production and practical applications, *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 89 (2011) 45–55.
- [20] Kennedy, J.F., Paiva, P.M.G., Corella, M.T.S., Cavalcanti, M.S.M., Coelho, L.C.B.B. Lectins, versatile proteins of recognition: a review, *Carbohydr. Polym*, 26 (1995) 219-230.
- [21] Lewis, G.P., Schrire, B., Mackinder, B., Lock, M. *Legumes of the world*. Royal Botanical Garden: Kew; 2005.
- [22] Flores, A.S., Miotto, S.T.S. Aspectos fitogeográficos das espécies de *Crotalaria* L. (Leguminosae, Faboideae) na Região Sul do Brasil, *Acta Bot. Brasilica*, 19 (2005) 245-249.
- [23] Devendra, B.N., Srinivas, N., Solmon, K.S. A comparative pharmacological and phytochemical analysis of in vivo & in vitro propagated *Crotalaria* species, *Asian Pac. J. Trop. Med*, 5 (2012) 37-41.
- [24] Honório Júnior, J.E.R., Soares, P.M., Melo, C.L., Arruda Filho, A.C.V., Sena Filho, J.G., Barbosa Filho, J.M., Sousa, F.C.F. Atividade farmacológica da monocrotalina isolada de plantas do gênero *Crotalaria*, *Ver. Bras. Farmacogn*, 20 (2010) 453-458.
- [25] Ersson, B., Aspberg, K., Porath, J. The Phytohemagglutinin from sunn hemp seeds (*Crotalaria juncea*). Purification by biospecific affinity chromatography, *Biochim. Biophys. Acta*, 310 (1973) 446-452.

- [26] Ersson, B. A phytohemagglutinin from sunn hemp seeds (*Crotalaria juncea*). II Purification by a high capacity biospecific adsorbent and its physicochemical properties, *Biochim. Biophys. Acta*, 494 (1977) 51-60.
- [27] Khang, N.Q.; Jean-Luc, G.; Johan, H. A blood group A specific lectin from the seeds of *Crotalaria striata*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1033 (1990) 210-213.
- [28] Rego, E.J.L.; De Carvalho, D.D.; Marangoni, S.; De Oliveira, B.; Novello, J.C. Lectins from seeds of *Crotalaria pallida* (smooth rattlebox), *Phytochemistry*, 60 (2002) 441-446.
- [29] Pando, L.A.; De Carvalho, D.D.; Toyama, M.H.; Di Ciero, L.; Novello, J.C.; Pascholatti, S.F.; Marangoni, S. Purification and characterization of a lectin from *Crotalaria paulina* seeds, *Protein J*, 23 (2004) 437-444.
- [30] Kaur, N.; Singh, J.; Kamboj, S.S. Affinity purification and characterization of a seed lectin from *Crotalaria medicaginea*, *Indian J. Biochem. Biophys*, 39 (2002) 49-54.
- [31] Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye binding, *Anal. Biochem*, 72 (1976) 248-254.
- [32] Alsever J.B; Ainslie R.B. A new method for the preparation of dilute blood plasma and the operation of a complete transfusion service, *N.Y. State J. Med*; 41 (1941) 126-131.
- [33] Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227 (1970) 680-685.
- [34] Howard, J.A.; Edward, A. Z. J.; Khsushi, L.M. A Comparison of the Binding Specificities of Lectins from *Ulex Europaeus* and *Lotus Tetragonolobus*, *Immunological Communications*, 6 (1977) 585-602.
- [35] Pando, S.C.; Macedo, M.L.R.; Freire, M.G.M.; Toyama, M.H.; Novello, J.C.; Marangoni, S. Biochemical characterization of a lectina from *Delonix regia* seeds, *J. Protein Chem*, 21 (2002) 279-285.
- [36] Silva, H.C.; Bari, A.U.; Pereira-Junior, F.N.; Simões, R.C.; Barroso- Neto, I.L.; Nobre, C.B.; Pereira, M.G.; Nascimento, K.S.; Rocha, B.A.; Delatore, P.; Nagano, C.S.; Assreuy, A.M.; Cavada, B.S. Purification and partial characterization of a new pro-inflammatory lectin from *Bauhinia bauhinioides* Mart (Caesalpinoideae) seeds, *Protein Pept. Lett*, 18 (2011) 396-402.

- [37] Loris, R. Principles of structures of animal and plant lectins, *Biochim. Biophys. Acta*, 1572 (2002) 198-208.
- [38] Carvalho, A.S.; Silva, M.V.; Gomes, F.S.; Paiva, P.M.G.; Malafaia, C.B.; Silva, T.D. Purification, characterization and antibacterial potential of a lectin isolated from *Apuleia leiocarpa* seeds, *Int. J. Biol. Macromol*, 75 (2015)402-408.
- [39] Oliveira, M.D.L.; Andrade, C.A.S.; Santos-Magalhães, N.S.; Coelho, L.C.B.B.; Teixeira, J.A.; Carneiro-da-Cunha, M.G.;Correia, M.T.S. Purification of a lectin from *Eugenia uniflora* L. seeds and its potential antibacterial activity, *Lett. Appl. Microbiol*, 46 (2008) 371-376.
- [40] Silva, H.C.; Nagano, C.S.; Souza, L.A.G.; Nascimento, K.S.; Isidro, R.; Delatore, P. Purification and primary structure determination of a galactose-specific lectin from *Vatairea guianensis* Aublet seeds that exhibits vasorelaxant effect, *Process Biochem*, 47 (2012) 2347-2355.
- [41] Silva, M.; Silva, S.; Nascimento, K.; Nagano, C.S.; Cavada, B.S. Physico-chemical characterization and partial sequence of a lectin from *Canavalia bonariensis* Lindl seeds, *BMC Proc* 8 (Suppl 4) (2014) 227.
- [42] Osterne, V.J.S.; Santiago, M.Q.; Pinto Junior, V.R.; Cajazeiras, J.B.; Correia, J.L.A.; Leitão, C.C.F. Purification, partial characterization, and CNBr-Sepharose immobilization of a vasorelaxant glucose/mannose lectin from *Canavalia virosa* seeds, *Appl. Biochem. Biotechnol*, 172 (2014) 3342-3353.
- [43] Sharma, A.; Wong, J.H.; Lin, P.;Chan, Y.S.; Ng, T.B. Purification and characterization of a lectin from Indian cultivar of French bean seeds, *Protein Pept. Lett*, 17 (2010) 221-227.