



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS - UFAL
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA – IQB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA - PPGQB



ROBERTO JOSÉ AMARO DA SILVA

Isolamento e caracterização de uma nova lectina da casca de *Schinus terebinthifolius* (aroeira-da-praia).

MACEIÓ/AL

2018

ROBERTO JOSÉ AMARO DA SILVA

Isolamento e caracterização de uma nova lectina da casca de *Schinus terebinthifolius* (aroeira-da-praia)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Química e Biotecnologia – IQB da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para a aprovação e obtenção do título a nível de mestrado.

Orientador: Prof. Dr. Francis Soares Gomes

MACEIÓ/AL

2018

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central

Bibliotecária Responsável: Janaina Xisto de Barros Lima

S586i Silva, Roberto José Amaro da.

Isolamento e caracterização de uma nova lectina da casca de *Schinus terebinthifolius* (aroeira-da-praia) / Roberto José Amaro da Silva. – 2018.
67 f.: il.

Orientador: Francis Soares Gomes.

Dissertação (mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2017.

Bibliografia: f.58-67.

1. Lectinas de plantas – Isolamento e caracterização. 2. Aroeira da praia.
I. Título.

CDU: 547.96



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA





BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins
57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone/Fax: (82) 3214-1144
email: ppgqb.ufal@gmail.com

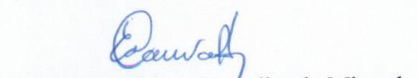
FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da comissão julgadora da defesa de dissertação de mestrado de **Roberto José Amaro da Silva**, intitulada: **“Isolamento e caracterização de uma nova lectina da casca de *Schinus terebinthifolius* (Aroeira-da-praia)”**, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, no dia 20 de dezembro de 2017, às 14h, na Sala de Reuniões do IQB/UFAL.

COMISSÃO JULGADORA


Prof. Dr. Francis Soares Gomes
Orientador (PPGQB/IQB/UFAL)


Prof. Dr. Hugo Juarez Vieira Pereira
(PPGQB/IQB/UFAL)


Profª. Dra. Edma Carvalho de Miranda
(IQB/UFAL)

AGRADECIMENTOS

Presto agradecimentos a todos do laboratório de Metabolismo e Proteômica - LAMP que de forma direta ou indireta me ajudaram em todos os pontos determinantes para a conclusão do meu trabalho, aos alunos de Doutorado Cláudio, Elisabeth, Janaína Kívia e Humberto pelas instruções e incentivos e também para a aluna de iniciação científica Marta. Faço aqui referência também ao meu pai José Amaro da Silva e a minha mãe Maria das Graças Faustino que exerceram um importante papel de me educar e fornecer tudo que precisava para chegar onde estou.

Sou muito grato a pessoa de Ricardo Costa (Doutorando) por ter me instruído nas práticas experimentais no laboratório com toda paciência e dedicação. Também sou de todo agradecimentos ao meu orientador, o professor doutor de Bioquímica da Universidade Federal de Alagoas Francis Gomes por ter recebido em seu laboratório e me incluído em sua linha de pesquisa, com confiança. Também agradeço aos órgãos de fomento da bolsa de mestrado: CNPq e CAPES, por ter concedido as condições para me dedicar exclusivamente ao curso de mestrado.

Agradeço a Deus por ter me dado graça de concluir o mestrado, me guiando pelas veredas da justiça e me honrado grandemente em todos os lugares que habitei e ter me colocado no meio dos príncipes deste mundo. Louvo a Deus por isso, pois como está escrito:

Todo lugar que a planta dos vossos pés pisarem
Eu vos dou, como prometi a Moisés. (Josué 1.3)

Agora estou prestes a ir pelo caminho de toda a terra. Vocês sabem, lá no fundo do coração e da alma, que nenhuma das boas pro-messas que o Senhor, o seu Deus, fez dei-xou de cumprir-se. Todas se cumpriram; nenhu-ma delas falhou. (Josué, 23.14)

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Esquema ilustrativo da interação de lectina com carboidrato específico através de domínio de reconhecimento a carboidratos – DRC formando complexo lectina-ligante.	16
Figura 02 – Esquema representativo da classificação de lectinas quanto aos números de domínios de ligação.....	17
Figura 03 – Estrutura do complexo lectina-ligante obtido por co-cristalização.....	19
Figura 04 – Similaridade na sequência primária presente DRC's de galectinas de origem humana	20
Figura 05 – Função das interações lectina-ligante durante a movimentação de leucócitos para recrutamento a um sítio de infecção.....	22
Figura 06 - A adesão das bactérias à membrana de célula hospedeira.....	24
Figura 07 - Esquema representativo da morfologia de superfície de membrana de bactérias.....	25
Figura 08 – Cálculo estimativo da massa molecular de proteínas	32
Figura 09 – Gel representativo de eletroforese bidimensional demonstrando a separação dos componentes proteicos de uma amostra em função do pI e massa molecular.....	33
Figura 10 - Esquema ilustrativo do teste de atividade hemaglutinante de lectinas em placas de microtitulação	40
Figura 11 – Perfil cromatográfico da cromatografia por afinidade em matriz de quitina	45
Figura 12 - Gel de eletroforese SDS-PAGE.....	46
Figura 13 - Teste de estabilidade térmica	48
Figura 14 – Teste de estabilidade a pH.....	50
Figura 15 - Avaliação do efeito de íons divalentes na AH	51
Figura 16 – Cromatograma da afinidade em matriz de quitina do extrato bruto dialisado em NaCl 0,15 M e filtrado em carvão ativado.....	53
Figura 17 – Perfil cromatográfico das amostras com AH eluídas em coluna de afinidade aplicadas na DEAE-Sepharose.....	54

Figura 18 - Eletroforese SDS-PAGE em condições desnaturantes e redutoras dos picos ativos da DEAE (05 e 03) e não redutoras do pico ativo oriundos da afinidade (02).....55

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Classificação de lectinas quanto à especificidade ao ligante;	16
Tabela 02 – Fracionamento salino. Concentração e AHE das frações oriundas do fracionamento salino com sulfato de amônio - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	43
Tabela 03 – Teste de inibição da Atividade Hemaglutinante - AH da SteBL parcialmente isolada inibida por carboidratos e glicoproteína	47

LISTA DE ABREVIATURAS

AH: Atividade Hemaglutinante

AHE: Atividade Hemaglutinante Específica

SteBL : Lectin from the bark of *Schinus terebinthifolius*

pH: Potencial hidrogeniônico

mg: Miligrama

mL: Mililitros

nm: Nanômetros

µL: Microlitros

µg: Microgramas

DRC: Domínio de Reconhecimento a Carboidratos

C-Type: Lectinas do tipo C.

pI: Ponto Isoelétrico

Cys: Cisteína

mM: Milimolar

RPM: Rotação por minuto

SDS: Dodecil sulfato de sódio.

UV-vis: Ultravioleta visível

kDa: Quilo Dalton

2-ME: 2-Mercaptoetanol

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

RESUMO

As lectinas são proteínas ou glicoproteínas que reconhecem carboidratos livres ou conjugados, ligando-se reversivelmente a eles. Lectinas possuem diversas funções e aplicações biotecnológicas tais como atividade antimicrobiana, inseticida, imunomoduladora, cicatrizante, antitumoral, dentre outras. *Schinus terebinthifolius* (Aroeira-da-praia) pertence à família Anacardiaceae, apresenta resistência contra vários tipos de lesões causadas por insetos. Esse trabalho teve como objetivo o isolamento e a caracterização de uma nova lectina da casca de *S. terebinthifolius* (SteBL). O extrato da casca (20%, p/v) foi preparado em solução de NaCl 0,15 M por 16 h a 4 °C. O extrato foi tratado com sulfato de amônio em diferentes concentrações (0-20%, 20-40%, 40-60% e 60-80%). A atividade hemaglutinante (AH) das frações foram avaliadas com suspensão de eritrócitos de coelho 2,5% (m/v). Posteriormente, a fração sobrenadante - FS40%, que apresentou maior atividade específica, foi submetida a cromatografia de afinidade em matriz de quitina, onde foi aplicado cerca de 125 µg de proteína numa coluna de quitina equilibrada com NaCl 0,15 M. As amostras que apresentaram AH foram eluídas com ácido acético 1,0 M. O perfil cromatográfico da coluna de quitina mostrou um pico de proteína ativo (AHE: 65.536) após eluição com ácido acético 1,0 M (0,0625 mg de proteína). Em seguida a SteBL parcialmente isolada foi caracterizada quanto ao efeito da temperatura (30-100°C), pH (3-10), cátions divalentes (Ca²⁺, Mn²⁺ e Zn²⁺) na AH. Também a mesma preparação foi avaliada em gel de poliacrilamida (10% (p/v) em condições desnaturantes na presença e ausência de 2-Mercaptoetanol. Os carboidratos N-acetilglucosamina e lactose apresentaram inibição, expressando uma redução de cerca de 75 % e 99,97% respectivamente da HA da SteBL parcialmente isolada. A SteBL parcialmente purificada apresentou estabilidade térmica em uma ampla faixa de temperatura com uma atividade máxima a 50 ° C (AHE: 131.072) e pH 5 (AHE: 131.072) e íon-independente. Com a finalidade de isolar totalmente a SteBL, um novo extrato da casca da aroeira foi preparado em solução tampão Tris-HCl 50 Mm pH 8,0, onde o mesmo foi filtrado em carvão ativado e submetido a cromatografia por afinidade em matriz de quitina seguida por cromatografia de troca aniônica – DEAE-Sepharose, onde foi possível o isolamento de um peptídeo de cerca de 24 kDa.

Palavras chaves: Lectina, aglutinação, purificação; caracterização.

ABSTRACT

Lectins are proteins or glycoproteins that recognize free or conjugated carbohydrates, reversibly binding to them. Lectins participate in several events of the immune system of plants and animals and assisting in the process of cell adhesion and recognition. *Schinus terebinthifolius* belongs to the family Anacardiaceae, which is resistant to various types of insect injury. This work aimed at the isolation and characterization of a new lectin from the shell of *S. terebinthifolius* (SteBL). The bark extract (20%, w/v) was prepared in 0.15 M NaCl solution for 16 h at 4°C. The extract was treated with ammonium sulfate in different concentrations (0-20%, 20-40%, 40-60% and 60-80%). The hemagglutinating activity (HA) of the fractions were evaluated with rabbit erythrocyte suspension 2.5% (m/v). Subsequently, the supernatant fraction – FS 40%, which presented the highest specific activity, was subjected to chitin matrix affinity chromatography, where about 125 µg of protein was applied on a chitin column equilibrated with 0.15 M NaCl. showed HA were eluted with 1.0 M acetic acid. The chromatographic profile of the chitin column showed an active protein peak (SHA: 65536) after elution with 1.0 M acetic acid (0.0625 mg protein). Then the partially isolated SteBL was characterized as the effect of temperature (30-100 ° C), pH (3-10), divalent cations (Ca²⁺, Mn²⁺ and Zn²⁺) on. The same preparation was also evaluated on polyacrylamide gel (10% w/v) under denaturing conditions in the presence and absence of 2-Mercaptoethanol. N-acetylglucosamine and lactose carbohydrates showed inhibition, expressing a reduction of about 75% and 99%. , SteBL HA was partially isolated and showed a thermal stability over a wide temperature range with a maximum activity at 50 ° C (SHA: 131.072) and pH 5 (SHA: 131.072) and ion-independent. In order to completely isolate SteBL, a new extract from the bark of the mastic was prepared in 50 mM Tris-HCl buffer pH 8.0 (20%, w/v), where it was filtered on activated charcoal and subjected to chitin matrix affinity chromatography followed by anion exchange chromatography (DEAE-Sepharose), where it was possible to isolate a peptide of about 24 kDa.

Key words: Lectin, agglutination, purification, characterization.

SUMÁRIO

1.0 - INTRODUÇÃO	12
2.0 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 – Proteínas	14
2.2 - Lectinas: classificação e ocorrência	15
2.3 - Funções biológicas de lectinas e seus respectivos mecanismos de ação	21
2.4 - Lectinas e suas aplicações biotecnológicas	26
2.5 - Estratégias de purificação de lectinas	28
2.6 - Técnicas básicas de caracterização de lectinas.....	31
2.6.1 – Eletroforese.....	32
2.6.2 - Efeito do pH na atividade de lectinas.....	34
2.6.3 - Efeito da temperatura na atividade de lectinas	35
3.0 - SCHINUS Terebinthifolius	36
4.0 - OBJETIVOS	38
4.1 - Geral:	38
4.2 - Específicos:.....	38
5.0 - MATERIAIS E MÉTODOS	39
5.1 - Obtenção do material botânico	39
5.2 - Purificação parcial da casca de <i>Schinus terebinthifolius</i>	39
5.3 - Atividade hemaglutinante	39
5.4 - Determinação da concentração de proteína	40
5.5 - Efeito do pH na AH da SteBL e teste de estabilidade térmica da SteBL.....	40
5.6 - Teste de inibição da AH da SteBL por carboidratos e glicoproteína	41
5.7 – Eletroforese em SDS-PAGE.....	41
6.0 – RESULTADOS E DISCUSSÕES	43
6.1 – Tabela do fracionamento salino	43
6.2 – Cromatografia por afinidade em coluna de quitina	44
6.3 - Caracterização da SteBL parcialmente isolada por eletroforese SDS-PAGE ...	45
6.4 – Teste de inibição da AH da SteBL.....	47
6.5 – Teste de termoestabilidade	48
6.6 - Teste de estabilidade da SteBL a variação de pH	49
6.7 – Efeito de íons divalentes na atividade hemaglutinante.....	51
6.8 - Isolamento e caracterização da SteBL em SDS-PAGE	52

7.0 – CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

1.0 - INTRODUÇÃO

A *Schinus terebinthifolius Raddi* é uma planta que pertence à Família *Anacardiaceae*, conhecida popularmente com aroeira da praia e aroeira vermelha. Essa planta é comum nas partes serranas litorâneas do Brasil, possuem vários tamanhos e larguras, são recobertas por uma casca grossa e escura, também contém ramificações bem desenvolvidas e flácidas. Segundo Gilbert et al., (2011) a aroeira é utilizada no tratamento de lesões e úlceras de pele e mucosas, contra infecções do sistema respiratório, sistema digestivo e do sistema genito-urinário. Essa planta possui uma rica composição de metabólitos secundários e primários bioativos. Dentre as macromoléculas biofuncionais destacam-se as lectinas, que por sua vez, são proteínas ou glicoproteínas que possuem a capacidade de ligar-se reversivelmente a mono/oligossacarídeos específicos através de ligações de hidrogênio e interações de Van der Waals (Lannoo & Van Damme, 2010).

Nas plantas a expressão de lectinas é potencializada por meio de estímulos externos, como por exemplo a ação de fitopatógenos e outras injúrias (Procópio et al., 2017). Lectinas solúveis presentes no citosol de células vegetais participam diretamente do sistema de defesa de plantas, como por exemplo a calreticulina - uma lectina ligadora de glicose, presente no retículo endoplasmático das células de *Arabidopsis*, sofre degradação e seus fragmentos atuam como chaperonas no processo de modulação de peptídeos de membrana que atuam como receptores de antígenos bacterianos. (Procópio et al., 2017).

Os primeiros relatos a respeito do descobrimento destas moléculas datam de 1888, quando Stilmark, pode correlacionar à ação delas aos danos toxicológicos de *Ricinus communis* (Peumans et al., (1995) *apud* Singh, 2016). Além desta descoberta, as lectinas também desempenharam durante experimentos executados, a capacidade de aglutinar eritrócitos (hemácias) o que naquela época representou um grande impacto para o campo biotecnológico como um todo. Proteínas como lectinas também podem apresentar papel antimicrobiano indireto, através da interferência no processo de aderência e invasão na célula hospedeira, impedindo que ele se estabeleça e se reproduza e tornando-o alvo para anticorpos presentes na corrente sanguínea (Procópio et al., 2016).

Essa classe de proteína está envolvida em diversos eventos no sistema de defesa de animais e plantas, expressando atividade imunomoduladora,

reconhecimento e adesão celular. Atividade antifúngica também foi observada em lectina, na qual a interação da lectina com as estruturas dos fungos *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum lindemuthianum* e *Saccharomyces cerevisiae* inibiu o crescimento dos mesmos (Freire et al., 2002). Também as lectinas expressaram atividade inseticida inibindo o crescimento de insetos, retardando o fluxo alimentício do inseto por meio de interações na região epitelial do intestino do mesmo induzindo-os a morte. Oliveira et al., (2011) avaliou a atividade bioinseticida de *Moringa oleifera* lectin (cMOL) frente as larvas de *Anagasta kuehniella* (mariposa de farinha) e identificou que as larvas tratadas com cMOL tiveram uma taxa de mortalidade de 27% quando atingiram a fase de pupa quando comparado com o controle.

Em função de suas propriedades, lectinas vêm sendo largamente aplicada no campo biotecnológico, dando-lhe maior ênfase em sua ação no reconhecimento celular, atuando como sonda de histoquímica, para caracterizar diferentes tipos de células cancerígenas de acordo com as suas variações de padrões de carboidratos de superfície de membrana (Paneca, 2015; Jiménez-Castells et al., 2008; Rêgo et al., 2013). Também vale salientar que lectinas estão sendo usadas para estudo do nível de glicosilação de diversos tecidos para uma melhor compreensão do processo evolutivo baseados na composição glicídica dessas células, uma vez que carboidratos de membrana e gliconjugados carregam informações genéticas de suas respectivas espécies de origem (Jones et al., 2014). A SteBL isolada da casca e caracterizada nesse trabalho trata-se de uma lectina monomérica de 24 kDa de natureza ácida com estabilidade a variação extrema de pH e temperatura. Ela apresenta alta afinidade a lactose e não necessita de cátions divalentes para manter a interação com hidratos de carbono.

2.0 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – Proteínas

Proteínas são moléculas constituídas por resíduos de aminoácidos interligados por ligações peptídicas e outras interações de acordo com o arranjo espacial da proteína. Diversos oligopeptídeos possuem papéis biológicos importantes, a exemplo de diversos hormônios de animais vertebrados como a ocitocina, composta por 9 (nove) resíduos de aminoácidos, o mesmo é produto de secreção da glândula do sistema endócrino denominada neuro-hipófise. Este peptídeo é responsável pela contração muscular do útero em trabalho de parto e pela estimulação da glândula mamária em mulheres no período de lactação. Diversos peptídeos são largamente aplicados na indústria, tendo em maior destaque o aspartame, um dipeptídeo com um alto poder adoçante, empregado em refrigerantes, adoçantes artificiais e em diversos produtos de origem industrializada. Alguns peptídeos são altamente tóxicos ao nosso organismo, a amantina por exemplo, octapeptídeo secretado por algumas espécies de cogumelos (ex: *Amanita phalloides*) são potencialmente venenosos ao nosso organismo, provocando ao fim de seu período latente, diarreia líquida, sede, dores abdominais, vômitos e perda de peso (Garcia et al., 2015). Existe também as estruturas peptídicas mais complexas, como os polipeptídeos que constituem as proteínas.

São encontradas largamente na natureza na maioria dos organismos vivos, desde microrganismo como a bactéria, presente na constituição em sua constituição celular até nos seres humanos, exercendo diversas funções biológicas. Essas macromoléculas possuem diversas funções biológicas, como no caso da queratina que constitui os chifres de touros, conferindo maior resistência ao mesmo. Também estão presente na base de cabelos e unhas dos animais. Outras funções competem às proteínas, como a de transportes de outras moléculas essenciais para o metabolismo dos organismos vivos, no caso do papel da hemoglobina no transporte de oxigênio no sangue, também elas desempenham um importante papel na transdução de sinais e na comunicação entre células por meio da matriz extracelular, a exemplo dos proteoglicanos de membrana celular, além de atuarem na regulação metabólica como os hormônios, que por sua vez são proteínas de sinalização (STRYER et al, 2008).

Todas as proteínas, independente da função e do nível de complexidade são formadas por aminoácidos de um grupo composto por 20 aminoácidos que são ditamente proteicos (NELSON, 2015).

Apesar de muitas proteínas apresentarem resíduos de aminoácidos e cadeias polipeptídicas similares, desempenham funções biológicas e propriedades químicas (solubilidade, estabilidade térmica, etc.) completamente distintas. Na maioria das vezes suas funcionalidades podem ser co-dependente de outras moléculas, ou por integração de um ligante ativador denominado substrato. Os proteoconjugados por exemplo necessitam de seus grupos prostéticos, região não proteica, para desempenharem suas funções biológicas, a exemplo dos proteoglicanos que possuem glicídios como grupo prostéticos ligados em sua estrutura.

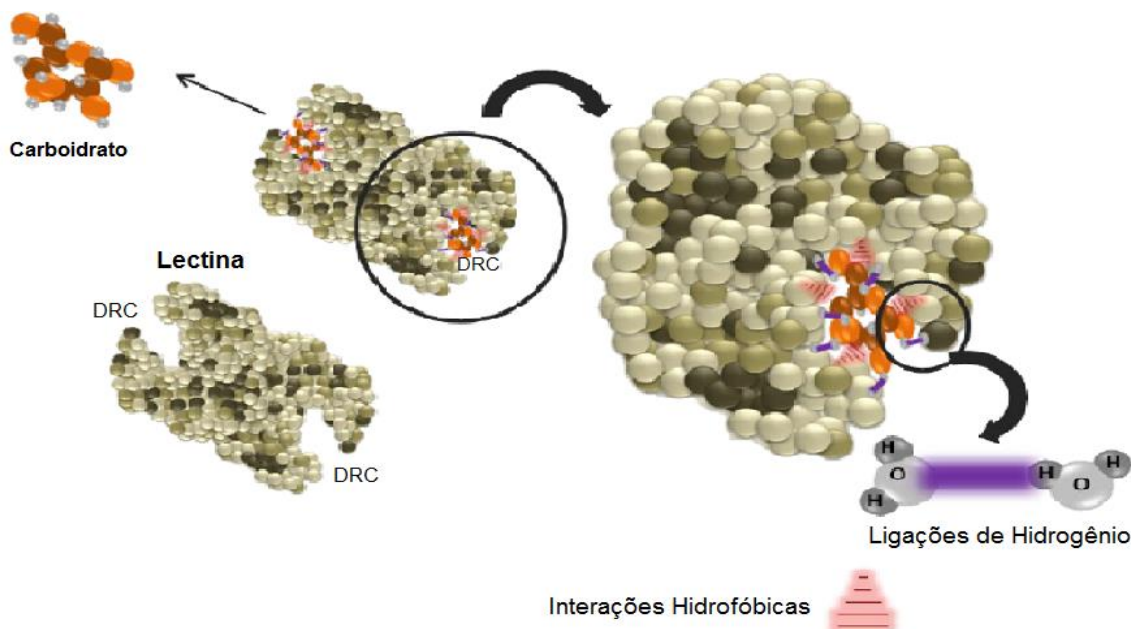
2.2 - Lectinas: classificação e ocorrência

As proteínas se associam a inúmeras moléculas, formando complexos proteína-ligante, as interações mais proeminentes são de natureza iônica, forças de Van der Waals, ligações de hidrogênio e ligações covalentes entre grupos tióicos. Por decorrência da sequência de aminoácidos em sua cadeia polipeptídica, as proteínas podem assumir diferentes propriedades, o que por consequência nos favorece identificá-las como sendo pertencentes às classes, famílias, e de funções biológicas distintas.

Entre os diversos tipos de diferentes proteínas encontram-se as lectinas, que por sua vez são proteínas ou glicoproteínas de origem não imune (participam do sistema de defesa em animais plantas e animais, porém não são expressas pelas células de defesa) , com pelo menos um domínio não catalítico, aglutinantes de células e glicoconjugados, com capacidade de ligar-se reversivelmente a mono/oligossacarídeos específicos através de ligações de hidrogênio e interações de Van der Waals sem alterar a estrutura covalente destes (Cruz, 2015; Ferreira, 2015).

Essa classe de proteínas é classificada de diversas formas, dentre as diversas maneiras de classificação de lectinas, podemos citar: especificidade ao carboidrato ou glicoconjugado, quantidade e tipos de domínios de ligação, a dependência de íons divalentes (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} e Zn^{2+}) para exercer seu papel biológico e por fim, quanto à fonte de extração.

Figura 01 - Esquema ilustrativo da interação de lectina com carboidrato específico através de domínio de reconhecimento a carboidratos – DRC formando complexo lectina-ligante.



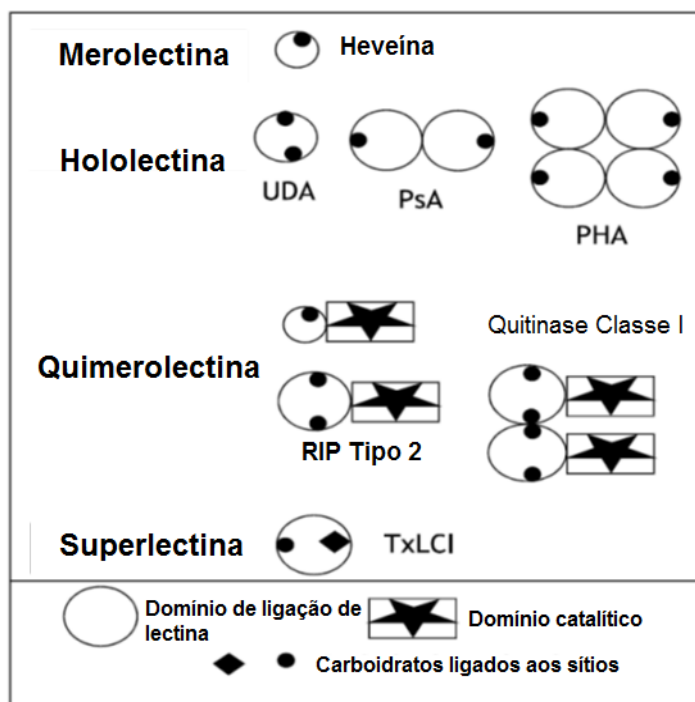
Fonte: Adaptado de Silva et al., 2012.

Tabela 01 - Classificação de lectinas quanto à especificidade ao ligante;

Famílias	Exemplos	Fonte
Lectinas ligadoras de glicose/manose	<i>Cratylia mollis</i> seeds Lectin (CramoLL)	Melo et al., 2011
Lectinas ligadoras de N-acetilglicosamina	<i>Schinus terebinthifolius</i> Leaves Lectin (SteLL)	Gomes et al. (2013)
Lectinas ligadoras de galactose	<i>Bothrops leucurus</i> venom Lectin (BIL)	Nunes et al., 2011
Lectinas ligadoras de N-acetilgalactosamina	Lectina de macrófago humano (hMGL)	Takada et al., 2004
Lectinas ligadoras de fucose	<i>Colossoma macropomum</i> Serum Lectin (ComaSeL)	Carvalho et al., 2012
Lectinas ligadoras de ácido siálico	<i>Gymnopilus spectabilis</i> Lectin (GSL)	Alborés et al., 2014
Lectinas ligadoras de glicoproteínas	<i>Sebastiania jacobinensis</i> Bark Lectin (SejaBL)	Vaz et al., 2010
Lectinas ligadoras de mucina	<i>Aspergillus gorakhpurensis</i> Lectin	Singh et al., 2017

Em relação a classificação de lectinas em função do número de sítios de ligação (Figura 02), elas podem ser assim divididas: merolectinas (possui apenas um domínio de ligação a glicídios), hololectinas (contém mais de um domínio de ligação ao carboidrato), quimerolectinas (consiste em uma integração de lectinas que possui apenas um domínio de ligação a carboidratos e outro sítio ativo com função catalítica, porém não apresenta atividade biológica) e por fim as superlectinas (trata-se de um grupo de lectinas que apresenta no mínimo dois sítios de ligação com habilidade de interagir com carboidratos diferentes) (Carneiro, 2011). Šulák et al., (2011) caracterizaram uma superlectina hexamérica com pelos menos dois domínios de ligação a carboidratos distintos, trata-se da *Burkholderia cenocepacia* BC2L-C, onde os autores demonstraram que a mesma apresentava em sua região C-terminal dois domínios distintos de reconhecimento a carboidratos, sendo um dos domínios específico a resíduos de manose e o outro sítio de ligação apresentava especificidade a monômeros de L-glycero-D-mano-heptose, logo a mesma consegue interagir com diferentes carboidratos ao mesmo tempo, e que a região N-terminal da BC2L-C apresentava habilidade em interagir com fucose de membrana de células epiteliais, estimulando a produção de IL-8, demonstrando atividade imune estimuladora.

Figura 02 – Esquema representativo da classificação de lectinas quanto aos números de domínios de ligação.



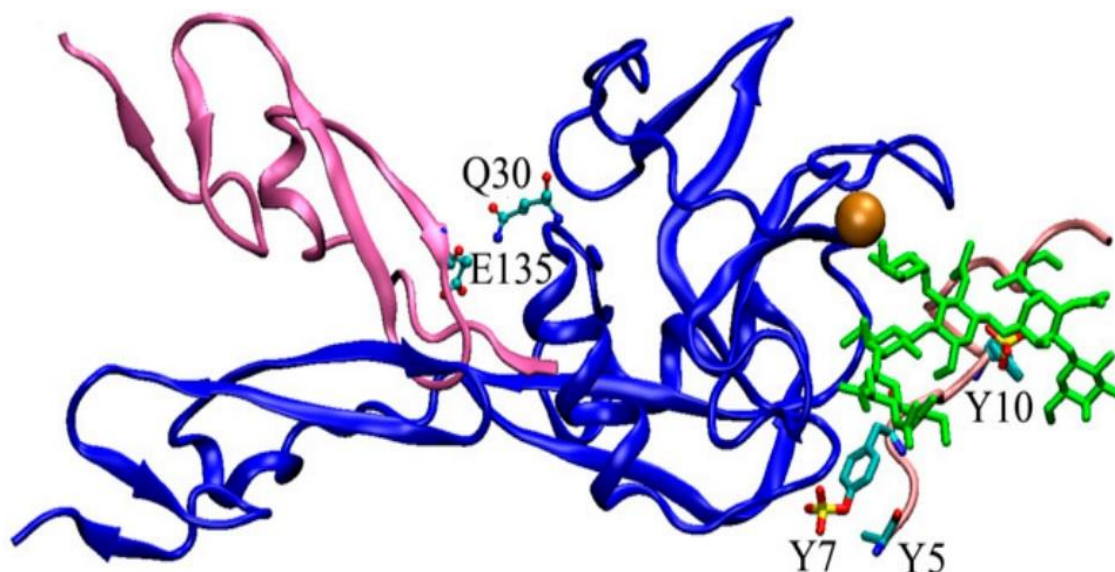
Fonte: Adaptado de Fokunang & Rastall, 2003.

O complexo grupo de lectinas apresenta uma organização interna devido a sua multiplicidade funcional nos organismos vivos. Dentro dessa classe diversificada de lectinas três famílias tem sido bastante caracterizadas, são elas: Selectinas (Tipo E, P e L), galectinas e as lectinas Tipo C (C-Type).

Selectinas: Trata-se de uma família de proteína ou glicoproteína de membrana. Possuem um importante papel no reconhecimento, adesão celular e no sistema de defesa de animais (LEHNINGER, 2015). Essas macromoléculas possuem alta especificidade e afinidade aos resíduos de ácido siálico de Lewis, necessitando de íons de Ca^{+2} para estabelecer a interação com o carboidrato, logo são lectinas cálcio dependente (Johannes et al., 2016). A dependência de íons divalentes de cálcio (Ca^{+2}) para estabelecer interações com glicanos pode estar relacionado com a presença de resíduos de aminoácidos carregados negativamente presente nos domínios de reconhecimento a carboidratos. Sendo que para ocorrer a interação eletrostática entre os átomos carregados é preciso que os estados de oxidação do doador (nucleófilo) e do receptor (eletrólito) de elétrons sejam compatíveis, levando a formação do complexo energeticamente estável. Sabe-se que a presença de cátions divalentes na estrutura de proteínas são importantes na estabilidade e em sua atividade de interação. Yoshida et al., (2017) identificaram a presença de um cátion de zinco (Zn^{+2}) estabilizando os domínios de reconhecimento de carboidrato de uma galectina – 9 humana através de ligações coordenadas com os resíduos aminoácidos presente nos sítios de ligação.

Algumas enzimas do sistema da via glicolítica utilizam cátions divalentes de magnésio para estabilizar e interagir com seus ligantes, a exemplo da Hexocinase glicolítica que para catalisar a transferência de grupamento fosfato da molécula de ATP para a molécula de D-glicose necessita de cátions divalentes para estabilizar e interagir com a molécula de ATP, também podemos citar a ação da enzima enolase (enzima glicolítica) faz-se uso de dois cátions de magnésio para estabilizar o seu substrato, nesse caso a molécula de 2-Fosfoglicerato, e estabelecer a sua interação com o mesmo (Nelson e Cox, 2015). Desse mesmo modo, selectinas utilizam íons de cálcio (II) como contra-íon para promover a sua interação com o seu respectivo ligante. Lou & Zhu (2007) por meio de co-cristalização mapearam a estrutura de uma P-selectina complexada com seu ligante (Figura 03).

Figura 03 – Estrutura do complexo lectina-ligante obtido por co-cristalização.



P-selectina (estrutura em forma de fita em azul), conjugada a um peptídeo (rosa), ligada a um ligante (verde) mediada por cátion de cálcio II (esfera dourada). **Fonte:** Lou & Zhu (2007).

Galectinas: Uma família de lectinas que possuem domínios de ligação altamente específicos a β -Galactose e glicoconjugados que possuem resíduos de β -Galactose como sua região glicídica. Essas proteínas são encontradas largamente em organismo vivos, participando em diversos eventos metabólicos em animais, plantas, invertebrados e diversos microrganismos (VARKI et al., 2009). A primeira galectina relatada na literatura foi extraída de tecidos de órgãos elétricos de *Electrophorus electricus* (peixe Poraquê) em 1975, conseqüentemente denominada como electrolectina (homodímero de 15 kDa) e classificada em 1994 como Galectina - 1. Essa lectina foi capaz de reconhecer os carboidratos de membrana de eritrócitos de coelhos tripsinizados e a mesma teve sua atividade hemaglutinante fortemente inibida por resíduos de Galactose expressos pelas hemácias de coelho tripsinizadas (VARKI et al., 2009).

As galectinas são conhecidas como lectinas do tipo S, em função de sua dependência dos grupamentos sulfidríla presentes nos resíduos de cisteína encontrados em sua sequência primária de aminoácidos. Essas proteínas também dependem de divalentes de cálcio para interagir com seu respectivo ligante e apresentar atividade biológica e de condições redutoras, uma vez que, elas precisam que seus grupamentos sulfidrílas (SH) estejam reduzidos para estabelecer interação com glicídios e glicoconjugados. As galectinas encontradas em humanos apresentam

uma sequência aminoacídica altamente conservada em seus domínios de reconhecimento a carboidratos (DRC's) em animais com está descrito na figura 04.

Figura 04 – Similaridade na sequência primária presente DRC's de galectinas de origem humana.

	41	* * *		56	*	66	*	71	* *
Galectin-1	-NLCL	HFNPR	FNAHGD	-----	ANTIV	CNSKD	-GGAWG	-TEQRE-	
Galectin-2	-KLNL	HFNPR	FFS	-----	ESTIV	CNSLD	-GSNWG	-QEERE-	
Galectin-3	-DVAF	HFNPR	FNENN	-----	RRVIV	CNTKL	-DNNWG	-REERQ-	
Galectin-4	-DVAF	HFNPR	FDG	-----	WDKVV	FNTLQ	-GGKWG	-SEERK-	(N-term)
	-DIAL	HINPR	MG	-----	NGTVV	RNSLL	-NGSWG	-SEKK-	(C-term)
Galectin-7	-DAAL	HFNPR	LD	-----	TSEVV	NSKE	-QGSWG	-REERG	

Fonte: Adaptado de VARKEI et al., 2009.

Essas lectinas podem ser encontradas em diferentes compartimentos celulares, foram identificadas no núcleo, citoplasma e na superfície externa da membrana plasmática. Em animais, as galectinas possuem funções variadas, participam na adesão e reconhecimento celular pelo fato de ser um componente da matriz extracelular e de membrana. Também participam na regulação da atividade celular e em resposta imune e inflamatória, sabe-se que essas proteínas é um produto de expressão comum na maioria das células de defesa em humanos (HSU et al., 2009).

Lectinas Tipo C (C-Type): São lectinas cálcio-dependente, ou seja, dependem de cátions divalentes de cálcio para estabelecer sua interação a carboidratos. Essa classe de lectina apresenta domínios de reconhecimento a carboidratos cálcio-dependente, sendo confundidas com outras classes de proteínas que apresentam domínios de ligação cálcio-dependente similares ou que possuem alto grau de semelhança estrutural a nível de composição e dobramento de seus sítios de ligação, porém não se ligam a carboidratos (Zelensky et al., 2005). Pinto-Junior et al., (2017) isolaram uma lectina de sementes de *Pisum arvense* (Ervilha forrageira) que apresentava duas regiões de ligação a cátions divalentes de cálcio e magnésio nas subunidades laterais de seus dois de ligação a carboidrato. Eles observaram que ambos os cátions atuavam na estabilização dos domínios de ligação a carboidrato e também participavam diretamente na mediação da interação da lectina com os hidratos de carbono para a formação do complexo.

Essas proteínas são encontradas em todos os organismos vivos, em maior parte nos animais (Cummings et al., 2009). As lectinas do tipo C possuem capacidade de reconhecer os arranjos padrões de carboidratos presente nas membranas de diversos microrganismo em função de seus múltiplos domínios de ligação, podendo interagir entre si formando estruturas mais complexas, a exemplo das collectinas solúveis que formam estruturas oligoméricas maiores (Cambi et al., 2005).

Uma vasta gama de lectinas tem sido isolada, a partir de diferentes fontes biológicas: microrganismos (Bhowal et al., 2005; Khan et al., 2007), invertebrados (Battison & Summerfield, 2009) e vertebrados (Lopes-Ferreira et al., 2011; Nunes et al., 2011). Nos vegetais, as lectinas têm sido encontradas nas folhas (Napoleão et al., 2012), flores (Santos et al., 2009), sementes (Da Silva et al., 2015), cascas (Vaz et al., 2010), raízes (Cruz, 2015) e rizomas (Yang et al., 2011; Santana et al., 2012). Além desses mostrados acima, lectinas homologas também foram reportadas de espécies aquáticas, como o *Rubripes Takifugu* extraída do muco tegumentar, e do lúmen intestinal (Tsutsui, 2006), assim como a partir do muco tegumentar e veneno do peixe escorpião, onde puderam averiguar a ação destas moléculas na susceptibilidade de integritas a toxinas específicas (Evangelista, 2009).

2.3 - Funções biológicas de lectinas e seus respectivos mecanismos de ação

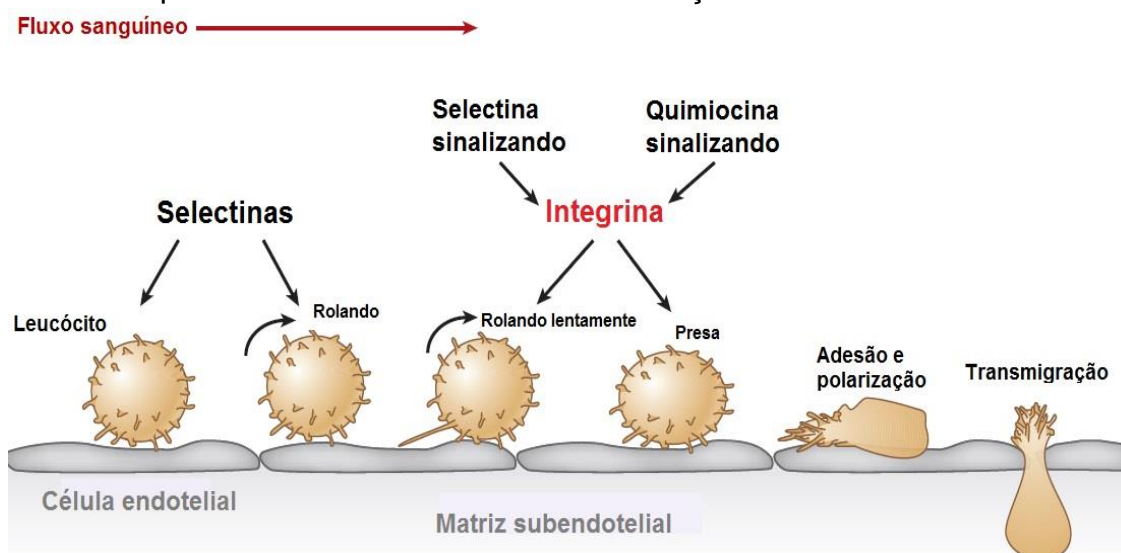
A respeito dos carboidratos, é importante destacar a sua rica variedade química, a versátil função biológica bem como a possibilidade de o mesmo agir em sítios de reconhecimento (receptores biológicos), tal propriedade faz com que haja lectinas estritamente coerente a esta estrutura, de forma que uma simples mudança no esqueleto carbônico do carboidrato, ou mesmo a ocorrência de grupos substituintes, possibilite regiões alteradas de reconhecimento com a proteína, o que condiz com uma má associação entre as moléculas. Em função da grande versatilidade funcional, as lectinas exercem papéis variados em organismos vivos, destacando-se a sua função no sistema de defesa de diversos organismos vivos.

Dentro desse complexo grupo, estão inseridas as selectinas, proteínas de membranas que participam no sistema de reconhecimento e adesão celular, também exercem um importante papel no sistema imune inato dos animais, pelo fato dessas lectinas intermediar a migração de macrófagos do sistema circulatório para regiões de infecções por meio das paredes dos vasos capilares, sabendo que as selectinas – P

atuam como receptores de ancoragem de leucócitos ao interagirem com os componentes glicídicos de superfície de membrana dessas células de defesa, imobilizando os macrófagos e possibilitando a sua migração para diversos tecidos, dando início aos eventos relacionados à resposta imunológica de combate a infecções em regiões localizadas (figura 05) (McEver & Zhu, 2010).

L-Selectinas estão presentes na superfície de diversas células de defesa, como os monócitos, macrófagos, neutrófilos, linfócitos e glanulócitos, sendo essenciais na adesão e reconhecimento de antígenos de células alvo para desempenhar desencadear a resposta imunológica contra agentes infecciosos (Figura 05) (Johannes et al., 2016).

Figura 05 – Função das interações lectina-ligante durante a movimentação de leucócitos para recrutamento a um sítio de infecção.



Fonte: Adaptado de McEver & Zhu, 2010.

Sabe-se também que o sistema de defesa humano possui uma via alternativa do sistema complemento que faz uso de lectinas, no caso da via de lectinas ligadoras de manose (MBL). Esta via utiliza uma lectina que possui alta afinidade e especificidade a manose, onde esses monossacarídeos são amplamente encontrados na superfície celular de bactérias, não sendo encontrados em células humanas (Pillai et al., 2015). Tal componente possibilita o reconhecimento desses microrganismos e suas respectivas marcações para facilitar o processo de fagocitose por macrófagos por meio de opsonização, potencializando a resposta imunológica (Procópio et al., 2017).

Prasanna et al., (2015) demonstraram o feito mitogênico da *Allium cepa* agglutinin (lectina de cebola), que ao tratar os linfócitos T de camundongos com uma concentração de 0,01 µg de *Allium cepa* agglutinin por um período de 24 horas, observou um aumento de cerca de 4 vezes maior a proliferação celular quando comparado com o controle negativo, células não estimuladas. Também eles demonstraram a atividade imunomoduladora de lectinas, quando o mesmo avaliou por um período de 24 horas uma linhagem de macrófagos de ratos tratados com *Allium cepa agglutinin*, observaram um aumento de cerca de 5 a 6 vezes na produção de óxido nítrico quando comparado com os macrófagos de ratos não tratados com a lectina. Esse aumento na produção de óxido nítrico (ON) têm uma forte relação com a ação lectinas na estimulação de macrófagos para produzir essas substâncias que atuam na destruição de células alvo e vasos. Sabe-se que, a produção de óxido nítrico está diretamente relacionada à resposta inflamatória sinalizadas pelas citocinas (Sharon & Jacqueline, 2000).

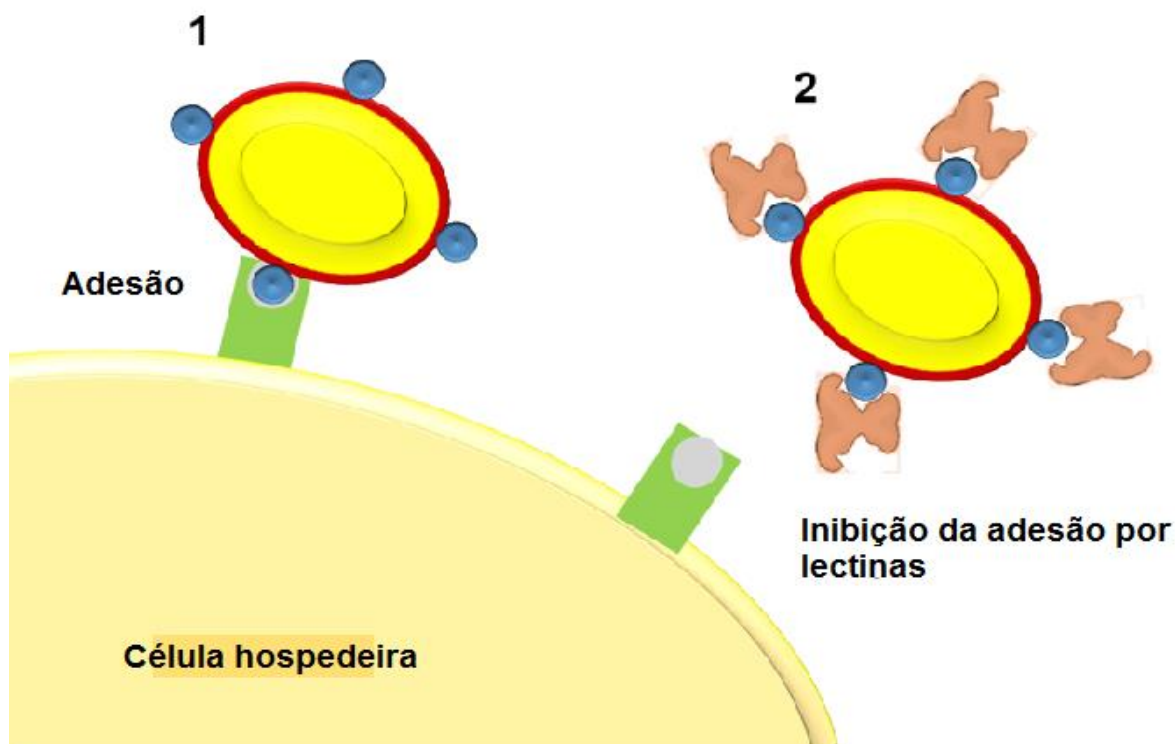
O processo de sinalização entre células mediada por lectinas ocorre de forma estimulativa, ou seja, ela ao se ligar com seu receptor de membrana específico seja ele carboidrato ou regiões glicídicas de glicoconjugados, como as glicoproteínas de membrana, induz uma cascata de reações enzimáticas no meio intracelular que ocasiona a divisão celular por meio de mitose (Hamid et al., 2013). Este importante papel de lectinas reforça a sua importância no sistema de defesa de animais e plantas, uma vez que as células do sistema de defesa, assim como as demais células, necessitam passar por um processo de renovação e diferenciação celular.

Rao et al., (1984) já haviam identificado o efeito de lectinas mitogênicas sobre a atividade de enzimas-chaves do metabolismo de nucleotídeos, componentes essenciais para a síntese do material genético (DNA e RNA), onde ele observou a ação da concanavalina A (Con A) e fitohemaglutinina (PHA), ambas de origem vegetal, sobre a ação da DNase I (endonuclease que degrada a fita de DNA, liberando fragmentos menores para a ação de outras enzimas do metabolismo do DNA) de linfócitos humanos, sendo observado uma diminuição. Tal efeito foi de suma importância para a compreensão do processo de renovação de células de defesa em animais.

Proteínas como lectinas também podem apresentar papel antimicrobiano indireto, através da interferência no processo de aderência e invasão na célula

hospedeira (Figura 06), impedindo que ele se estabeleça e se reproduza e tornando-o alvo para anticorpos presentes na corrente sanguínea (Procópio et al., 2017)

Figura 06 - A adesão das bactérias à membrana de célula hospedeira.



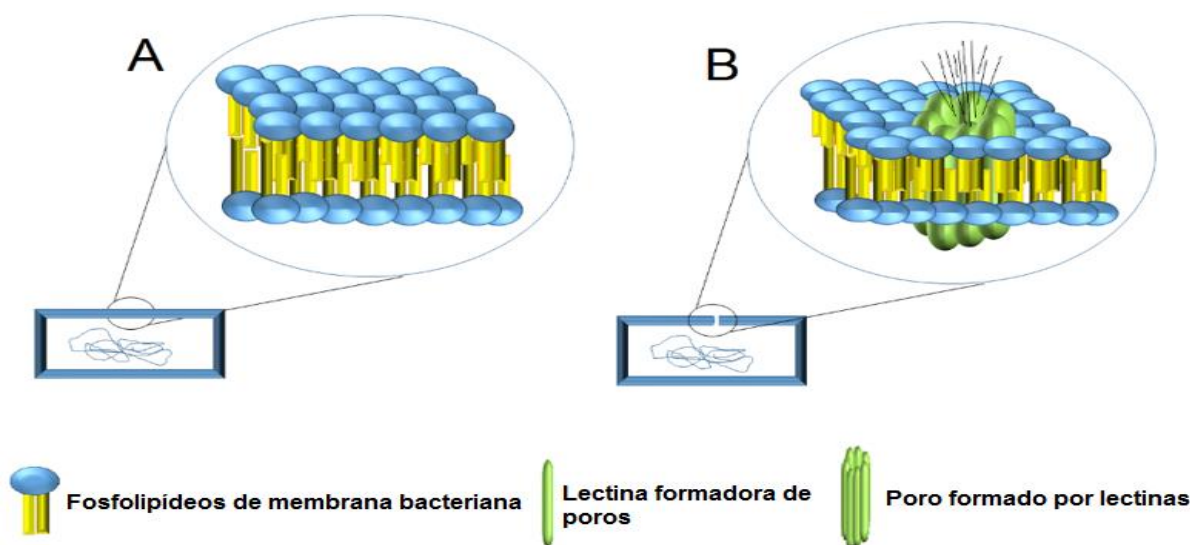
(1) pode ser prejudicada devido ao bloqueio da interação por uma lectina antibacteriana que reconhece e se liga aos carboidratos da superfície bacteriana (2). **Fonte:** Adaptado de Procópio et al., 2017.

Diversos invasores celulares fazem uso de lectinas no processo de adesão celular para adentrar na célula, por exemplo, o vírus da influenza - A (H1N1) utiliza uma lectina para invadir a célula hospedeira e se replicar no interior da célula e após a liberação de novas partículas virais recém-sintetizadas na circulação promovem novas invasões e promovendo um evento de infecção viral, uma vez que esse vírus expressa lectinas com alta afinidade aos resíduos de ácido siálico terminais ligados aos polissacarídeos de membrana (Nicholls et al., 2008). A bactéria *Helicobacter pylori*, causadora de úlcera gástrica tem uma lectina de membrana que possui alta afinidade ao oligossacarídeo de Lewis (Le^b), região glicídica comumente encontrada em lipolissacarídeos e glicoproteínas de membrana. Sendo que, ao ocorrer a adesão da bactéria com as células do epitélio que reveste o estômago mediada pela lectina, a *H. pylori* promove a infecção localizada (Marshall, 1993). Pensando nos receptores de membrana de agentes patológicos, fármacos estão sendo desenvolvidos com a

capacidade de interagir com esses domínios de ligação de membrana presente em diversos microrganismos patológicos com a finalidade de inibir a adesão celular, reduzindo os casos de doenças virais e bacterianas.

Dentre os possíveis mecanismo de ação de lectinas relatado na literatura, os mecanismos de alteração na permeabilidade de membrana de bactérias por meio de formação de poros na superfície celular têm sido bastantes explorados. A atividade contra patógenos pode ocorrer de forma direta, levando a inibição e morte de microrganismos por mecanismos variados que levam a alterações morfológicas incluindo a presença de poros em bactérias Gram-positivas e borbulhamento da parede celular de bactérias Gram-negativas levando ao extravasamento do conteúdo citoplasmático (Figura 07) (Santi-Gadelha et al., 2006, Correia et al., 2008) ou através de inibição de enzimas associadas com o crescimento bacteriano (Matsumoto et al., 1999). Lectinas podem atuar de forma indireta, induzindo a alterações no metabolismo energético de bactérias, a exemplo da inibição respiratória provocada por lectinas em *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Shewanella sp.*, prejudicando o desenvolvimento bacteriano em função do déficit energético (Qu et al., 2015).

Figura 07 - Esquema representativo da morfologia de superfície de membrana de bactérias.



(A) Representação esquemática da membrana bacteriana intacta. (B) e do vazamento do conteúdo intracelular devido a formação de poros causado pela ação de lectinas. **Fonte:** Adaptado de Iordache et al., 2015; Fang et al., 2016.

Apesar da grande variedade de lectinas nos organismos vivos, pouco se conhece sobre o seu mecanismo de ação no sistema de defesa de plantas e de animais contra agentes bióticos danosos a estes seres vivos. Nas plantas a expressão de lectinas é potencializada por meio de estímulos externos, como por exemplo a ação de fitopatógenos e outras injúrias (Procópio et al., 2017). Lectinas solúveis presentes no citosol de células vegetais participam diretamente do sistema de defesa de plantas, como por exemplo a calreticulina - uma lectina ligadora de glicose, presente no retículo endoplasmático das células de *Arabidopsis* (erva estrelada), sofre degradação e seus fragmentos atuam como chaperonas no processo de modulação de peptídeos de membrana que atuam como receptores de antígenos bacterianos (Procópio et al., 2017).

2.4 - Lectinas e suas aplicações biotecnológicas

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas que possuem alta afinidade e especificidade a carboidratos, em função de sua capacidade no reconhecimento de componentes glicídicos de superfície de membrana, elas participam de diversos eventos no metabolismo de plantas e animais, a exemplo de seu importante papel no reconhecimento, sinalização e adesão celular (Lehninger, 2015). Em função de suas propriedades, lectinas vêm sendo largamente aplicada no campo biotecnológico, dando-lhe maior ênfase em sua ação no reconhecimento celular, atuando como sonda de histoquímica, para caracterizar diferentes tipos de células cancerígenas de acordo com as suas variações de padrões de carboidratos de superfície de membrana (Paneca, 2015; Jiménez-Castells et al., 2008; Rêgo et al., 2013). Também vale salientar que lectinas estão sendo usadas para estudo do nível de glicosilação de diversos tecidos para uma melhor compreensão do processo evolutivo baseados na composição glicídica dessas células, uma vez que carboidratos de membrana e gliconjugados carregam informações genéticas de suas respectivas espécies de origem (Jones et al., 2015). Os autores também conseguiram observar uma grande variação nos padrões de glicosilação de células binucleares placentárias de girafa da espécie quando comparado com as células binucleares placentária bovina por meio de marcação com lectinas histoquímicas.

Estudos também comprovaram atividade anticarcinogênica (Rafiq et al., 2013) e afinidade por antígenos de células tumorais (Da Silva, 2015). Pelo fato de lectinas

apresentarem habilidades no reconhecimento do padrão de glicosilação de células cancerosas, elas apresentam-se como proteínas com grande potencial biotecnológico alternativo para o diagnóstico de tumores em regiões localizadas e também na terapia de células tumorais, pois estudos revelam que diversas lectinas apresentam alta citotoxicidade seletiva a células defeituosas, capaz de induzir a destruição celular através de apoptose e autofagia (Martínez et al., 2017). Bird-Lieberman et al., (2012) através de fluorescência demonstrou a alta especificidade e afinidade de lectinas do germe de trigo (WGA) por glicoconjugados de membrana de células cancerígenas do esôfago, onde elas foram capazes de identificar displasia tecidual.

Em função da grande habilidade de lectinas em reconhecer seletivamente microrganismos que causam injúrias em plantas e doenças em humanos, diversos pesquisadores apontam essas proteínas como um potencial agente antimicrobiano (SÁ et al., 2009). Brustein et al., (2012) avaliaram o efeito antibacteriano da lectina de *Eugenia malaccensis* no tratamento da cicatrização de feridas cutâneas em ratos.

Também lectinas vêm sendo empregadas na inibição de biofilmes bacterianos (barreiras físicas formadas por associações bacterianas, importante para alimentação e proteção da cultura bacteriana contra agressores de natureza biológica, física e química), uma vez que para a formação desses biofilmes é necessária uma boa aderência entre as células bacterianas e nutrientes, como açúcares. Bose et al., (2016) ao tratar uma cultura de *Pseudomonas aeruginosa* com lectinas de *Litchi chinensis* (uruvaia), observaram que a inibição do biofilme se mostrou dose-dependente, tendo uma inibição de até 82% quando tratadas com 400 µg de lectina quando comparado com o controle, mostrando assim a habilidade que lectinas têm de inibir a formação de biofilmes bacterianos. Tal função está diretamente relacionada com a capacidade que essas proteínas possuem em inibir a adesão celular, dificultando a aderência para a formação do biofilme. Procópio et al., (2017) observou uma inibição significativa de biofilme de *Staphylococcus saprophyticus* e *Staphylococcus aureus*, quando ambas foram tratadas com 800 µg/mL de CasuL (*Calliandra surinamensis* lectin), sendo que a melhor redução foi para *S. saprophyticus*, que apresentou uma redução de 72% do biofilme bacteriano, apresentando uma redução similar ao antibiótico tetraciclina na concentração de 8 µg/mL.

Atividade antifúngica também foi observada em lectina, na qual a interação da lectina com as estruturas dos fungos *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum lindemuthianum* e *Saccharomyces cerevisiae* inibiu o crescimento dos mesmos (Freire et al., 2002). Também as lectinas expressaram atividade inseticida inibindo o crescimento de insetos, retardando o fluxo alimentício do inseto por meio de interações na região epitelial do intestino do mesmo induzindo-os a morte. Oliveira et al., (2011) avaliou a atividade bioinseticida de *Moringa oleifera* lectin (cMOL) frente as larvas de *Anagasta kuehniella* (mariposa de farinha) e identificou que as larvas tratadas com cMOL tiveram uma taxa de mortalidade de 27% quando atingiram a fase de pupa quando comparado com o controle.

Lectinas vêm sendo empregadas em processos cromatográficos por afinidade para isolamento de carboidratos e glicoconjugados, a exemplo de lipolissacarídeos e glicoproteínas de superfície celular (Lehninger, 2015). Batista et al., (2017) desenvolveram uma fase estacionária por afinidade para remoção de lactose fazendo uso de uma lectina ligadora de lactose purificada a partir de *Brosimum gaudichaudii* (mama-cadela) imobilizada com polianilina, e eles identificaram uma retenção de 47% do teor de lactose presente no leite bovino quando a amostra foi submetida a cromatografia usando a nova matriz.

2.5 - Estratégias de purificação de lectinas

Proteínas são macromoléculas amplamente difundida nos organismos vivos, incluindo vírus, bactérias, fungos, animais e plantas (Albuquerque et al., 2014; Sousa et al., 2016; Sun et al., 2016). São biomoléculas compostas por resíduos de aminoácidos ligados por meio de ligações peptídicas, elas possuem uma grande variação na composição de sua estrutura primária, sabe-se que uma simples variação na combinação e no tipo de aminoácido em uma estrutura primária de proteína altera completamente as propriedades e funções de uma proteína. Proteínas possuem uma grande versatilidade funcional nos processos metabólicos e da estruturação dos organismos vivos e são a elas atribuídas o maior porcentual de biomoléculas que constituem uma célula (Lehninger, 2015). Para o estudo de proteínas é necessária uma preparação extremamente pura para avaliar suas propriedades e funções

biológicas. Para tal feito, é necessário extrair a molécula da fonte de origem, seja ela de planta, animais, bactérias, fungos, vírus, protozoários.

Inicialmente é preparado o extrato bruto do material de partida, onde é preparado uma solução de extração, normalmente soluções tamponantes de variadas faixas de pH, com a finalidade de solubilizar as moléculas oriundas do material de partida. Preparações de extratos brutos também pode fazer uso de soluções salinas, a exemplo do extrato bruto de folhas de *Schinus terebinthifolius* (aroeira-da praia) e *Myracrodruon urundeuva* (Gomes et al., 2013, Napoleão et al., 2013). Também extratos etanólicos são descritos na literatura como solução de extração de lectinas. Em seguida o extrato bruto é submetido a uma série de processos de separação para o isolamento da molécula de interesse, que nesse caso é a proteína. Dentre os passos de isolamento de proteínas, destacam-se: Fracionamento salino, fracionamento com álcool ou cetona e diversos passos cromatográficos (afinidade, gel filtração, troca iônica).

O fracionamento salino é a técnica mais empregada em etapas de pré-purificação de proteínas, uma vez que a adição de sal, a exemplo do sulfato de amônio ($\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$), remove a camada de solvatação que envolve a molécula sem danificar a estrutura molecular, dificultando a sua miscibilidade no meio aquoso. Logo com a remoção da camada de solvatação há um aumento nas interações entre proteínas do meio aquoso, permitindo a formação de um denso complexo de proteínas, provocando assim a precipitação dessas proteínas (Procópio et al., 2017). Esse processo de separação por meio de saturação salina de soluções é conhecido pelo termo em inglês *salting out*. Diversos trabalhos com o uso de sais inertes em etapas de pré-purificação de lectinas são relatados na literatura, como por exemplo o isolamento da β -Prism *Colocasia esculenta lectin* (β -PCL) e *Callosobruchus maculatus lectin*, ambas de origem vegetal (Vajravijayan et al., 2016. Shanmugavel, et al., 2016). Para remoção de sais e outras moléculas de baixo peso molecular, a amostra pré-purificada por saturação salina é submetida a diálise, onde a amostra dentro de um saco poroso é dialisada contra um solvente inerte, a exemplo de água ou solução tampão, com a finalidade de separar por peso molecular (Lehninger, 2015).

Os processos cromatográficos em que uma preparação é submetida depende das propriedades físico-químicas da molécula de interesse, como lectinas possuem a habilidade de ligar-se a carboidratos de superfícies de membrana e regiões glicídicas

de carboidratos reversivelmente por meio de interações fracas, cromatografias de afinidade são comumente empregadas para o isolamento de lectinas (Procópio et al., 2017). Nessa técnica é utilizada na fase estacionária uma matriz que contém ligantes altamente específicos a molécula alvo, no caso de lectinas, os ligantes são glicídios. Diversas lectinas foram isoladas por meio de cromatografia de afinidade, a exemplo da SteLL, extraída da folha de *Schinus terebinthifolius* (aroeira-da-praia), e WSMoL, isolada a partir de sementes de *Moringa oleífera* (acácia-branca), ambas as lectinas purificadas com um único passo cromatográfico, utilizando matriz de quitina, em função de suas afinidades aos resíduos de N-acetilglicosamina (monossacarídeo constituinte da quitina) (Gomes et al., 2013. Oliveira et al., 2016).

Em diversos casos é necessário mais de um passo cromatográfico para purificar a proteína, sendo que a escolha do procedimento cromatográfico leva em consideração as propriedades da biomolécula, como por exemplo: carga líquida da proteína, peso molecular, afinidade e especificidade ao tipo de ligante. Na cromatografia de troca iônica é empregado matrizes carregadas, sendo que, para o isolamento de proteínas carregadas positivamente faz-se o uso de matrizes carregadas negativamente. Nesse passo cromatográfico as proteínas com carga líquida negativa interagem com os ligantes de carga positiva presente na fase estacionária por meio de interação de natureza eletrostáticas, provocando assim uma diminuição em seus fluxos migratórios em torno da matriz, levando a sua separação. Matrizes com ligantes carregados positivamente são denominadas de matrizes troca aniônica ou permutadores iônicos. Há relatos de lectinas aniônicas isoladas por meio cromatografia de troca aniônica, a exemplo da β -Prism *Colocasia esculenta lectin* (β -PCL) que foi isolada por DEAE-Sepharose (matriz de troca aniônica) (Vajravijayan et al., 2016).

A cromatografia de gel filtração, também conhecida como cromatografia por exclusão de tamanho, separa as proteínas por diferença de peso molecular. As proteínas de alto peso molecular percorrem um caminho mais curto e são eluídas mais rapidamente, porém as proteínas de baixo peso molecular penetram nas esferas de diâmetro específico presente na matriz polimérica da fase estacionária e tomam um caminho mais longo, sendo eluídas depois das proteínas de alto peso molecular (Lehninger, 2015). Os géis reticulados de Superdex, Sepharose (polímeros de glicose), Sephacryl (um polímero de dextrano-poliacrilamida) e Bio-Gel

(poliacrilamida) comumente são empregados como fase estacionária em cromatografias de gel-filtração (Procópio et al., 2017).

2.6 - Técnicas básicas de caracterização de lectinas

O isolamento de proteínas é de fundamental importância para o estudo de suas propriedades físico-químicas e seus papéis nos organismos vivos. Os organismos vivos expressam diversas proteínas com propriedades físico-químicas variadas e também diferentes sequências aminoácídicas, de modo que, essas diferenciações são estritamente coordenadas e armazenadas no material genético das células. As formas de caracterizações visam basicamente no estudo de estabilidade térmica e temperatura ótima, resistência a variações de pH, dependência a íons metálicos inorgânicos, composição estrutural, tipos e natureza de interações estabelecidas, número e tipos de domínios de ligações. Para determinação dessas propriedades diversas técnicas de caracterização de proteínas são usadas, dentre elas destacam-se: Eletroforese uni e bidimensional, degradação de Edman (técnica usada para determinar a sequência de estruturas primárias de proteínas por meio de hidrólise de aminoácidos N-terminais) espectrometria de massa (técnica empregada na determinação de massa de biomoléculas, composição de estruturas primárias de proteínas, número de monômeros constituintes) fluorescência, dicroísmo circular – CD, cristalografia (técnica empregada para determinação de interações intra/intercadeias em proteínas, ângulos de ligação e composição de aminoácidos presentes em domínios de ligação e sítios catalíticos em enzimas) (Lenhinger, 2015 e Ito, 2004).

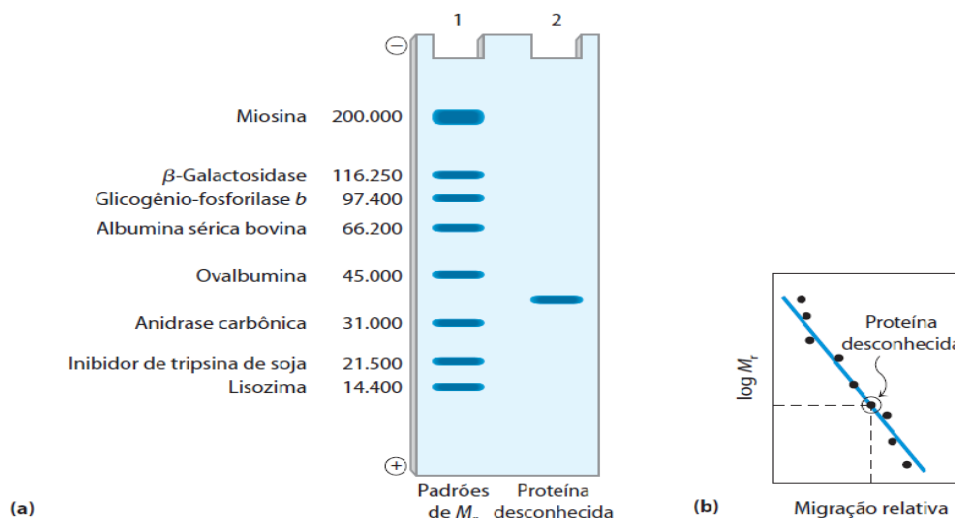
A Técnica de dicroísmo circular é comumente usada para avaliar e quantificar estruturas secundárias de proteínas, a exemplo de estruturas irregulares, α -hélice e β -folhas. Estruturas assimétricas de proteínas ao se chocar com a luz polarizada circulante passada por um polarímetro provoca um desvio dessa luz para esquerda ou para direita. Uma vez que as estruturas primárias possuem um alto grau de liberdade de rotação, proteínas ao interagir com seus respectivos ligantes sofrem mudanças conformacionais, influenciando assim na forma de absorção da luz polarizada, sendo assim perceptíveis na região de absorção - UV (Ito, 2004).

2.6.1 – Eletroforese

Em laboratórios de bioquímica a eletroforese é uma técnica usada para avaliar o grau de pureza de uma amostra, observar o perfil proteico, quantificar o peso molecular de proteínas, determinar o número de subunidades presentes em proteínas e o seu ponto isoelétrico. A eletroforese unidimensional faz-se o uso de um gel de poliacrilamida formado por ligações cruzadas, onde o gel reticulado de poliacrilamida atua como uma peneira, retardando e separando as proteínas e monômeros de uma preparação específica proteica em razão da massa molecular dos componentes. Sendo que as proteínas migram pelo gel em função de um potencial elétrico (E) fornecida por um campo elétrico.

A mobilidade das proteínas pelo gel depende de fatores como: a velocidade, potencial elétrico, carga final (Z) e coeficiente de fricção. Portanto, é possível estimar a migração da molécula pelo gel, a migração pode ser calculada pelas seguintes razões: velocidade/Potencial elétrico ou Carga final/coeficiente de fricção (Lehninger, 2015). Para estimar o peso molecular dos componentes proteicos de uma amostra é utilizado um padrão de peso molecular composto por proteínas de massa molecular conhecida para determinar a massa molecular por meio de comparações de posições dos componentes do padrão e das amostras desconhecidas, fazendo assim um cálculo estimativo do peso molecular (Figura 08) (Lehninger, 2015).

Figura 08 – Cálculo estimativo da massa molecular de proteínas.

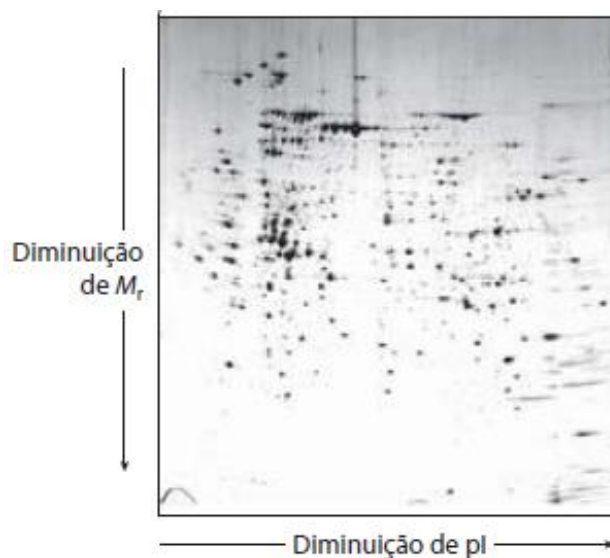


A) – Mobilidade eletroforética de proteínas do padrão de peso molecular e proteína isolada em gel SDS-Poliacrilamida. B) - Um gráfico do $\log M_r$ das proteínas marcadoras *versus* migração relativa durante a eletroforese. **Fonte:** Lehninger, 2015.

Também por meio de técnicas eletroforéticas é possível determinar o ponto isoelétrico (pI), pH onde a carga líquida da proteína e peptídeos é zero, usando a técnica de eletroforese bidimensional. Nesta técnica segue o mesmo princípio de funcionamento da eletroforese unidimensional, porém na eletroforese bidimensional as proteínas são separadas em função do peso e pH do ponto isoelétrico, também conhecida por focalização isoelétrica, nessa técnica é empregada uma fita contendo ácidos e bases simples de diferentes pH na parte superior do gel.

A amostra é aplicada nesta fita e as proteínas migram até o pH referente ao seu ponto isoelétrico e em seguida tem seu fluxo migratório parado. Portanto as proteínas são separadas pelo gel em função do pH referente ao seu pI e do seu peso molecular (Figura 09).

Figura 09 – Gel representativo de eletroforese bidimensional demonstrando a separação dos componentes proteicos de uma amostra em função do pI e massa molecular.



Fonte: Lehninger, 2015.

O uso de técnicas eletroforéticas são utilizadas para estimar o número de subunidades mantidas por pontes dissulfeto estabelecida entre os enxofres (S) presentes na composição dos resíduos de cisteína (Cys) encontradas nas estruturas primárias de diversas proteínas. Uma vez que o uso de reagentes redutores como o 2-Mercaptoetanol é capaz de clivar seletivamente as pontes dissulfeto, separando assim as subunidades proteicas. Existe lectinas formadas por mais de uma

subunidade mantidas por pontes dissulfetos, a exemplo da Concanavalina A (extraídas de sementes de *Canavalia ensiformis*), que possui quatro subunidades mantidas por pontes dissulfetos e a lectina extraída *Oryctes rhinoceros* (besouro de casca), que possui 3 subunidades mantidas por pontes dissulfetos (Pereira et al., 2005 e Velayutham et al., 2017).

2.6.2 - Efeito do pH na atividade de lectinas

Lectinas assim como as demais proteínas apresentam pH referente a sua atividade máxima e uma faixa variante de pH de estabilidade que está correlacionado a sua estrutura nativa. Aminoácidos que compõe proteínas possuem diferentes polaridades em função do pH do meio. O potencial hidrogeniônico (pH) do meio reacional determina a carga líquida de aminoácidos presente na sequência primária de peptídeos e proteínas influenciando diretamente na conformação nativa de proteínas. Os ácidos aspartato e glutamato possuem os seus grupamentos R polares (cadeia lateral) carregados negativamente em pH fisiológico (7,0 – 7,4), pois o grupamento carboxila de suas cadeias laterais sofrem ionização com a desprotonação da hidroxila terminal conferindo assim uma carga líquida negativa em pH fisiológicos (CAMPBELL, 2007).

Aminoácidos são moléculas anfóteras, possuem a capacidade de se estabelecerem nas formas catiônicas e aniônicas a depender do pH que estão inseridos, que por sua vez são determinantes nos tipos de interações que formam as estruturas proteicas mais elevadas. Também sabe-se que, carbonos alfas (C- α) de aminoácidos são responsáveis pela flexibilidade de proteínas, possibilitando a interação entre os grupamentos polares que formam a sua estrutura primária permitindo que proteínas alcancem estruturas tridimensionais e suas funções em organismos vivos. Logo com a variação de pH do meio pode induzir a alteração da carga líquida dos aminoácidos de modo a provocar o rompimento de diversas interações que mantêm a estrutura nativa de proteínas, induzindo a desnaturação de proteínas (Lenhinger, 2015).

Lectinas possuem a capacidade de resistir a variações de pH consideráveis, a exemplo da lectina extraída da recolha de *Fenneropenaeus indicus* - IFL (camarão), manteve atividade hemaglutinante na faixa de pH de 4 – 10, sendo que a faixa de pH

de máxima atividade foi entre 6 e 8 (Chatterjee et al., 2017). Na literatura há relatos de lectinas de origem vegetal e animal que apresentam resistência a variações de pH, como por exemplo a lectina *Allium cepa agglutinin* extraída da cebola que manteve sua atividade na faixa de pH entre 2 – 12,0 e a lectina extraída da pele *Andrias davidianus* (espécie de salamandra) que se manteve estável na faixa de pH variante de 3 a 9,0 (Prasanna et al., 2015. Qu et al., 2015).

2.6.3 - Efeito da temperatura na atividade de lectinas

Temperatura é uma grandeza física que determina o estado físico da matéria e o nível de energia interna em sistemas químicos e biológicos. A quantidade de calor fornecida em um sistema provoca um aumento no grau de agitação das moléculas em função do aumento da energia cinética (Ito, 2004). O aumento da energia cinética favorece as reações químicas, pois a temperatura influencia na constante de velocidade de uma reação química. Em sistemas biológicos, a temperatura pode aumentar ou inibir a atividade de catalisadores biológicos (enzimas), sendo que enzimas na sua maioria são proteínas globulares que possuem estrutura bem definida. O aumento da temperatura pode romper as interações fracas que mantêm a estrutura nativa de proteínas, desfazendo assim a estrutura tridimensional de proteínas. Diversas proteínas isoladas de organismo de extremófilos apresentam termoestabilidade em temperaturas acima de 70°C em função da sua rigidez estrutural e algumas modificações estruturais pós-síntese, a exemplo da metilação dos resíduos de lisina (Lys) na sequência primária dessas proteínas e de mutagênese em regiões específica, porém não são os fatores determinantes de termoestabilidade das proteínas expressas pela maioria dos hipertermófilos (Scandurra et al., 1998).

Pesquisadores de diversas partes do mundo tentam compreender como as proteínas termofílicas são estabilizadas. Estudos indicam que tal estabilização ocorre durante o empacotamento das cadeias hidrofóbicas das extremidades, onde o aumento da estabilidade dessas proteínas é inversamente proporcional a quantidade de centros hidrofóbicos expostos, também foi observado o aumento de forças de Van der Waals na estrutura nativa dessas macromoléculas influencia em sua estabilidade térmica (Chen et al., 2000).

A resistência a altas temperaturas é comum para algumas proteínas, a exemplo das lectinas que possuem estabilidade em temperaturas consideradas altas. Carrillo et al., (2017) observou por meio de técnicas de fluorescência o efeito da temperatura em estruturas de duas lectinas extraídas do fruto do coqueiro anão (*Sambucus ebulus* L.), ebulin-f e SEL-fd, e constatou alteração significativa na estrutura nativas dessas proteínas em temperaturas superiores a 90°C, caracterizando assim um estado de desnaturação.

3.0 - *SCHINUS TEREINBENTHIFOLIUS*

A *Schinus tereinthifolius* Raddi é uma planta que pertence à Família *Anacardiaceae*, conhecida popularmente com aroeira da praia e aroeira vermelha. Esta planta é comum nas partes serranas litorâneas do Brasil, possuem vários tamanhos e larguras, são recobertas por uma casca grossa e escura, também contém ramificações bem desenvolvidas e flácidas. Trata-se de uma planta de médio porte (5 – 10 m) nativa da América do Sul, sendo também encontrada em algumas partes da Europa (Gilbert et al., 2011).

Segundo Feuereisen et al., (2014) a aroeira é utilizada no tratamento de lesões e úlceras de pele e mucosas, contra infecções do sistema respiratório, sistema digestivo e do sistema genito-urinário. O fruto dessa planta possui uma coloração avermelhada e possui uma rica composição de metabólitos secundários, sendo identificados diversos monoterpenos em diferentes proporções e óleos essenciais, porém na folha foram identificadas moléculas com propriedades antioxidantes, a exemplo de flavonoides, já na casca foram encontradas xantonas e esteroides livres (Carvalho et al., 2013). O extrato bruto da casca assim como o filtrado da folha apresenta uma pigmentação forte, indicando a presença de taninos e compostos fenólicos. Além de moléculas do metabolismo secundário, folhas, casca e cerne apresentam macromoléculas do metabolismo primário com potencial antimicrobiano, a exemplo da SteLL, lectina termoestável extraída de folhas de *Schinus tereinthifolius*. A SteLL é um polipeptídeo glicosilado de 14 kDa íon-independente, que expressou atividade antimicrobiana contra as cepas bacterianas: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus* (Gomes et al., 2013). A SteLL é uma lectina diferente da SteBL, pois elas apresentam características físico-químicas distintas, a

SteLL apresenta uma massa inferior à da SteBL, uma vez que, a SteBL apresenta uma massa igual a 24 kDa, cerca de 10 kDa a mais que o peso molecular da SteLL. Tanto a SteBL quanto a SteLL apresentam termoestabilidade similar, mantendo AH quando incubadas a 100°C, porém, a SteLL mantém atividade em pH neutro, já a SteBL apresenta uma redução quase que total da AH quando incubada em pH neutro.

4.0 - OBJETIVOS

4.1 - Geral:

- ✓ Purificar e caracterizar uma nova lectina da casca de *Schinus terebinthifolius* (aroeira da praia).

4.2 - Específicos:

- ✓ Preparar extrato e fração pré-purificada da casca de *S. terebinthifolius*;
- ✓ Isolar lectina da casca de *S. terebinthifolius*;
- ✓ Caracterizar a nova lectina quanto à estabilidade a temperatura e pH;
- ✓ Avaliar o efeito de cátions divalentes na atividade da lectina

5.0 - MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 - Obtenção do material botânico

A planta *Schinus terebinthifolius* (aroeira-da-praia) foi obtida numa reserva de mata Atlântica na cidade de Coruripe, localizada no litoral sul do estado de Alagoas, região Nordeste do Brasil. Em seguida foi preparado uma exsicata e levada para a identificação no herbário do Instituto de Meio Ambiente – IMA na cidade de Maceió/AL. Foi identificada e registrada sob o número 61841. Após a identificação foi trabalhado com a casca dessa planta para confecção do extrato bruto.

5.2 - Purificação parcial da casca de *Schinus terebinthifolius*

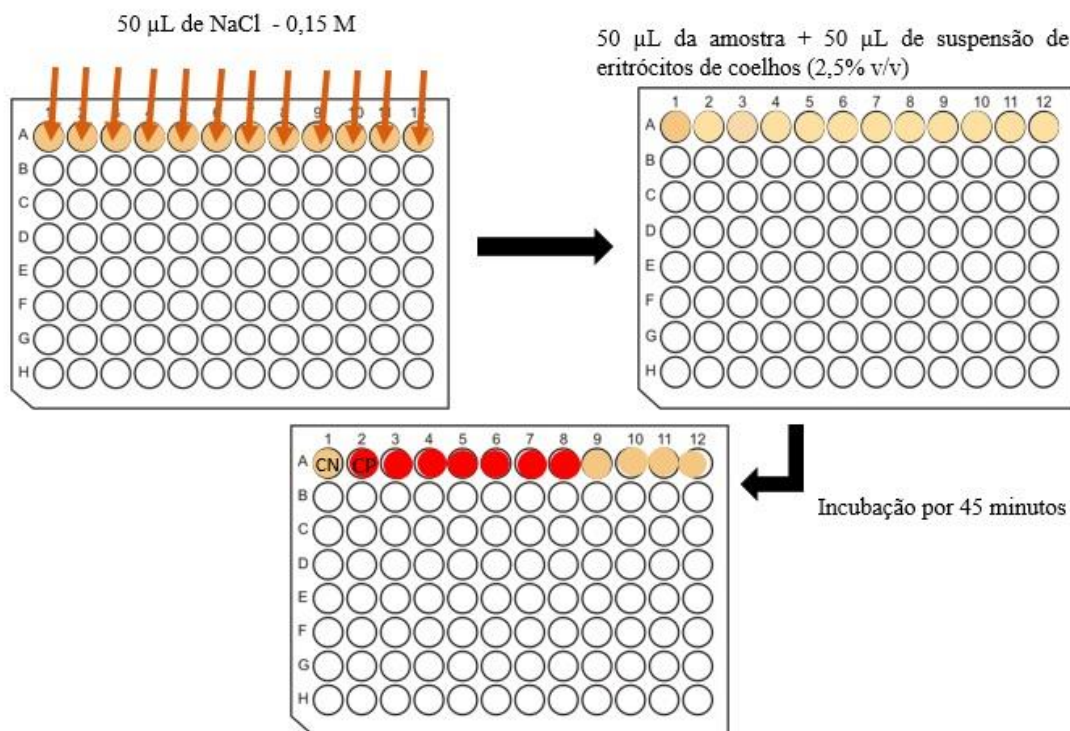
Cascas de *S. terebinthifolius* foi submetida à secagem a temperatura ambiente, triturada e armazenada a -20°C. A farinha (10 g) de cascas foi solubilizada em NaCl 150 mM (100 ml). Após agitação por 16 h a 4 °C, foi efetuada filtração em papel de filtro e centrifugação do filtrado (15 min a 15.000 g) a 4 °C, assim obtendo-se o extrato da casca. O isolamento da lectina foi realizado utilizando-se cromatografia de afinidade em matriz de quitina (10 cm x 1,5 cm) equilibrada com solução salina de NaCl 0,15 M (100 mL) seguida por 100 mL de NaCl 1,0 M e eluída com ácido acético 1,0 M. As frações obtidas foram avaliadas quanto a dosagem proteica e atividade hemaglutinante (AH). Os picos proteicos ativos foram dialisados contra NaCl 0,15 M por 12h para a remoção do ácido acético.

5.3 - Atividade hemaglutinante

O ensaio de atividade hemaglutinante (AH) foi realizado em placas de microtitulação de acordo com a descrição de Paiva e Coelho (1992). Alíquota (50 µL) da amostra foi serialmente diluída (a amostra foi diluída sequencialmente em igual volume de NaCl 0,15 M com a finalidade que sua concentração reduza pela metade a cada diluição) em NaCl 0,15 M antes da adição de 50 µL de suspensão (2,5% v/v) de eritrócitos tratados com glutaraldeído. A AH (título⁻¹) foi expressa como o inverso da maior diluição da amostra que promoveu hemaglutinação. A atividade hemaglutinante

específica (AHE) foi definida pela razão entre o título de hemaglutinação e a concentração protéica (mg/mL).

Figura 10 - Esquema ilustrativo do teste de atividade hemaglutinante de lectinas em placas de microtitulação.



Fonte: elaborado pelo autor, 2017

5.4 - Determinação da concentração de proteína

Para a determinação da concentração de proteína foi utilizado o método de Bradford (1976) usando albumina de soro Bovino com padrão (faixa de concentração de 1mg/mL até 0,03125mg/mL). Para tal feito foram tomados 10 µl das amostras diluídas (1:10), em seguida adicionados 790 µl de água e 200 µl de reagente de Bradford. Posteriormente as amostras foram incubadas por um período de 5 minutos, e medido a absorvância a 595 nm.

5.5 - Efeito do pH na AH da SteBL e teste de estabilidade térmica da SteBL.

A avaliação da estabilidade da atividade hemaglutinante da SteBL isolada da casca de *Schinus terebinthifolius* em diferentes pH foi feito por meio de diálise.

Alíquotas de 50 mL foram colocadas em uma membrana semipermeável com poros de 12 kDa de diâmetro, onde foram dialisadas por 6 horas, com troca a cada 2 horas, contra vários tampões com pH variando de 3 a 12: tampão citrato-fosfato 50 mM (pH 3,0 – 4,0), tampão fosfato de sódio (pH 5 - 7,0), tampão tris-HCl (pH 8 - 9) e tampão glicina-NaOH 50 mM (pH 10 - 12). Em seguida todas as amostras foram submetidas aos testes de atividade hemaglutinante com suspensão (2,5% v/v) de eritrócitos de coelhos. A estabilidade térmica da SteBL foi avaliada mantendo alíquotas de 50 mL a temperaturas variando de 20 a 100°C) durante 30 minutos de incubação. As amostras foram centrifugadas (10.000 rpm, 5 min, 25 °C) para remover precipitados, caso fosse formado, e em seguida foi realizado a atividade hemaglutinante do sobrenadante e quantificado em razão do título. Todos os ensaios foram feitos em triplicata.

5.6 - Teste de inibição da AH da SteBL por carboidratos e glicoproteína

A inibição da HA foi avaliada utilizando carboidratos e glicoproteínas como descrito por Carvalho et al., (2015). Os ensaios de inibição da HA foram realizados como descrito no item 5.3, onde alíquotas de 50 µL da amostra foram submetidas a incubação inicial em solução de carboidrato contendo NaCl 0,15 M durante 15 minutos. Em seguida foram adicionadas 50 µL de suspensão de eritrócitos (2,5 % v/v) nos poços de microtitulação e incubadas por um período de 45 minutos. Uma alíquota de 50 µL da amostra da amostra diluída serialmente em igual volume de solução salina de NaCl 0,15 M incubada com 50 µL de suspensão de eritrócitos de coelho foi usado como controle negativo. As concentrações de soluções inibidoras foram 0,2 M e 0,1 M, 0,5 M e 0,25 M para carboidratos D – Galactose, D – Glicose, Maltose, Fucose, Ribose, D – Frutose, D - Arabinose, D - Lactose, Manose, N-acetil-galactosamina e 500 µg, 250 µg e 125 µg para glicoproteína (fetuína), valores pré-estabelecidos de acordo com Gomes et al., 2013. A inibição é quantificada em razão da redução da AHE quando comparado com o controle negativo.

5.7 – Eletroforese em SDS-PAGE

Foram realizados géis de poliacrilamida na concentração de 10% (v/v) contendo dodecilsulfato de sódio (SDS) de acordo com Laemmli (1970) em 10% As

corridas foram feitas na presença e na ausência de um agente redutor, no caso, 2-Mercaptoetanol. As bandas de proteínas do polipeptídeo da casca e padrões (albumina de soro bovino, 66 000 Da, ovalbumina, 45 000 Da, anidrase carbônica, 29 000 Da, tripsinogênio, 24 000 Da, inibidor de tripsina, 20 000 Da e a-lactalbumina, 14 200 Da, Sigma, EUA) e da amostra foram coradas com azul brilhante de coomassie dissolvido em ácido acético a 10% (v/v) e em seguida revelada com solução descorante (10 % ácido acético, 40% de metanol e 50% água destilada).

5.8 - Purificação da lectina da casca de *Schinus terebinthifolius*

Cascas de *S. terebinthifolius* foi submetida à secagem a temperatura ambiente, triturada e armazenada a -20°C. O pó (10 g) de cascas foi dissolvido em solução tampão de Tris HCl 50mM pH 8,0 (50 ml). Após agitação por 16 h a 4 °C, foi efetuada filtração em papel de filtro e centrifugação do filtrado (15 min a 15.000 g) a 4 °C. O extrato bruto obtido após a centrifugação foi submetido a uma filtração em presença de carvão ativado 10% p/v para a remoção de fenóis, obtendo-se o extrato da casca.

O isolamento da lectina foi realizado utilizando-se cromatografia de afinidade com matriz de quitina (2,5x10 cm), previamente hidratada através de sucessivas lavagens em solução de NaCl 0,15 M. A coluna foi equilibrada com 100 mL de NaCl 0,15 M, seguida de 100 mL de NaCl 1,0 M e eluída com solução de ácido acético 1,0 M. As frações obtidas foram avaliadas quanto a dosagem proteica e atividade hemaglutinante (AH). O pico proteico ativo foi dialisado contra Tris-HCl 50mM pH 8,0 por 12h para a remoção do ácido acético.

O pico protéico que expressou AH previamente dialisado foi aplicado em uma cromatografia de troca aniônica DEAE-celulose (30 x 2,0 cm) equilibrada com Tris-HCl 50 mM pH 8,0 e eluída em um gradiente salino de Tris-HCl 50 mM pH 8,0 contendo 1,0 M de NaCl. As frações obtidas foram novamente avaliadas quanto a AH e dosagem proteica.

6.0 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 – Tabela do fracionamento salino.

Feitos todos os ciclos do fracionamento salino (0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80%), a fração que apresentou maior atividade hemaglutinante específica – AHE foi a fração sobrenadante FS40%, expressando atividade igual a 7 968 (tabela 02). Porém o extrato bruto expressou maior atividade AHE, no valor de 8865,8.

Tabela 02 – Fracionamento salino. Concentração e AHE das frações oriundas do fracionamento salino com sulfato de amônio - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Amostra	Proteína (mg/mL)	AHE
Extrato	0,231	8865.8
F0-20%	0,363	1410.4
FS20%	0,370	5535.1
F20-40%	0,382	1340.3
SF40%	0,257	7968
F40-60%	0	0
FS60%	0,325	6301.5
F60-80%	0,300	853.3
FS80%	0,339	6041.3

Fonte: elaborado pelo autor, 2017

Dentre os precipitados, as frações F0-20% e F20-40% foram as que apresentaram maiores AHE. Tal resultado justifica-se pelo fato dessas frações apresentarem uma baixa concentração de proteica e AH relevante, sabendo que a AHE é calculada em razão da AH pela concentração da amostra (Tabela 02), sendo que, a alta concentração proteica das frações sobrenadante dos ciclos superiores do fracionamento (FS: 20%, 40%, 60% e 80%) pode ser explicada por diversos fatores, dentre os fatores, destacam-se dois: flutuações da fonte luminosa incidente e a presença que cromóforos que absorvem energia no comprimento de onda de 280 nm. Flutuações da intensidade luminosa pode alterar diretamente a absorbância da

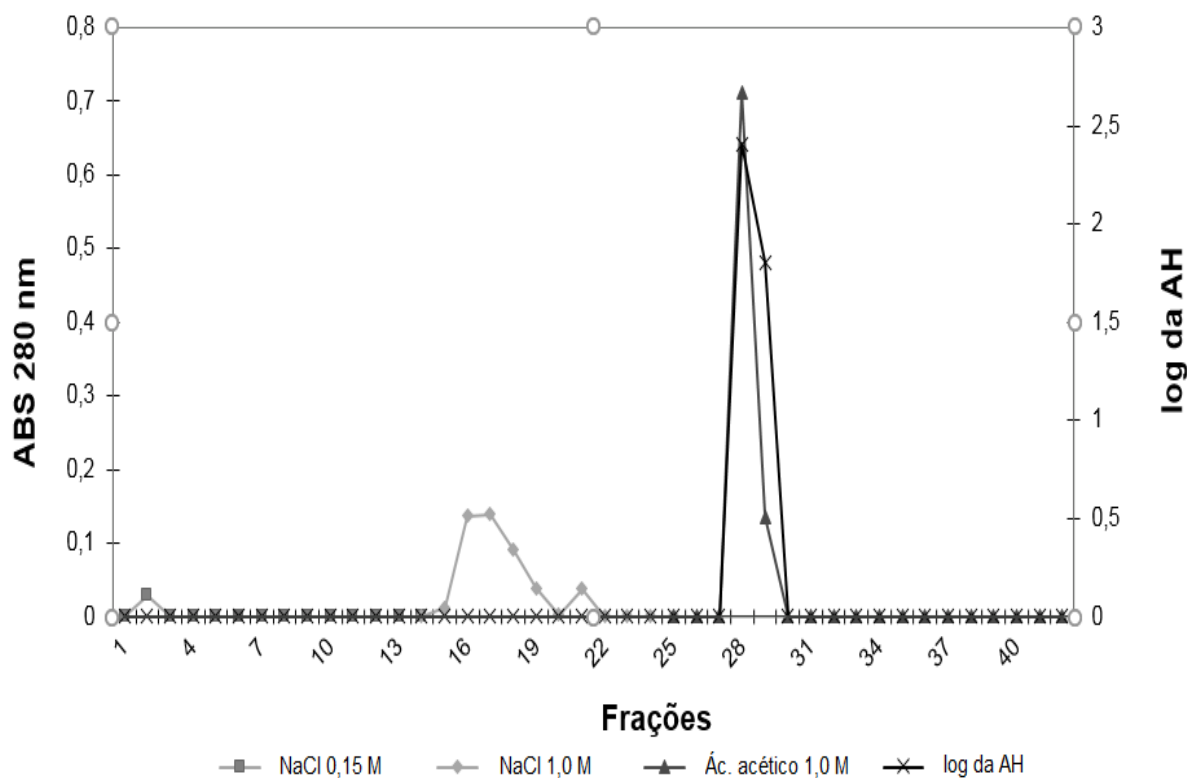
amostra, uma vez que, a transmitância é a relação entre a radiação incidente e a radiação que atravessa a amostra (Rocha et al., 2004).

6.2 – Cromatografia por afinidade em coluna de quitina

Em observação a Figura 11, a cromatografia por afinidade apresentou um ótimo perfil de eluição aparente, pois apresentou uma boa resolução, expressando picos de absorção a 280 nm em diferentes momentos e concentrando atividade AH em um pico único espalhado entre as frações 28 e 29. Quando a coluna contendo a amostra (FS 20-40%) foi tratada com solução salina de NaCl 0,15 M apresentou um pico de baixa absorbância a 280 nm na fração 02 (Figura 11), tratando-se possivelmente de contaminantes não proteicos que absorvem energia nesse comprimento de onda. Porém ao aumentar-se a força iônica da fase móvel elevando a concentração de sal de 0,15 para 1,0 M foram vistos picos de eluição adsorvidos na matriz nas frações 15, 16, 17, 18, 19, 20 e 21 como está apresentado na Figura 11. Sendo que ambos os picos eluídos com NaCl 1,0 M não apresentaram atividade hemaglutinante.

Por fim, quando a coluna foi tratada com solução de ácido acético 1,0 M apresentou picos adsorvidos na matriz nas frações 28 e 29, sendo que ambos os picos expressaram uma alta atividade hemaglutinante e que o pico adsorvido eluído na fração 28 apresentou maior atividade, expressando um log de AH igual a 0,712, seguido do pico eluído na fração 29, que apresentou um log de AH igual a 0,136 (Figura 11). A concentração da AH em um pico de eluição (frações 28 e 29 no gráfico 01), mostra a eficácia da matriz de quitina em interagir e reter seletivamente a molécula alvo, que nesse caso foi a lectina da casca de *S. terebinthifolius*, sendo que adsorção da SteBL foi possível em função da sua afinidade com a matriz de quitina, sabe-se que esse homopolissacarídeo é composto por resíduos de N-acetilglicosamina, que por sua vez foi capaz de interagir com o domínio de reconhecimento a carboidrato – DRC da SteBL provocando redução na atividade hemaglutinante da mesma (Tabela 03).

Figura 11 – Perfil cromatográfico da cromatografia por afinidade em matriz de quitina.



Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

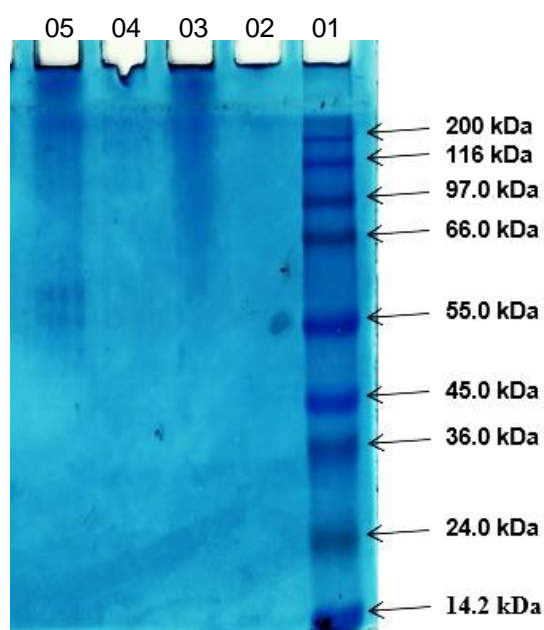
Na literatura reposta algumas lectinas de origem vegetal que foram isoladas por cromatografia de afinidade com matriz de quitina, a exemplos das lectinas: StELL (isolada de folhas de *S. terebinthifolius*), MuBL e MuHL (ambas extraídas da casca e do cerne da *Myracrodruon urundeuva* respectivamente), WSMoL (isolada de sementes de *Moringa oleífera*) (Gomes et al.,2013. Sá et al., 2009. Oliveira et al., 2017).

6.3 - Caracterização da SteBL parcialmente isolada por eletroforese SDS-PAGE

A lectina ao ser submetida a eletroforese em condições desnaturantes e redutoras (2-Mercaptoetanol), caneleta 05 (Figura 12), expressou duas bandas de pesos moleculares aproximadamente iguais. Tal resultado possivelmente indica que a amostra oriunda da cromatografia por afinidade com matriz de quitina (Item 5.2) trata-se de uma proteína dimérica, constituída por 2 subunidades mantidas por pontes dissulfetos (S-S), que ao serem tratadas com 2-Mercaptoetanol sofreram redução em seus grupamentos sulfidrilas presente nos resíduos de cisteína, de modo que, a

ligação tiólica estabelecida pelos resíduos de cisteína foi desfeita, levando a separação de suas subunidades, de peso moleculares aproximadamente iguais (55 e 58 kDa). Outras hipóteses também podem ser consideradas, como a hipótese de que as duas bandas provavelmente apontem a presença de duas isorformas de lectinas extraídas do mesmo tecido vegetal.

Figura 12 - Gel de eletroforese SDS-PAGE.



SDS-PAGE em condições desnaturantes e redutoras dos picos ativos da cromatografia em afinidade. Agente redutor: 2 – Mercaptoetanol. **Fonte:** elaborado pelo autor.

A amostra com AH foi submetida a eletroforese em condições desnaturante e não redutoras, ou seja, na ausência do agente redutor (2-Mercaptoetanol), canaleta 03, não apresentou nenhuma banda visível no gel de poliacrilamida (figura 12). Esse feito pode ser explicado pelo fato de lectinas apresentarem afinidade por regiões glicídicas de glicoproteínas, a exemplo de glicoproteínas (Procópio et al., 2017). Essa afinidade permite a interação entre lectinas que possuem uma porção glicídica em sua estrutura nativa, levando a formação de densos aglomerados de proteínas, dificultando a sua entrada no gel de eletroforese e a sua possível migração pelo gel impulsionada pelo campo elétrico. Possivelmente a região glicídica de proteínas glicosiladas influencia diretamente na migração dessas proteínas em géis de poliacrilamida.

6.4 – Teste de inibição da AH da SteBL.

Baseado nos resultados apresentados na Tabela 03, a lectina em estudo apresentou uma alta afinidade por D-lactose e uma afinidade menor por resíduos de N-acetilglicosamina, pois apresentou redução quase que total de sua atividade hemaglutinante quando tratadas previamente por solução de lactose na concentração de 0,05 M, uma redução de 99,97% de sua AH ao compararmos com o controle negativo (lectina em solução de NaCl – 0,15 M). Quando a SteBL parcialmente isolada, oriunda da cromatografia de afinidade em matriz de quitina foi tratada inicialmente com N-acetilglicosamina a redução da AH foi de 75%, mostrando que a lectina também apresenta afinidade por resíduos de N-acetilglicosamina (Tabela 03). O cálculo de percentual de inibição foi baseado na redução da AHE, que por sua vez é a razão do título de AH pela concentração de proteína.

A inibição por carboidratos ocorre em função do comprometimento do domínio de reconhecimento a carboidratos – DRC, uma vez que, os carboidratos livres em solução interagem com os sítios de ligação de lectinas impedindo parcialmente a interação da lectina com glicídios ou glicoconjugados presente na superfície de membrana plasmática dos eritrócitos, levando a uma redução significativa da atividade de lectinas.

Tabela 03 – Teste de inibição da Atividade Hemaglutinante - AH da SteBL parcialmente isolada inibida por carboidratos e glicoproteína.

Ligante	AH
Controle Negativo	16384
D-Galactose	NI
D-Glicose	NI
Maltose	NI
Fucose	NI
Ribose	NI
D-Frutose	NI
Arabinose	NI
D-Lactose	4
N-acetilglicosamina	4096
Manose	NI
Fetuína (glicoproteína)	NI

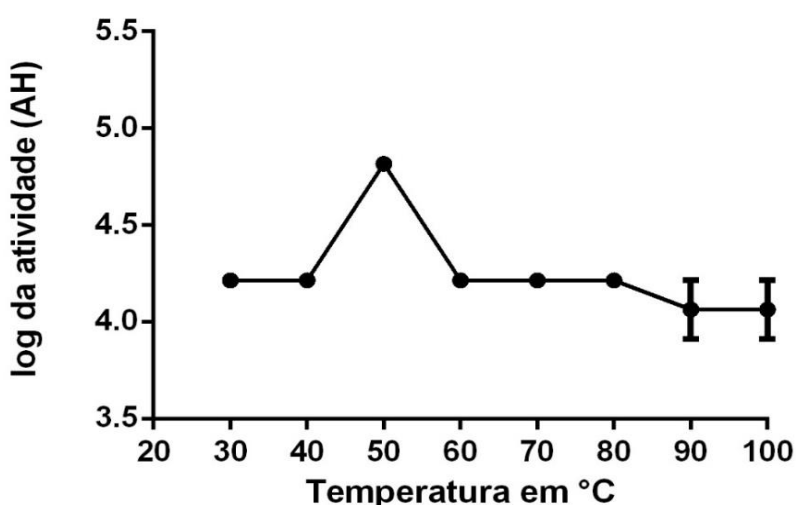
NI = Não inibiu. Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

A lectina após ser tratada com os demais carboidratos presentes na tabela 03 não apresentou redução ou inibição de sua AHE, sugerindo que as interações desses carboidratos não ocorreram no domínio de ligação a carboidratos. A SteBL parcialmente isolada apresenta-se como uma lectina de alta afinidade a lactose. Sendo que na literatura já há relatos de lectinas ligadoras de lactose, a exemplo da brosimin, extraída da planta *Brosimum gaudichaudii*, que apresentou uma forte inibição em sua atividade hemaglutinante quando tratada com baixas concentrações de lactose (Batista et al., 2017).

6.5 – Teste de termoestabilidade

A temperatura é um componente físico determinante na estrutura de nativa de proteínas. De acordo com os valores expressos na Figura 13, a SteBL apresenta-se como uma proteína termoestável pelo fato de ter mantido sua atividade numa ampla faixa de temperatura, que varia de 30 – 100°C (Figura 13). Sendo que ela apresenta uma atividade hemaglutinante máxima quando incubadas a uma temperatura de 50°C. A termoestabilidade de proteínas, bem como lectinas, pode estar relacionada com a natureza das interações que mantêm a estrutura tridimensional de proteínas e com o ambiente onde estão inseridas. Lectinas de origem vegetal na sua grande maioria apresentam maior proporção de estruturas secundárias do tipo β -folha em sua organização tridimensional, conectadas por alças, conferindo maior estabilidade frente a temperatura (Bose et al., 2016).

Figura 13 - Teste de estabilidade térmica.



A lectina foi incubada por de 30 minutos. Gráfico plotado no Graph Pad prism 06. **Fonte:** elaborado pelo autor, 2017.

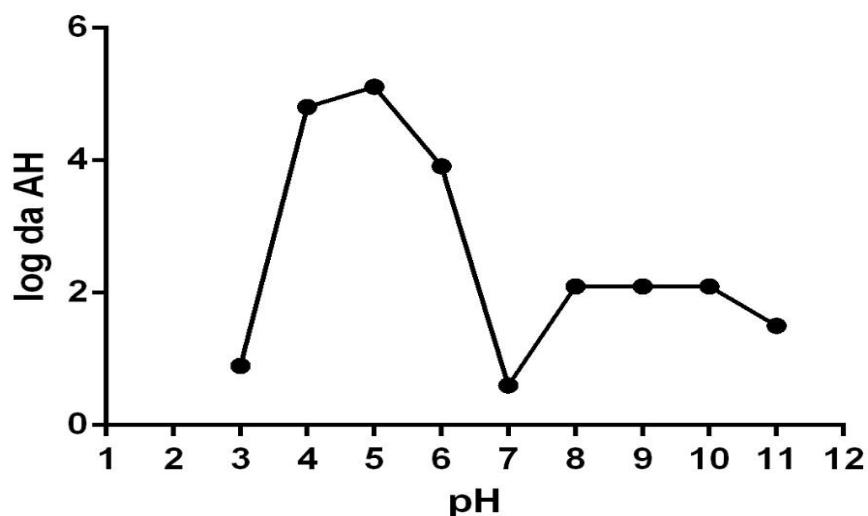
Na literatura há relatos de lectinas que mantiveram atividade hemaglutinante mesmo ao serem submetidas numa temperatura de 100°C, a exemplo da lectina CNA, isolada de sementes de *Clathrotropis nítida* (Alves et al., 2015). A SteBL apresentou maior resistência a variação de temperatura quando comparadas com lectinas reportadas de outras plantas, como por exemplo, a lectinas isolada de sementes de *Centrolobium microchaete* e a lectina purificada de sementes de *Platypodium elegans*, ambas sofreram desnaturação a 80°C (Vasconcelos et al., 2015. Araripe et al., 2017).

6.6 - Teste de estabilidade da SteBL a variação de pH

Baseado nos resultados presente na Figura 14, a lectina parcialmente isolada se apresentou estável numa ampla faixa de pH que varia de 03 a 11. O aumento da concentração de íons H⁺ no meio reacional favorece a protonação de possíveis grupos ionizáveis presente na cadeia primária (amino-terminal, carboxi-terminal e cadeias alquilas laterais) de proteínas (Lenhinger, 2015). Baseado nos resultados presente na Figura 14, a lectina parcialmente isolada se apresentou estável numa ampla faixa de pH que varia de 03 a 11 (Figura 13), resultado similar para a lectina purificada a partir das sementes de *Clathrotropis nítida* – CNA, que por sua vez apresentou estabilidade durante toda a faixa de pH (4 – 10) (Alves et al., 2015). Sendo que a região de pH que varia de 4 a 6 foi a faixa que a SteBL expressou maior atividade, resultado similar para a lectina extraída da planta *hyacinth* (jacinto indiano) que demonstrou maior estabilidade na faixa de pH variante entre 6 – 8 (Naik et al., 2017).

Conforme os resultados demonstrados na figura 14 a SteBL parcialmente isolada possui um pH ótimo igual a 5,0, pH referente a sua maior atividade, logo trata-se de uma lectina de natureza ácida. Porém a maioria das lectinas de plantas reportadas na literatura apresentam pH ótimo na região da neutralidade, apesar que há relatos de lectinas de origem vegetal que possuem o pH de máxima atividade em regiões ligeiramente básicas, a exemplo da *Morus alba Lectin* – MAL, pH ótimo entre 7 – 8,0 e a lectina isolada purificada de sementes de *Platypodium elegans* (PELa), que alcançou 100% de sua atividade em pH básico (9-10) (Khurtsidze et al., 2017. Araripe et al., 2017). A SteBL apresentou uma redução em sua AH em pH básicos, porém não perdeu totalmente a sua atividade, expressando estabilidade em pH básicos como mostra a figura 14.

Figura 14 – Teste de estabilidade a pH.



A lectina foi incubada por 15 minutos em diversos pH. Gráfico plotado no Graph Pad prism 06. **Fonte:** elaborado pelo autor, 2017.

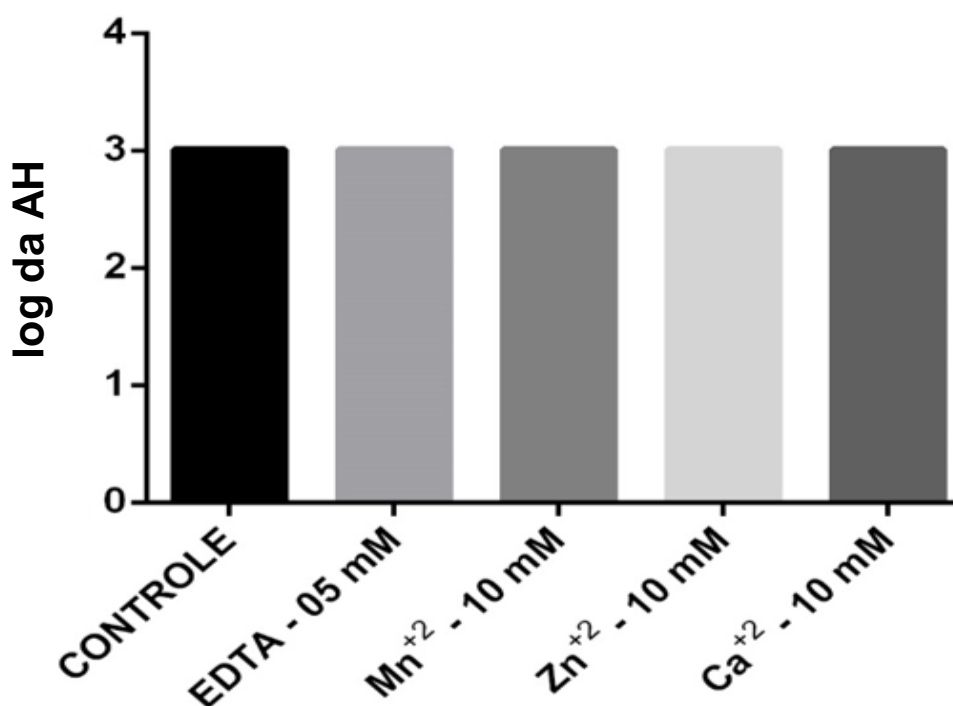
Apesar da estabilidade numa ampla faixa de pH, a preparação lectínica oriunda da cromatografia por afinidade expressou um decréscimo significativo em sua atividade hemaglutinante em pH 7,0, tal redução possivelmente está diretamente relacionado ao pH referente ao seu ponto isoelétrico – pI, uma vez que proteínas alcançam o pH alusivo ao seu pI, elas ficam com uma carga líquida igual a zero, sofrendo precipitação, apresentando praticamente perda total de AH. (Lenhinger, 2015). Porém, através de observação do perfil da curva de atividade é possível levantar a hipótese de que na amostra advinda da afinidade que foi submetida ao teste de estabilidade a pH possivelmente apresentava isoformas, uma vez que, a amostra lectínica expressa uma redução em pH igual a 7.0 (figura 14), porém quando tratadas em pH básicos apresentou um aumento significativo em sua AH, indicando a presença de uma isoforma de natureza ácida e outra de natureza básica. Paiva & Coelho, (1992), já haviam isolado duas isoformas de lectinas de sementes de *Cratylia mollis Mart.*, isoformas 1 e 2. Também vale ressaltar que lectinas estabelecem interações de natureza não covalente com seus ligantes, tais como a interação iônica, que por sua vez depende da carga dos aminoácidos que compõe o domínio de ligação a carboidratos (Silva et al., 2012). A depender do pH do meio, os resíduos de aminoácidos do sítio de ligação podem sofrer alteração de sua carga e dificultar na interação com o ligante específico.

6.7 – Efeito de íons divalentes na atividade hemaglutinante

Com base nos dados da Figura 15 é possível afirmar que a nova lectina extraída da casca de *S. terebinthifolius* trata-se de uma proteína que não necessita de íons divalentes (cátions Mn^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+}) para exercer sua atividade (Figura 15). Uma vez que diversas proteínas possuem em suas estruturas nativas íons inorgânicos em seus domínios de ligação, dentre dessas proteínas estão as lectinas do Tipo C que por sua vez são cálcio dependente (Johannes et al., 2016. VARKI et al., 2009)

De acordo com os resultados apresentados na Figura 15, a SteBL ao ser tratada por meio de diálise com uma solução de EDTA 05 mM (ácido etileno diamina tetra acético), agente quelante tetradentado capaz de formar estruturas complexas com diversos metais, não apresentou diminuição ou perda na AH, logo, sua atividade permaneceu estável mesmo depois do tratamento com EDTA.

Figura 15 - Avaliação do efeito de íons divalentes na AH.



Controle = Lectina em solução de NaCl – 0,15 M. **Fonte:** elaborado pelo autor, 2017.

A SteBL parcialmente isolada também manteve a sua atividade após o tratamento com solução aquosa de cátions divalentes como mostrado na Figura 15. Carneiro et al., (2017) também observaram um resultado similar para a lectina isolada da *Aplysina lactuca* (esponja marinha), que apresentou atividade estável mesmo após

o tratamento com EDTA e cátions divalentes. Em contraponto, há relatos na literatura de lectinas que dependem de cátions divalentes para exercer suas funções biológicas, a exemplo da lectina isolada da peçonha da cobra *Bothrops leucurus* – BIL, que se apresenta como uma lectina Ca^{2+} - dependente, ou seja, necessita de íons de cálcio (II) para interagir com o ligante e manter sua função biológica (Nunes et al., 2011).

Em análise dos resultados apresentados no gel de eletroforese SDS-PAGE (Figura 12), o procedimento de isolamento da lectina da casca da aroeira-da-praia não se mostrou eficaz, uma vez que, o gel não apresentou uma banda isolada quando tratada em condições não redutoras. Em função disso, foi necessário a busca por um meio alternativo para o isolamento da SteBL. Os dados apresentados nos itens 6.8 e 6.9 referem-se aos resultados dos novos passos abordados para o isolamento total da SteBL.

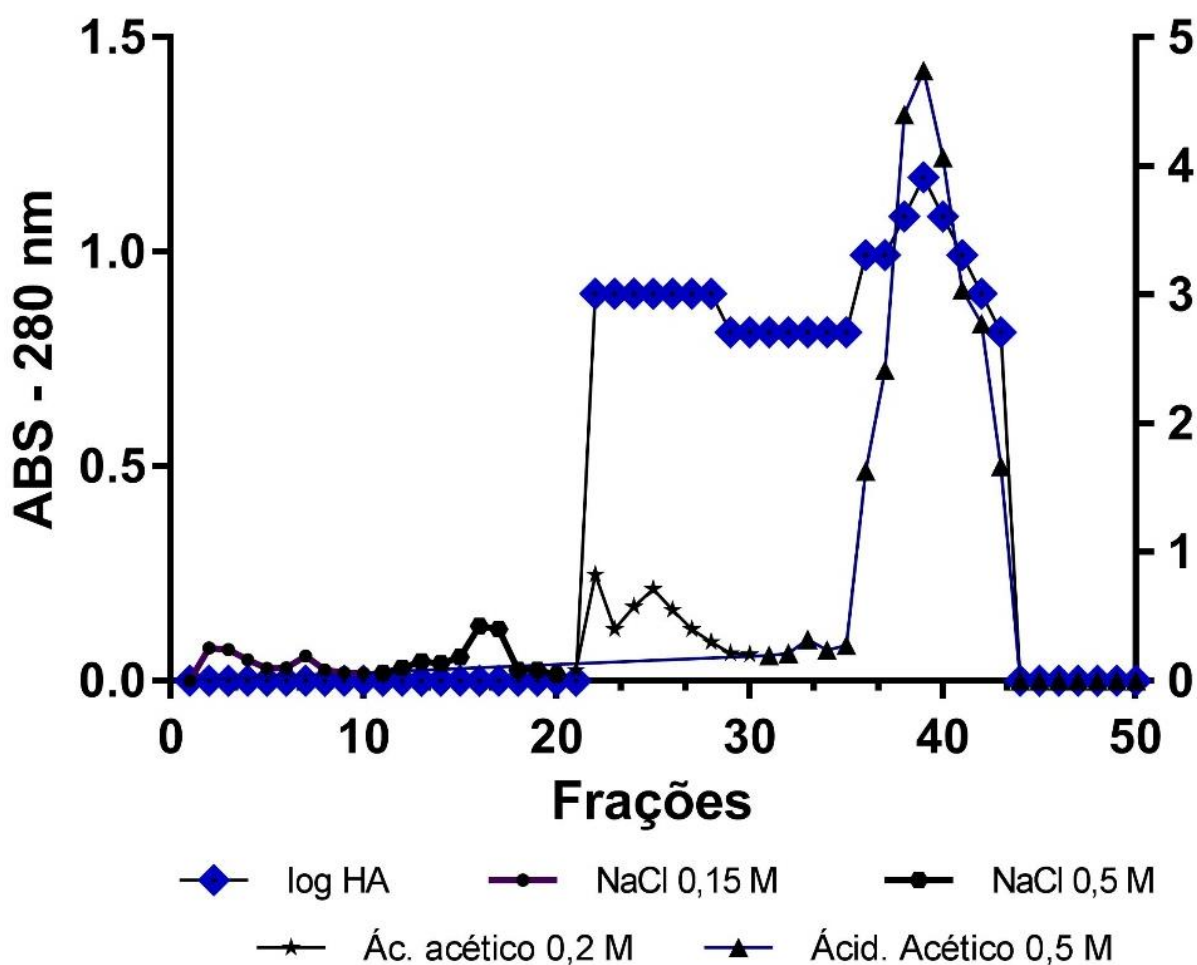
6.8 - Isolamento e caracterização da SteBL em SDS-PAGE

De acordo com os dados da Figura 16, é possível inferir que a cromatografia apresentou uma boa resolução, expressando um pico proteico em destaque quando conferido em um comprimento de onda de 280 nm. Ainda na Figura 16, observa-se apenas um pico ativo, onde foi concentrada toda atividade hemaglutinante, mostrando-se assim, que a cromatografia foi eficaz na eliminação de diversos contaminantes presentes na amostra. A Figura 16 apresenta diversos picos de absorção na região de 280 nm, quando a coluna foi tratada com solução de NaCl 0,15 M, porém quando foi trocado a fase móvel da corrida cromatográfica para solução de ácido acético 0,2 M, o cromatógrafo registra picos de absorção que estavam adsorvidos na matriz, sendo que os mesmos não expressaram AH (Figura 16).

Por fim, ao aumentar-se a acidez do meio, com a adição de ácido acético na concentração de 0,5 M, foi visto um alto pico de absorção entre os tubos 38, 39 e 40 (Figura 16), onde nesse pico ficou concentrado toda a AH eluída no processo de separação, comprovando que a corrida cromatográfica apresentou uma boa resolução ao concentrar toda atividade em um pico único de absorção aa 280 nm, como mostra a Figura 16.

Sendo que, não foi possível inferir que a cromatografia por afinidade foi capaz de isolar a lectina, uma vez que, feita a caracterização do pico ativo por meio de eletrofose SDS-PAGE em condições desnaturantes sem a presença do agente redutor não ficou perceptível a presença de uma banda isolada visível no gel de poliacrilamida, mostrado na Figura 18.

Figura 16 – Cromatograma da afinidade em matriz de quitina do extrato bruto dialisado em NaCl 0,15 M e filtrado em carvão ativado.



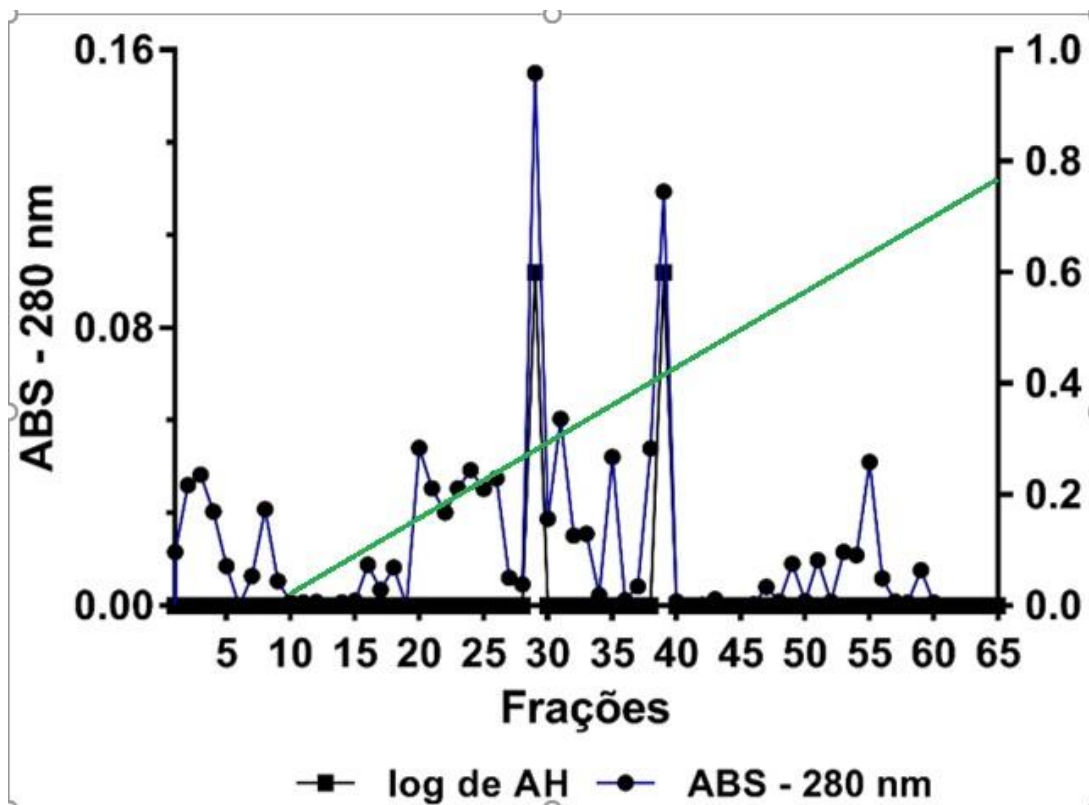
Fonte: Elaborado pelo autor, 2017

As amostras com atividade hemaglutinante oriundas da cromatografia por afinidade em matriz de quitina foram reunidas numa membrana semi-permeável e dialisadas contra a solução tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0 e aplicada numa cromatografia de troca aniônica – DEAE. Os dados obtidos e expressos na Figura 17, revela que a lectina foi isolada em dois momentos, pois a cromatografia apresentou em tempos diferentes de eluição a presença de dois picos ativos, onde foi concentrada

toda a AH (Figura 17). Todo o processo foi repetido por pelo menos 5 vezes para confirmar o método escolhido.

As amostras que expressaram atividade referente a lectina foram eluídas nas frações 30 e 40 da corrida cromatográfica (Figura 17). Tal perfil, possivelmente aponta para a presença de isoformas presente na mesma preparação lectínica, uma vez que, elas foram eluídas em dois momentos distintos, indicando que as proteínas interagem com a matriz através de diferentes mecanismos e intensidade de interação, sabe-se também que, com o aumento da força iônica do meio através da adição de 0,5 M de NaCl na fase móvel da cromatografia, as moléculas que apresentam menores forças de ligação com a matriz são eluídas mais rapidamente, logo é possível inferir que a isoforma que foi eluída primeiro na cromatografia DEAE-sepharose possui um somatório de forças de interação menor que as forças de interação da isoforma que foi eluída na fração 40 (Figura 17), também não se descarta uma possível interação alternativa da lectina com a matriz através de outros domínios de ligação.

Figura 17 – Perfil cromatográfico das amostras com AH eluídas em coluna de afinidade aplicadas na DEAE-Sepharose.

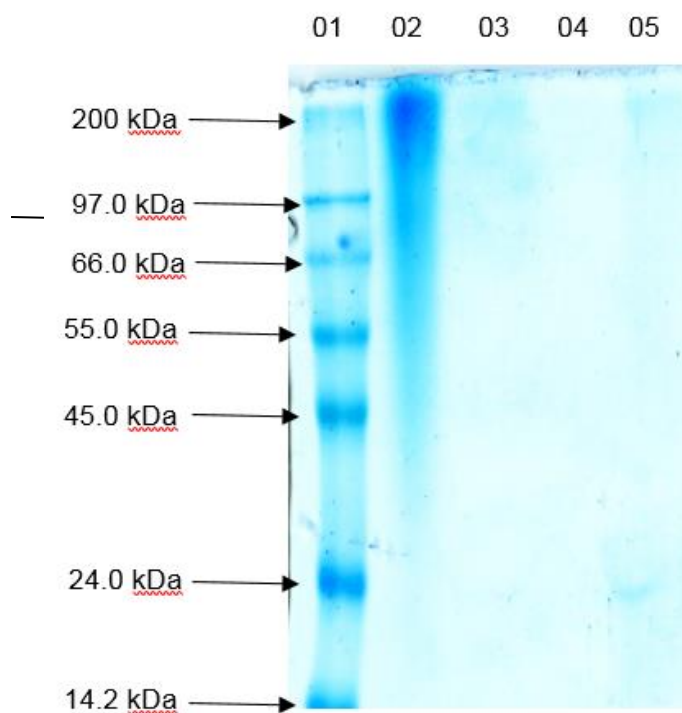


Fonte: elaborado pelo autor, 2017

Baseado apenas nos resultados exibido no cromatograma da Figura 17 não é possível confirmar a hipótese de a amostra apresentar isoformas, pois não foi possível revelar ambos os picos ativos da DEAE em eletroforese, pois como mostra a Figura 19, o gel de poliacrilamida revelou uma banda única na região de 24 kDa, confirmando que a lectina foi isolada (Figura 18).

Quando aplicamos os picos ativos oriundos da afinidade em coluna de troca aniônica – DEAE, a mesma apresentou dois picos ativos, onde os mesmos foram caracterizados por SDS-PAGE em condições redutoras (Figura 18), canaleta 05, ficou evidente que a lectina foi isolada, apresentando uma banda única de aproximadamente 24 kDa, sendo assim, a SteBL trata-se de um peptídeo de 24 kDa, como mostra a Figura 18.

Figura 18 - Eletroforese SDS-PAGE em condições desnaturantes e redutoras dos picos ativos da DEAE (05 e 03) e não redutoras do pico ativo oriundos da afinidade (02).



Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

Outros estudos fazem-se necessário para confirmar a hipótese, a exemplo da caracterização das isoformas isoladamente. Diversos fatores podem ter contribuído para não aparição da outra banda visível no gel referente ao outro pico ativo aplicado na canaleta 03 da Figura 18, como por exemplo a baixa concentração de proteína na

amostra após a eluição. Gomes et al., (2013) isolaram e caracterizaram por técnica eletroforética uma lectina da folha de *S. terebinthifolius* como um polipetídeo glicosilado monomérico. Sá et al., (2009) purificaram e caracterizaram uma lectina monomérica de 14 kDa da casca da *Myracrodruon urundeuva* com potencial larvicida.

7.0 – CONCLUSÃO

- ✓ SteBL é uma lectina termoestável e com alta atividade em condições ácidas;
- ✓ A nova lectina apresenta estabilidade diante da variação de pH;
- ✓ Trata-se de uma lectina íon-independente, ou seja, não depende de íons para apresentar atividade hemaglutinante;
- ✓ A SteBL é um peptídeo de massa de aproximadamente 24,0 kDa,
- ✓ A SteBL é uma lectina ligadora de lactose.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBORÉS, Silvana et al. Purification and applications of a lectin from the mushroom *Gymnopilus spectabilis*. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 172, n. 4, p. 2081-2090, 2014.

Albuquerque, L. P.; Santana, G. M. S.; Napoleão, T. H.; Coelho, L. C. B. B.; Silva, M. V.; Paiva, P. M. G. (2014) Antifungal activity of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin on genetically distinct *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* races. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172, 1098–1105.

ALVES, Ana Cecilia et al. A novel vasorelaxant lectin purified from seeds of *Clathrotropis nitida*: partial characterization and immobilization in chitosan beads. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 588, p. 33-40, 2015.

ARARIPE, David Alencar et al. Partial characterization and immobilization in CNBr-activated Sepharose of a native lectin from *Platypodium elegans* seeds (PELa) and comparative study of edematogenic effect with the recombinant form. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, p. 323-330, 2017.

BATISTA, K. A. et al. Development of a new bioaffinity stationary phase for lactose removal using a lactose-binding lectin immobilized onto polyaniline. **Separation and Purification Technology**, v. 185, p. 54-60, 2017.

BATTISON, Andrea L.; SUMMERFIELD, Rachael L. Isolation and partial characterisation of four novel plasma lectins from the American lobster *Homarus americanus*. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 33, n. 2, p. 198-204, 2009.

BAUDDH, Kuldeep; SINGH, Kripal; SINGH, Rana P. *Ricinus communis* L. a value added crop for remediation of cadmium contaminated soil. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 96, n. 2, p. 265-269, 2016.

BHOWAL, J.; GUHA, A. K.; CHATTERJEE, B. P. Purification and molecular characterization of a sialic acid specific lectin from the phytopathogenic fungus *Macrophomina phaseolina*. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 1973-1982, 2005.

Bird-Lieberman, E.L.; Neves, A.A.; Lao-Sirieix, P.; O'Donovan, M.; Novelli, M.; Lovat, L.B.; Eng, W.S.; Mahal, L.K.; Brindle, K.M.; Fitzgerald, R.C.

Molecular imaging using fluorescent lectins permits rapid endoscopic identification of dysplasia in Barrett's esophagus. *Nat. Med.* 2012, 18, 315–321.

BOSE, Partha Pratim et al. A glucose/mannose binding lectin from litchi (*Litchi chinensis*) seeds: Biochemical and biophysical characterizations. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 6, p. 242-252, 2016.

BOULOGNE, I.; PETIT, P.; OZIER_LAFONTAINE, H.; DESFONTAINES, L.; LORANGER-MERCIRIS, G. Insecticidas and antifungal chemicals produced by plants: a review. *Environ Chem Lett.* 10: 325-347, 2012.

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*, 72 (1): 248-254. 1976.

BRUSTEIN, V. P. et al. A novel antimicrobial lectin from *Eugenia malaccensis* that stimulates cutaneous healing in mice model. **Inflammopharmacology**, v. 20, n. 6, p. 315-322, 2012.

CABALLERO-GALLARDO, K.; OLIVERO-VERBEL, J.; STASHENKO, E. Repellent Activity of Essential Oils and Some of Their Individual Constituents against *Tribolium castaneum* Herbst. *J. Agric. Food Chem.* 59: 1690-1696. 2011.

CAMBI, Alessandra; KOOPMAN, Marjolein; FIGDOR, Carl G. How C-type lectins detect pathogens. **Cellular microbiology**, v. 7, n. 4, p. 481-488, 2005.

CAMPBELL, Christopher T.; SAMPATHKUM Prasanna AR, Srinivasa-Gopalan,

CARNEIRO, Arlys Gerônimo de Oliveira Lima Lino et al. LECTINAS: Onde se Obter, O Que São e Para Que Servem. **Pós em revista**, n. 3, 2011.

CARNEIRO, Rômulo Farias et al. Isolation, biochemical characterization and antibiofilm effect of a lectin from the marine sponge *Aplysina lactuca*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 99, p. 213-222, 2017.

CARRILLO, Celia et al. Effects of temperature, pH and sugar binding on the structures of lectins ebulin f and SELfd. **Food chemistry**, v. 220, p. 324-330, 2017.

CARVALHO, Elba Verônica Matoso Maciel et al. Detection of the first lectin with antimicrobial activity present in serum of the Amazonian fish tambaqui

Colossoma macropomum. **Fisheries science**, v. 78, n. 4, p. 879-887, 2012.

CARVALHO, M. G. et al. Schinus terebinthifolius Raddi: chemical composition, biological properties and toxicity. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 1, p. 158-169, 2013.

CHATTERJEE, Biji et al. A novel L-fucose-binding lectin from Fenneropenaeus indicus induced cytotoxicity in breast cancer cells. **The Journal of Biochemistry**, v. 161, n. 1, p. 87-97, 2017.

CHEN, Junmei et al. Increasing the thermostability of staphylococcal nuclease: implications for the origin of protein thermostability. **Journal of molecular biology**, v. 303, n. 2, p. 125-130, 2000.

CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G. Lectins, carbohydrate recognition molecules: are they toxic?. In: Yasir Hasan Siddique. (Org.). **Recent Trends in Toxicology**. Kerala, India: Transworld Research Network, v. 37, p. 47-59. 2008.

CRUZ, D. R. Isolamento, purificação e caracterização parcial da lectina de folhas de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel, nativa do bioma caatinga. Dissertação de mestrado, Petrolina – PE 2015.

CUMMINGS, Richard D.; MCEVER, Rodger P. C-type lectins. 2009.

DA SILVA, Samuel Benigno et al. PRESENÇA DE LECTINA EM PLANTAS E SUAS FUNÇÕES BIOLÓGICAS. **SIMPAC**, v. 5, n. 1, 2015.

DE MELO, Cristiane Moutinho Lagos et al. Healing activity induced by Cramoll 1, 4 lectin in healthy and immunocompromised mice. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 408, n. 1, p. 113-119, 2011.

DE OLIVEIRA, Ana Patrícia Silva et al. Biotechnological value of Moringa oleifera seed cake as source of insecticidal lectin against Aedes aegypti. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 10, p. 1683-1690, 2016.

DE OLIVEIRA, Caio Fernando Ramalho et al. A chitin-binding lectin from Moringa oleifera seeds (WSMoL) impairs the digestive physiology of the Mediterranean flour larvae, Anagasta kuehniella. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 2017.

DE OLIVEIRA, Caio Fernando Ramalho et al. Evaluation of seed coagulant Moringa oleifera lectin (cMoL) as a bioinsecticidal tool with potential for the control of insects. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 2, p. 498-504, 2011.

DE OLIVEIRA, Luciana Santos et al. Plantas medicinais como recurso terapêutico em comunidade do entorno da reserva biológica do tinguá, RJ, Brasil—metabólitos secundários e aspectos farmacológicos. **InterSciencePlace**, v. 1, n. 17, 2015.

DE SOUZA CARVALHO, Aline et al. Purification, characterization and antibacterial potential of a lectin isolated from *Apuleia leiocarpa* seeds. **International journal of biological macromolecules**, v. 75, p. 402-408, 2015.

DE VASCONCELOS, Mayron Alves et al. Purification and primary structure of a novel mannose-specific lectin from *Centrolobium microchaete* Mart seeds. **International journal of biological macromolecules**, v. 81, p. 600-607, 2015.

DOS SANTOS NUNES, Erika et al. Purification of a lectin with antibacterial activity from *Bothrops leucurus* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 159, n. 1, p. 57-63, 2011.

ĐUKIĆ, Nikola et al. The effects of population densities and diet on *Tribolium castaneum* (Herbst) life parameters. *Journal of Stored Products Research*, v. 69, p. 7-13, 2016.

EBADOLLAHI, A.; KROSRAVI, R.; SENDI, J.J.; HONARMAND, P.; AMINI, R. M. Toxicity and Physiological Effects of Essential Oil from *Agastache foeniculum* (Pursh) Kuntze Against *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae) Larvae. *Annual Review & Research I Biology*. 3(4): 649-658, 2013.

ESTRADA-MARTÍNEZ, Laura Elena et al. Plant Lectins as Medical Tools against Digestive System Cancers. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 7, p. 1403, 2017.

EVANGELISTA, K.S., ANDRICH, F., CORDEIRO, M.N., RICHARDSON, M., FIGUEIREDO, S.G., EBLE, J.A., Plumieribetin, a fish lectin, homologous to 107 mannose-binding B-type lectins inhibits the collagen-binding $\alpha 1\beta 1$ integrin. *The Journal of Biological Chemistry*, 284:34747-34759. 2009

FANG, Zi-Yan et al. A single CRD C-type lectin from *Eriocheir sinensis* (EsLecB) with microbial-binding, antibacterial prophenoloxidase activation and hem-encapsulation activities. **Fish & shellfish immunology**, v. 50, p. 175-190, 2016.

FANG, Zi-Yan et al. A single CRD C-type lectin from *Eriochloa sinensis* (EsLecB) with microbial-binding, antibacterial prophenoloxidase activation and hem-encapsulation activities. **Fish & shellfish immunology**, v. 50, p. 175-190, 2016.

FERREIRA, E. A. M. et al. Estudo da especificidade a açúcares e avaliação das atividades anti-inflamatórias e antinoceptivas da lectina de sementes de *Chenopodium quinoa*. **Blucher Biochemistry Proceedings**, v. 1, n. 1, p. 15-16, 2015.

FEUERREISEN, Michelle M. et al. Characterization of phenolic compounds in Brazilian pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) Exocarp. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 62, n. 26, p. 6219-6226, 2014.

FOKUNANG, C. N.; RASTALL, R. A. Phytohaemagglutinins in membrane signalling, biomedical and genetic engineering research. **Biotechnology**, v. 2, n. 2, p. 162-77, 2003.

FREIRE, M. G. M. *et al.* Isolation and partial characterization of a novel lectin from *Talisia esculenta* seeds that interferes with fungal growth. **Plant Physiology and Biochemistry** v.40, p. 61-68, 2002.

GARCIA, Juliana et al. *Amanita phalloides* poisoning: Mechanisms of toxicity and treatment. *Food and chemical toxicology*, v. 86, p. 41-55, 2015.

Gomes, F. S.; Procópio, T. F.; Napoleão, T. H.; Coelho, L. C. B. B.; Paiva, P. M. G. (2013) Antimicrobial lectin from *Schinus terebinthifolius* leaf. *Journal of Applied Microbiology*, 114, 672–679.

GILBERT, Benjamin et al. *Schinus terebinthifolius* Raddi. 2011.

HAMID, Rabia et al. Lectins: proteins with diverse applications. 2013.

IODACHE, Florin et al. Antimicrobial and antiparasitic activity of lectins. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 152-161, 2015.

HSU, Daniel K.; CHEN, Huan-Yuan; LIU, Fu-Tong. Galectin-3 regulates T-cell functions. **Immunological reviews**, v. 230, n. 1, p. 114-127, 2009.

ISMAN, M. Botanical insecticides, deterrents, and Repellents in modern agriculture and An increasingly regulated world. *Annu. Rev. Entomol.* 51: 45–66, 2006.

ITO, José Amando. Técnicas espectroscópicas em biofísica. **Caderno de Física da UEMS**, v. 3, n. 01, p. 21-29, 2004.

JIMÉNEZ-CASTELLS, Carmen et al. Neo-glycopeptides: the importance of sugar core conformation in oxime-linked glycoprobes for interaction studies. **Glycoconjugate journal**, v. 25, n. 9, p. 879-887, 2008

JOHANNES, Ludger; WUNDER, Christian; SHAFaq-ZADAH, Massiullah. Glycolipids and Lectins in Endocytic Uptake Processes. **Journal of molecular biology**, v. 428, n. 24, p. 4792-4818, 2016.

JONES, Carolyn JP et al. The binucleate cell of Okapi and Giraffe placenta shows distinctive glycosylation compared with other ruminants: A lectin histochemical study. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 83, p. 184-190, 2015.

KHAN, F; AHMAD, A.; KHAN, M. I. Purification and characterization of a lectin from endophytic fungus *Fusarium solani* having complex sugar specificity. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 457, p. 243–251, 2007

KHURTSIDZE, E. et al. Galactose-binding lectin from mulberry (*Morus alba* L.) seeds with growth hormone-like activity. **Annals of Agrarian Science**, v. 15, n. 1, p. 26-30, 2017.

LAEMMLI, Ulrich K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LANNOO, Nausicaä; VAN DAMME, Els JM. Nucleocytoplasmic plant lectins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, v. 1800, n. 2, p. 190-201, 2010

LIU, Xiaoyi et al. Comprehensive spectroscopic probing the interaction and conformation impairment of bovine serum albumin (BSA) by herbicide butachlor. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 162, p. 332-339, 2016.

LOPES-FERREIRA, M. *et al.* Structural and biological characterization of Nattectin, a new C-type lectin from the venomous fish *Thalassophryne nattereri*. **Biochimie**, v. 93, p. 971–980, 2011.

LOU, Jizhong; ZHU, Cheng. A structure-based sliding-rebinding mechanism for catch bonds. *Biophysical journal*, v. 92, n. 5, p. 1471-1485, 2007.

Mahroof, M., Hagstrum, D.W., 2012. Biology, behavior, and ecology of insects in processed commodities. In: Hagstrum, D.W., Philips, T.W.,

Cuperus, G. (Eds.), *Stored Product Protection*. Kansas State University, pp. 33 e 45.

MARSHALL, BARRY J. III. Virulence and pathogenicity of *Helicobacter pylori*. **Journal of gastroenterology and hepatology**, v. 6, n. 2, p. 121-124, 1991.

MATSUMOTO, Isao et al. Arthritis provoked by linked T and B cell recognition of a glycolytic enzyme. **Science**, v. 286, n. 5445, p. 1732-1735, 1999.

McEver, R.P. & Zhu, C. (2010) Rolling cell adhesion. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 26, 363–396.

NAIK, Sanjay et al. BIOCHEMICAL CHARACTERISATION OF LECTIN FROM INDIAN HYACINTH PLANT BULBS WITH POTENTIAL INHIBITORY ACTION AGAINST HUMAN CANCER CELLS. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2017.

NAPOLEÃO, T. H.; BELMONTE, B. R.; PONTUAL, E. V.; ALBUQUERQUE, L. P.; SÁ, R.A.; PAIVA, L. M.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G. Deleterious effects of *Myracrodruon urundeuva* leaf extract and lectin on the maize weevil, *Sitophilus zeamais* (Coleoptera, Curculionidae). *Journal of Stored Products Research*. 54: 26-33. 2013.

NAPOLEÃO, Thiago Henrique et al. Effect of *Myracrodruon urundeuva* leaf lectin on survival and digestive enzymes of *Aedes aegypti* larvae. *Parasitology research*, v. 110, n. 2, p. 609-616, 2012.

NELSON, David L.; COX, Michel M. Princípios de bioquímica de Lehninger. In: **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. Artmed, 2015.

Nicholls, J.M., Chan, R.W.Y., Russell, R.J., Air, G.M., Peiris, J.S.M., 2008. Evolving complexities of influenza virus and its receptors. *Trends Microbiol.* 16, 149–157.

PAIVA, Patricia MG; COELHO, Luana CBB. Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* Mart.(camaratu bean). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 113-118, 1992.

PANECA, Gregory Ramón Valdés; MARTÍN, Luis Orlando Maroto; BELTRÁN, Yaima Hernández. Glicosilación intestinal y su relación con la interacción hospedero-patógeno. **InfoCiencia**, v. 19, n. 1, p. 1-09, 2015.

PEREIRA, Samira Fabre et al. Caracterização dos efeitos biológicos das lectinas de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) e de *Canavalia ensiformes* (ConA) em preparações do sistema nervoso central e em células tumorais. 2005.

PILLAI, Shiv; ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew HH. **Imunologia celular e molecular**. Elsevier Brasil, 2015.

PINTO-JUNIOR, Vanir Reis et al. Crystal structure of Pisum arvense seed lectin (PAL) and characterization of its interaction with carbohydrates by molecular docking and dynamics. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 630, p. 27-37, 2017.

PRASANNA, Vaddi K.; VENKATESH, Yeldur P. Characterization of onion lectin (*Allium cepa* agglutinin) as an immunomodulatory protein inducing Th1-type immune response in vitro. **International immunopharmacology**, v. 26, n. 2, p. 304-313, 2015.

PROCÓPIO, Tamara F. et al. Antibacterial lectins: action mechanisms, defensive roles and biotechnological potential. **Antibacterials: Synthesis, Properties and Biological Activities**, Nova Science Publishers Inc., New York, p. 69-89, 2017.

QU, Min et al. Purification of a secreted lectin from *Andrias davidianus* skin and its antibacterial activity. **Comparative biochemistry and physiology part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 167, p. 140-146, 2015.

RAFIQ, Shaista et al. Isolation and antiproliferative activity of *Lotus corniculatus* lectin towards human tumour cell lines. **Phytomedicine**, v. 21, n. 1, p. 30-38, 2013.

RAO, Anjana; FAAS, Susan J.; CANTOR, Harvey. Analogs that compete for antigen binding to an arsonate-reactive T-cell clone inhibit the functional response to arsonate. *Cell*, v. 36, n. 4, p. 889-895, 1984.

RÊGO, Moacyr Jesus Barreto de Melo et al. Evaluation of WGA and Concanavalin A (Con A) lectin as biomarkers of hepatosplenic schistosomiasis in human biopsies with no evidence of egg-granuloma system. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 55, n. 3, p. 213-215, 2013.

ROCHA, Fábio RP; TEIXEIRA, Leonardo SG. Strategies to increase sensitivity in UV-VIS spectrophotometry. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 807-812, 2004.

SÁ, Roberto A. et al. Antibacterial and antifungal activities of *Myracrodruon urundeuva* heartwood. **Wood Science and Technology**, v. 43, n. 1-2, p. 85-95, 2009.

SÁ, Roberto Araújo et al. Larvicidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* on *Aedes aegypti*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 149, n. 3, p. 300-306, 2009.

SANTANA, G. M. S. et al. Electrochemical potential of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin **Bioelectrochemistry**, v. 85, p. 56-60, 2012.

SANTI-GADELHA, T. et al. Purification and biological effects of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) seed lectin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 350, n. 4, p.1050-1055, 2006.

SANTOS, A. F. S. et al. Isolation of a seed coagulant *Moringa oleifera* lectin. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 504-508, 2009.

SCANDURRA, Roberto et al. Protein thermostability in extremophiles. **Biochimie**, v. 80, n. 11, p. 933-941, 1998.

SHANMUGAVEL, Sakthivelkumar et al. Isolation and analysis of mannose/trehalose/maltose specific lectin from jack bean with antibruchid activity. **International journal of biological macromolecules**, v. 91, p. 1-14, 2016.

SHARON, Jacqueline. **Imunologia básica**. Guanabara-Koogan, 2000.

SILVA, Cynarha Dasy Cardoso. Purificação e caracterização parcial de uma lectina presente no soro do peixe tilápia (*Oreochromis niloticus*): atividade imunomodulatória em esplenócitos de camundongos. 2012.

SILVA, Lívia Rosiane; OLIVEIRA, Alice Andrade; LIMA, Renato Abreu. IDENTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE *Schinus terebinthifolius* RADDI. **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**, v. 2, n. 2, 2015.

SINGH, Ram Sarup; KAUR, Hemant Preet; KENNEDY, John F. Modulation of immunocyte functions by a mucin-specific lectin from *Aspergillus gorakhpurensis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 101, p. 172-178, 2017.

Sousa, B. L.; Silva-Filho, J. C.; Kumar, P.; Graewert, M. A.; Pereira, R. I.; Cunha, R. M. S.; Nascimento, K. S.; Bezerra, G. A.; Delatorre, P.; Djinovic-Carugo, K.; Nagano, C. S.; Gruber, K.; Cavada, B. S. (2016) Structural characterization of a *Vatairea macrocarpa* lectin in complex with a tumor-associated antigen: a new tool for cancer research. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 72, 27–39.

ŠULÁK, Ondřej et al. *Burkholderia cenocepacia* BC2L-C is a super lectin with dual specificity and proinflammatory activity. **PLoS pathogens**, v. 7, n. 9, p. e1002238, 2011.

Sun, Y.-Y.; Liu, L.; Li, J.; Sun, L. (2016) Three novel B-type mannose-specific lectins of *Cynoglossus semilaevis* possess varied antibacterial activities against Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Developmental and Comparative Immunology*, 55, 194-202.

STRYER, L. et al. *Bioquímica*. Rio de Janeiro: Ed. 2008.

TAKADA, Ayato et al. Human macrophage C-type lectin specific for galactose and N-acetylgalactosamine promotes filovirus entry. **Journal of virology**, v. 78, n. 6, p. 2943-2947, 2004.

TSUTSUI, Shigeyuki et al. Novel mannose-specific lectins found in torafugu, *Takifugu rubripes*: a review. **Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics**, v. 1, n. 1, p. 122-127, 2006.

VAJRAVIJAYAN, S. et al. Structural analysis of β -prism lectin from *Colocasia esculenta* (L.) S chott. **International journal of biological macromolecules**, v. 91, p. 518-523, 2016. Jones

Van Damme, E.J.M., Peumans, W.J., Barre, A., Rougé, P., 1998a. Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. *Crit. Rev. Plant Sci.* 17, 575–692.

VARKI, Ajit; LOWE, John B. Biological roles of glycans. 2009.

VAZ, Antônio FM et al. Biocontrol of *Fusarium* species by a novel lectin with low ecotoxicity isolated from *Sebastiania jacobinensis*. **Food Chemistry**, v. 119, n. 4, p. 1507-1513, 2010.

VELAYUTHAM, Veeramani et al. Purification, characterization, and analysis of antibacterial activity of a serum lectin from the grub of rhinoceros beetle, *Oryctes rhinoceros*. **Process Biochemistry**, v. 53, p. 232-244, 2017.

XIE, Y.S.; BODNARYK, R.P.; FIELDS, P.G. Rapid and simple flour-disk bioassay for testing substances active against stored-product insects. *Can. Entomol.* 128: 865–875. 1996.

YANG, Y. *et al.* Characterization, molecular cloning, and *in silico* analysis of a novel mannose-binding lectin from *Polygonatum odoratum* (Mill.) with anti-HSV-II and apoptosis-inducing activities. **Phytomedicine**, v. 18, p. 748–755, 2011.

YOSHIDA, Hiromi et al. X-ray structure of a protease-resistant mutant form of human galectin-9 having two carbohydrate recognition domains with a metal-binding site. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 490, n. 4, p. 1287-1293, 2017.

ZELENSKY, Alex N.; GREASY, Jill E. The C-type lectin-like domain superfamily. **The FEBS journal**, v. 272, n. 24, p. 6179-6217, 2005.