



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
ESCOLA DE ENFERMAGEM E FÁRMACIA - ENSERFAR
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR

RICARDO BEZERRA COSTA

**PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES
ANTITUMORAL, ANTIMICROBIANA E SOBRE PARÂMETROS
HEMOSTÁTICOS DAS LECTINAS DE *Genipa americana* L.
(JENIPAPO), *Rhizophora mangle* L. (MANGUE VERMELHO) E DA
PRÓPOLIS VERMELHA DE ALAGOAS**

MACEIÓ
2022

RICARDO BEZERRA COSTA

**PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES
ANTITUMORAL, ANTIMICROBIANA E SOBRE PARÂMETROS
HEMOSTÁTICOS DAS LECTINAS DE *Genipa americana* L.
(JENIPAPO), *Rhizophora mangle* L. (MANGUE VERMELHO) E DA
PRÓPOLIS VERMELHA DE ALAGOAS**

Defesa de doutorado apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Bioquímica e Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Francis Soares Gomes (UFAL)

Coorientadora: Maria Luiza Vilela Oliva (UNIFESP)

MACEIÓ

2022

Catálogo na Fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

- C837p Costa, Ricardo Bezerra.
Purificação, caracterização e avaliação de atividades antitumoral, antimicrobiana e sobre parâmetros hemostáticos das lectinas de *Genipa americana* L. (jenipapo), *Rhizophora mangle* L. (mangue vermelho) e da própolis vermelha de Alagoas / Ricardo Bezerra Costa. – 2022.
219 f. : il. color., grafs., tabs.
- Orientador: Francis Soares Gomes.
Co-orientadora: Maria Luiza Vilela Oliva.
Tese (doutorado em Bioquímica e Biologia Molecular) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Farmacêuticas. Maceió, 2022.
- Bibliografia: f. 182-215.
Anexos: f. 217-219.
1. Neoplasias. 2. Anticogulantes. 3. Antifúngicos. 4. Proteínas. 5. Cromatografia. I. Título.

CDU: 577.21:582.972:638.135

Dedico essa TESE a todas as pessoas que assim como eu sonham com dias melhores, todos aqueles que almejam e buscam uma educação de equidade e qualidade, aos que almejam um futuro mais justo para si e para o próximo. Aos que por esforço e dedicação transformaram dificuldade e obstáculos em dias de glória e renovação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as suas bênçãos, promessas, cuidado e acima de tudo sua proteção. Por ter me dado forças, fé, esperança, constância ao longo deste ciclo. Agradecer por ter me capacitado ao longo dessa trajetória árdua mais essencial, intransferível e inevitável para o meu crescimento, me proporcionando de forma única a oportunidade para que eu me tornasse um ser humano melhor, mais sábio, paciente, tolerante e conhecedor dos meus limites. Me ensinando e tornando-me humilde o suficiente para reconhecer minhas limitações como pessoa e pesquisador que estou me tornando.

Agradeço a minha mãe **Maria Bezerra Costa**, por me ensinar a importância e o poder transformador da educação, da persistência, da obstinação e o poder de acreditar nos sonhos. Eu sinto um orgulho imenso de ser teu filho.

As minhas filhas **Pérola Eduarda** e **Crystal Isabella**, minhas maiores riquezas, razão de todo o meu viver e motivo da minha busca incessante em ser um PAI melhor. Por vocês tenho me esforçado de maneira única para lhes oferecer um futuro melhor, de educação, equidade, justiça e muito amor.

A minha Família; A minha Irmã, Padrinhos, Tios, Primos e Avós (in memoriam).

Agradeço a **Universidade Federal de Alagoas - UFAL**, por possibilitar a tantos alunos (as), o aprendizado e a construção de uma história linda de sucesso e amor a profissão. **VIVA A UNIVERSIDADE PÚBLICA DE QUALIDADE!!!**

Agradeço ao meu Orientador Professor **Dr. Francis Soares Gomes**, pela paciência, dedicação, apoio e por sua infalível orientação desde a Iniciação científica em Bioquímica, agradeço a nossas viagens a trabalho entre UFAL-UFPE, congressos, almoços e cafés. Agradeço pelos valiosos conselhos, risadas e por me ter com tanta estima, obrigado por todos os momentos de ensino e ajuda.

A minha Coorientadora Professora **Dr^a Maria Luiza Vilela Oliva**, por toda paciência que teve na UNIFESP nos experimentos realizados no Mestrado e Doutorado, e por toda a contribuição na minha formação, muito obrigado.

A minha eterna Professora e ajudadora **Dr^a Edma Miranda**, pelos seus riquíssimos conselhos, cuidados de mãe e ajuda com minha família, a senhora serei

eternamente grato por me ajudar a me tornar um ser humano melhor, obrigado pelos valiosos ensinamentos em Bioquímica.

Agradeço aos Professores Doutores (as), de Bioquímica e Biologia Molecular da UFAL, em especial aos que acompanharam minha trajetória desde o princípio, Hugo Juarez, Sônia Salgueiro, Luciano Meirelles, José Maria, Vitor Lopes, Leonardo Broeto, Melissa Landel e tantos outros com quem tive o privilégio de aprender, gratidão por toda a paciência, ensino e dedicação.

Ao Programa multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia molecular, a Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, pela rica oportunidade e privilégio de ter sido aluno desse programa de sucesso.

Obrigado aos meus amigos e colegas de laboratórios (Lamp), a Monizy pela imensa ajuda e parceria ao longo de todos esses anos, tanto na bancada quanto na escrita, minha gratidão será eterna. A Stella e Marta a quem tenho com muito carinho pelos momentos de aprendizado, café e alegria. A Beth, Cláudio, Sarah, Humberto, João, Janaína, Andréia, Thaty, Thomaz, Josiel, Cledson, e tantos quantos passaram pelo Lamp.

Aos funcionários da Universidade Federal de Alagoas, técnicos de laboratório e administrativos, auxiliares de biblioteca, auxiliares do RU, e auxiliares de limpeza, muito obrigado pelo serviço prestado com tamanha excelência, em Especial a dona Gersa, Nilda e Aldir pessoas a quem guardarei com carinho.

Aos laboratórios parceiros na Universidade Federal de Alagoas (UFAL). A professora Dr^a Melissa Landel, pela oportunidade de realizar os experimentos com microrganismos. E ao Professor Dr. Emiliano, pelos testes Citotóxicos. Aos Professores Doutores (as), Sônia Salgueiro, Luciano Meirelles, Mário Meneghetti e Ruth Rufino, por disponibilizarem os vossos laboratórios sempre que necessitei nos meus experimentos.

A Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), na pessoa da minha Coorientadora Professora Dr^a Maria Luiza Vilela Oliva, pelos e experimentos realizados.

A Universidade Estadual de São Paulo (USP), na pessoa da Professora Dr^a Patrícia Targon, pela parceria nos experimentos, muito obrigadopor essa parceria de sucesso.

A Universidade Federal do Pernambuco (UFPE), na pessoa da Professora Dr^a Patrícia Paiva, pelos seus valiosos ensinamentos e pelos diversos testes realizados em parceria ao seu laboratório.

A Universidade Estadual de Montes Claros (UEMC), na pessoa do Professor Dr. Carlos Fraga, pela parceria e apoio nos experimentos.

A CAPES e ao CNPQ, pelo apoio financeiro na minha pesquisa de Doutorado, sem o auxílio financeiro disponibilizado para a realização dessa pesquisa jamais teríamos obtidos dados tão relevantes e essenciais a Ciência.

Agradeço a todos que diretamente ou indiretamente me ajudaram a concluir esse sonho exitoso que concluir o Doutorado.

**“PORTANTO FILHO MEU TÃO
SOMENTE ESFORÇA-TE E TEM MUITO
BOM ANIMO, POIS EU SOU CONTIGO”**

Livro de Josué cap. 3.

**A VERDADEIRA CORAGEM É IR ATRÁS
DO SEU SONHO MESMO QUANDO
TODOS DIZEM QUE ELE É
IMPOSSÍVEL.**

Cora Coralina.

RESUMO

O uso de macromoléculas obtidas de tecidos vegetais apresenta grande potencial econômico e farmacológico e isso se dá em decorrência da presença dos compostos bioativos. Dentre estes, as lectinas veem sendo intensamente exploradas devido as diversas ações biotecnológicas que podem ter, destacando-se as atividades antifúngica, anticoagulante e antitumoral. Desse modo, o presente trabalho teve por objetivo purificar, caracterizar e avaliar a atividade antitumoral, antimicrobiana e sobre parâmetros hemostáticos das lectinas de *Genipa americana* L. (jenipapo), *Rhizophora mangle* L. (mangue vermelho) e da própolis vermelha de Alagoas. As lectinas foram isoladas inicialmente através de extração em Tris-HCl 50mM pH 8,0, para sementes e cascas de *G. americana*, NaCl 0,15M, para sementes de *R. mangle*, e NaCl 0,15M com 30 % de etanol para a própolis vermelha. Em seguida, foram feitos fracionamentos salinos com sulfato de amônio e as frações que apresentaram melhor atividade foram submetidas à cromatografia de exclusão molecular (Sephacryl S-100), para isolamento das lectinas de casca de *G. americana* (GaBL); cromatografia de exclusão molecular (Sephacryl S-100) seguida de uma trocadora catiônica (DEAE Sepharose) para a lectina de sementes de *G. americana* (GaSL); ou cromatografia em coluna de quitina para isolar as lectinas de *R. mangle* e da própolis vermelha. Através de um único passo cromatográfico foi isolada uma lectina (GaBL) e por meio de SDS-PAGE (10%) foi observado que GaBL apresenta uma massa molecular aproximada de 242,5 kDa. No teste citotóxico GaBL não se mostrou tóxica para linhagens celulares de fibroblastos 3T3 em concentrações abaixo de 50µg/mL. O efeito da lectina na coagulação sanguínea foi avaliado através do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA), tempo de protrombina (TP). GaBL apresentou atividade anticoagulante somente na via intrínseca, onde o TTPA apresentou-se prolongado. A atividade antitumoral avaliada utilizou as linhagens celulares de câncer de pele humano (A431), melanoma (B16) e carcinoma de células escamosas da língua (SCC9). A proliferação celular e a migração celular foram diminuídas em todas as linhagens avaliadas em contato com 10 µg/ml de GaBL diminuiu a invasão de células SCC9. A apoptose foi maior nas células B16 e SCC9 tratadas com lectina. A regulação positiva de GaBL de E-caderina e supressão de Col1A1 em todas as cepas testadas indicou um menor desenvolvimento de câncer. (A lectina de sementes de *G. americana*, GaSL, teve sua atividade hemaglutinante (AH) inibida fortemente por ramnose, mas não foi afetada por íons divalentes nem por EDTA. GaSL é classificada como uma lectina termoestável, com uma melhor atividade a uma temperatura abaixo de 80 ° C e na faixa de pH 5,0 a 6,0. Frente as atividades antifúngicas, GaSL quando testada com os fungos *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* e *Cryptococcus neoformans*, mostrou-se inibir todas as cepas fungicas em concentrações abaixo de 12,5 µg/mL. A lectina de sementes de *R. mangle* é também termoestável, mas, diferente das demais, foi inibida mais intensamente por arabinose e caseína, teve melhor atividade em pH 8,0 e 9,0 e teve sua AH reduzida em presença de íons Mn^{2+} , Mg^{2+} e Ca^{2+} , não alterada por EDTA e estimulada em presença de Zn^{2+} . A lectina da própolis também foi inibida fortemente por caseína, é termoestável, apresentou melhor AH na faixa de pH 5,0 a 6,0 e foi reduzida em presença de Mn^{2+} , Mg^{2+} , levemente estimulada por Zn^{2+} e não afetada por EDTA e Ca^{2+} . Frente a atividade antifúngica PVAL se mostrou uma promissora ferramenta biotecnológica, quando testada com os fungos *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* e *Cryptococcus neoformans*. PVAL nas concentrações 12,5 µg/mL foi capaz de inibir fortemente *Candida albicans* e

Staphylococcus aureus e 25 µg/mL *Cryptococcus neoformans*. O efeito de PVAL na coagulação sanguínea foi avaliado através do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA), tempo de protrombina (TP). Onde PVLA promoveu expressivo prolongamento de TTPA, enquanto que para TP PVAL promoveu forte inibição. Diante Dos dados expostos, podemos destacar que GaBL tem elevado potencial antitumoral contra câncer do trato aero digestivo superior e possui notória atividade homeostática. GaSL e PVAL possui notável atividade antifúngica podendo ser uma promissora ferramenta biotecnológica, tendo esta ultima um importante papel nos processos homeostáticos da coagulação, sendo um forte prolongador da TTPA e inibidor de TP. E por fim destacamos que todas as lectinas estudadas apresentam características estruturais que favorecem o estudo biotecnológico envolvendo a saúde humana.

Palavras-chave: câncer; anticoagulante; antifúngico; proteína; cromatografia.

ABSTRACT

The use of macromolecules obtained from plant tissues has great economic and pharmacological potential and this is due to the presence of bioactive compounds. Among these, lectins have been intensely explored due to the various biotechnological actions they may have, especially the antifungal, anticoagulant and antitumor activities. Thus, the present work aimed to purify, characterize and evaluate the antitumor, antimicrobial and hemostatic activity of lectins from *Genipa americana* L. (jenipapo), *Rhizophora mangle* L. (red mangrove) and red propolis from Alagoas. Lectins were isolated initially by extraction in 50mM Tris-HCl pH 8.0 for *G. americana* seeds and bark, 0.15M NaCl for *R. mangle* seeds and 0.15M NaCl with 30% ethanol for red propolis. Then, salt fractions were made with ammonium sulfate and the fractions that showed better activity were submitted to molecular exclusion chromatography (Sephacryl S-100), for isolation of lectins from *G. americana* (GaBL); molecular exclusion chromatography (Sephacryl S-100) followed by a cation exchanger (DEAE Sepharose) for the lectin from *G. americana* seeds (GaSL); or chitin column chromatography to isolate lectins from *R. mangle* and red propolis. Through a single chromatographic step a lectin (GaBL) was isolated and by SDS-PAGE (10%) it was observed that GaBL has an approximate molecular mass of 242.5 kDa. The effect of lectin on blood clotting was evaluated through activated partial thromboplastin time (APTT), prothrombin time (PT). GaBL showed anticoagulant activity only in the intrinsic pathway, where the APTT was prolonged. In the cytotoxic test, GaBL was not toxic to 3T3 fibroblast cell lines at concentrations below 50µg/mL. The antitumor activity evaluated used human skin cancer (A431), melanoma (B16) and tongue squamous cell carcinoma (SCC9) cell lines. Cell proliferation and cell migration were decreased in all cell lines evaluated in contact with 10 µg/ml of GaBL decreased invasion of SCC9 cells. Apoptosis was higher in lectin treated B16 and SCC9 cells. GaBL's positive regulation of E-cadherin and suppression of Col1A1 in all strains tested indicated less cancer development. The lectin from *G. americana* seeds, GaSL, had its hemagglutinating activity (AH) strongly inhibited by rhamnose, but was not affected by divalent ions or EDTA. GaSL is classified as a thermostable lectin, with best activity at a temperature below 80°C and in the pH range 5.0 to 6.0. In the face of antifungal activity, GaSL, when tested with the fungi *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* and *Cryptococcus neoformans*, was shown to inhibit all fungal strains at concentrations below 12.5 µg/mL. The lectin from *R. mangle* seeds is also thermostable, but unlike the others, it was inhibited more strongly by arabinose and casein, had better activity at pH 8.0 and 9.0 and had its AH reduced in the presence of Mn²⁺, Mg²⁺ and Ca²⁺ ions, not altered by EDTA and stimulated in the presence of Zn²⁺. The lectin from propolis was also strongly inhibited by casein, is thermostable, showed better AH in the pH 5.0 to 6.0 range and was reduced in the presence of Mn²⁺, Mg²⁺, slightly stimulated by Zn²⁺ and not affected by EDTA and Ca²⁺. In view of the antifungal activity PVAL proved to be a promising biotechnological tool, when tested with the fungi *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* and *Cryptococcus neoformans*. PVAL at concentrations of 12.5 µg/mL was able to strongly inhibit *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* and 25 µg/mL *Cryptococcus neoformans*. The effect of PVAL on blood clotting was evaluated through activated partial thromboplastin time (APTT), prothrombin time (PT). Where PVLA promoted expressive prolongation of APTT, while for TP it promoted strong inhibition. In view of the above data, we can highlight that GaBL has high antitumor potential against cancer of the upper aerodigestive tract and

has a notorious homeostatic activity. GaSL and PVAL have remarkable antifungal activity and can be a promising biotechnological tool, the latter having an important role in the homeostatic processes of coagulation, being a strong protractor of APTT and TP inhibitor. Finally, we emphasize that all the lectins studied have structural characteristics that favor the biotechnological study involving human health.

Keywords: cancer; anticoagulant; antifungal; protein; chromatography.

LISTA DE SIGLAS, SIMBOLOS E ABREVIACES

%- Porcentual	DVL- Lectina da espécie vegetal <i>Dioclea viol�cea</i>
�C- Graus celsius	EUA- Estados Unidos da América
�L- Microlitros	F1- Fração 20%
�g/mL- Microgramas por microlitros	g- Gramas
786-0 Linhagem tumoral de câncer renal	g/ml- Gramas por mililitro
A375- Linhagem tumoral de melanoma humano	GaBL- Lectina da casca de <i>Genipa americana</i> L
A549- Linhagem tumoral de adenocarcinoma, HT29 (câncer de cólon)	GaBL- Lectina da semente de <i>Genipa americana</i> L
AH- Atividade hemaglutinante	GSLI- Lectina extraída das sementes e folhas de <i>Griffonia simplicifolia</i>
AHE- Atividade hemaglutinante específica	GNA- Lectina relacionadas à aglutinina de <i>Galanthus nivalis</i>
BmoLL- Lectina da folha de <i>B. monandra</i>	h- Horas
BR- Brasil	ha- Hectare
cDNA- DNA complementar	HAV- Vírus da hepatite A
CasuL- Lectina isolada da folha de <i>Calliandra surinamensis</i>	HCT-15- Linhagem celular de adenocarcinoma colorretal humano
Ca ²⁺ : �on Cálcio	HeLa- Linhagem tumoral de câncer cervical
CO ₂ - Dióxido de carbono	HeLa, PC-3 Linhagem celular de câncer de próstata
ConA- Concanavalina A	HIV- Vírus da imunodeficiência humana
cm- Centímetro	HPA- Lectina de <i>Helix pomatia</i> lectina
Da- Dalton	HT29 -Linhagem celular de câncer de cólon
DBA- Lectina de <i>Dolichos biflorus</i>	IMA- Instituto Ambiental de Alagoas
DlyL- Lectina de sementes de <i>Dioclea lasiophylla</i> (mucunã)	kDa- Quilodalton
DMSO: Dimetilsulfóxido;	LAMP- Laboratório de Metabolismo e Proteômica
DRC- Domínio de reconhecimento a carboidrato	
DrfL- lectina purificada de sementes de <i>Dioclea reflexa</i>	

LCL- Lectina das folhas de Lantana camara	(NH ₄) ₂ SO ₄ - Sulfato de amônio
Lunatin- Lectina purificada a partir das sementes de <i>Phaseolus lunatus</i>	Nictaba- lectinas relacionadas à aglutinina de <i>Nicotiana tabacum</i>
LysM – Lectina com domínio Lysin M	PCR- Proteína C reativa
M- Molar	PeRoL- Lectina da raiz de <i>Portulaca elatior</i>
MCF-7- Linhagem celular de adenocarcinoma de mama	PfLP- Lectina oriunda da seiva do fruto de <i>Praecitrullus fistulosus</i>
MDA-MB-231- Linhagem celular de câncer de mama	pH- Potencial hidrogeniônico
MaL- Lectina de <i>Machaerium acutifolium</i>	PNA- Lectina de amendoim
Mg ²⁺ : Íon Magnésio	PVAL- Lectina da Própolis Vermelha de Alagoas
MLL - Lectina da folha de <i>Morus alba</i>	rGSLII- Forma recombinante da lectina extraída das sementes e folhas de <i>Griffonia simplicifolia</i>
Mn ²⁺ : Íon Manganês	RmSL- Lectina da semente do propágulo de <i>Rhizophora mangle</i>
mg: Miligrama	RNA- Ácido ribonucleico
mg/mL- Miligrama por mililitro	RVL- Lectina purificada da espécie <i>Remusatia vivípara</i>
mL: Mililitros	SBA- lectina de soja
mM: Milimolar	StELL- Lectina da folha de <i>Schinus terebinthifolius</i>
Min: Minutos	TCLs- Lectinas ligantes de quitina de frutos de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>)
m/v: Massa por volume;	TP- Tempo de protrombina
MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl) -2,5-difenil brometo de tetrazolina	TTPA- Tempo de tromboplastina parcial ativada
MuBL- Lectinas da entrecasca de <i>Myracrodruon urundeuva</i> (aroeira-do-sertão)	UEA-1- Lectina de <i>Ulex europaeus</i>
MuHL- Lectina do cerne <i>Myracrodruon urundeuva</i> (aroeira-do-sertão)	USP- Universidade Estadual de São Paulo
MuLL- Lectina das folhas de <i>Myracrodruon urundeuva</i> (aroeira-do-sertão)	v/v- Volume por volume
Nm- Nanometro	WSMoL- Lectina isolada de sementes de <i>Moringa oleífera</i> .
NaCl- Cloreto de sódio	
NaOH- Hidróxido de sódio	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estruturas de <i>Genipa americana</i> - A:Caule, B: Folha, C:Arvore, D:Flor e Fruto, E: Semente.....	33
Figura 2- A: Distribuição dos Manguezais do Brasil e B: Unidades de conservação e manguezais de Alagoas.	37
Figura 3- Distribuição global das espécies de <i>Rhizophora</i> L. (<i>Rhizophoraceae</i>).	39
Figura 4- Aspectos gerais de <i>Rhizophora mangle</i> L., A: Detalhe para a estrutura da floresta, B: Folhas e frutos e C: raízes.	40
Figura 5- <i>Dalbergia ecastophyllum</i> , Inflorescência multiflora (A); <i>Apis melífera</i> coletando exsudato (B) e (C); <i>Apis melífera</i> tampando as frestas da colmeia (D); Própolis (E).....	45
Figura 6- Representação da ligação das lectinas com os carboidratos e seu DRC ..	53
Figura 7- As forças estabilizadoras das ligações reversíveis entre lectina e carboidratos.....	54
Figura 8- Representação esquemática (A) da rede de eritrócitos promovida pela ligação da lectina aos carboidratos de superfície e (B) da inibição da atividade hemaglutinante pelos carboidratos livres.	55
Figura 9- Representação das diferentes funções das lectinas.	56
Figura 10- Representação esquemática de quatro tipos de lectinas vegetais: merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas.	59
Figura 11- Aplicações das Lectinas em diferentes áreas.	61
Figura 12- Aplicações biotecnológicas das Lectinas.	62
Figura 13- Esquema das vias de coagulação: Intrínseca e extrínseca.	69
Figura 14- Esquema da coagulação sanguínea baseada em superfícies celulares. .	70
Figura 15- A: Estimativa de novos casos; B: Estimativa de mortes. Em 2020, por idade, ambos os sexos.	73
Figura 16- Atuação das Lectinas na indução da apoptose.....	75
Figura 17-- Mecanismos de atuação da Lectina no câncer, por apoptose.	77
Figura 18- Mecanismos de atuação da Lectina no câncer, por autofagia.	79
Figura 19- Esquema ilustrativo das cromatografias. Em A: Exclusão molecular, B: Troca-iônica e C: Afinidade.	85

Figura 20- Imagens das estruturas e processos utilizados pra preparação do extrato; A: Caule de <i>Genipa americana</i> . B: Casca e C: Pó da casca.....	87
Figura 21- Coluna de Cromatografica Gel Filtração Sephacril S-100, com amostra de <i>G. americana</i>	89
Figura 22- Imagem ilustrativa da atividade Hemaglutinante.....	89
Figura 23- Fracionamento com Sulfato de Amônio, frações com que apresentaram atividade hemaglutinante.	95
Figura 24- Perfil cromatográfico da Exclusão Molecular Sephacril S-100. *Atividade Hemaglutinante de GaBL (<i>Genipa americana</i> bark lectin). • Leitura da abs 280 nm (Perfil Proteico).....	97
Figura 25- A: SDS- PAGE a 12%. As linhas 2-3 correspondem à fração 14. A eletroforese foi processada a voltagem constante (90 mV), e as bandas coradas com Comassi Blue. B: Pico proteico, fração 14 com atividade exportada do cromatograma. C: Gel de Eletroforese SDS- PAGE 10%. 1 GaBL Condições redutoras. 2 GaBL em condições não redutoras.	98
Figura 26- Efeito da lectina pura, do extrato bruto da casca de <i>Genipa americana</i> e da fração sobre a viabilidade de fibroblastos 3T3 em 24 e 48 horas. As barras representam a média $\pm$ EPM. A linha tracejada representa o grupo controle (tratado com meio de cultivo DMEM). ANOVA one-way seguido do pós-teste de Newman-Keuls, *p < 0,05 e **p < 0,001 (Controle vs. tratamento).....	100
Figura 27- Avaliação da interferência das proteínas em estudo GabL no tempo de coagulação do plasma de camundongo.....	102
Figura 28- Avaliação do tempo de TP pela interferência das proteínas em estudo (GabL).	103
Figura 29- Efeito da lectina (GaBL) no número de células cancerosas A431, B16 e SCC9. *Significado estatístico.....	105
Figura 30- Efeito da lectina (GaBL) na migração e invasão de células cancerosas. Efeito do ensaio de raspagem de feridas de lectina (GaBL) de células A431, células B16 e células SCC9. *Significado estatístico.	107
Figura 31- Efeito da lectina (GaBL) no ensaio Matrigel de células SCC-9. *Significado estatístico.	108
Figura 32- Efeito da lectina (GaBL) na morte celular. Embora os números representativos de AO / EB e a quantificação não mostrem alteração da morte celular	

em A431 (A), foi observado um aumento na morte celular como consequência do tratamento com lectina nas células B16 (B) e SCC9 (C). * Significado estatístico..	109
Figura 33- Efeito da lectina (GaBL) nos níveis de mRNA da caderina-E (A), caspase-3 (B) e Col1A1 (C) em células A431, B16 e SCC9. *Significado estatístico.....	111
Figura 34- Semente e pó da <i>G. americana</i>	114
Figura 35- HA – Precipitação com sulfato de amônio.	121
Figura 36- Cromatograma S-100 Sephacryl, pós Fracionamento com Sulfato de amônio (F1): Cromatograma (S100 Sephacryl): (A280) perfil de eluição de proteínas (linha preta). Atividade hemaglutinante em Log de HA (linha azul).....	123
Figura 37- Cromatograma DEAE-Sepharose. A linha preta mostra o perfil de proteínas eluídas, enquanto a linha vermelha mostra-se a atividade inibitória específica, e a linha azul tracejada destaca-se o gradiente do tampão de eluição.	124
Figura 38- Eletroforese com gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (10%) da lectina purificada a partir da PVA. Canaleta 1: Padrão de massa; Canaleta 3: Lectina em condições desnaturante e não redutora; Canaleta 5: Lectina em condição desnaturante e redutora com β - mercaptol. A eletroforese foi processada a voltagem constante (90 mV), e as bandas foram coradas com Coomassie.	126
Figura 39- Teste de Temperatura ótima. As amostras foram incubadas por 30 minutos.....	128
Figura 40- Teste de Termoestabilidade. As amostras foram incubadas por 1Hs. ...	129
Figura 41- Teste de pH ótimo. A lectina foi dializada por 2 horas em todos os pHs.	131
Figura 42- Teste de estabilidade ao pH. A lectina foi dializada por 6 horas em todos os pHs.	131
Figura 43- Avaliação do efeito de íons na AH.	133
Figura 44- Atividade antimicrobiana de GaSL frente a bactéria e fungos patogênicos. ND: Não detectada atividade na concentração testada.	135
Figura 45- Representação esquemática do Propágulo de <i>Rizophora mangle</i> . A: Talo, B: Semente.....	138
Figura 46- Fracionamento com Sulfato de Amônio, frações com que apresentaram atividade hemaglutinante.	144
Figura 47- Representação esquemática do Cromatograma de <i>Rizophora mangle</i> .	145

Figura 48- Eletroforese com gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (10%) da lectina purificada a partir da PVA. Canaleta 1: Padrão de massa; Canaleta 3: Lectina em condições desnaturante e não redutora; Canaleta 5: Lectina em condição desnaturante e redutora com β - mercaptol. A eletroforese foi processada a voltagem constante (90 mV), e as bandas foram coradas com Coomassie	146
Figura 49- Teste de Temperatura ótima. As amostras foram incubadas por 30 minutos.	149
Figura 50- Teste de Termoestabilidade. As amostras foram incubadas por 1Hs. ...	149
Figura 51- Teste de pH ótimo. A lectina foi dializada por 2 horas em todos os pHs.	151
Figura 52- Teste de estabilidade ao pH. A lectina foi dializada por 6 horas em todos os pHs.	151
Figura 53- Efeito do EDTA e íons divalentes na atividade hemaglutinante	153
Figura 54- cromatográfica de afinidade com matriz de N-acetilglucosamina/ quitina.	157
Figura 55- Cromatografia de afinidade- Própolis Vermelha de Alagoas.....	164
Figura 56- Eletroforese com gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (10%) da lectina purificada a partir da PVA. Canaleta 1: Padrão de massa; Canaleta 3: Lectina em condições desnaturante e não redutora; Canaleta 5: Lectina em condição desnaturante e redutora com β - mercaptol; Canaleta 6: Lectina pura em condições desnaturante e não redutora. A eletroforese foi processada a voltagem constante (90 mV), e as bandas foram coradas com Coomassie.....	166
Figura 57- Teste de Temperatura ótima. As amostras foram incubadas por 30 minutos.....	168
Figura 58- Teste de Termoestabilidade. As amostras foram incubadas por 1Hs. ...	169
Figura 59- Teste de pH ótimo. A lectina foi dializada por 2 horas em todos os pHs.	170
Figura 60- Teste de estabilidade ao pH. A lectina foi dializada por 6 horas em todos os pHs.	170
Figura 61- Efeito do EDTA e íons divalentes na atividade hemaglutinante.....	172
Figura 62- Atividade antimicrobiana de PVAL frente a bactéria e fungos patogênicos.	173

Figura 63- Avaliação da interferência das proteínas em estudo PVAL no tempo de coagulação do plasma de camundongo.....	175
Figura 64- Avaliação do tempo de TP pela interferência das proteínas em estudo (PVAL).....	176

LISTA DE TABELA

Tabela 1- Classificação da própolis brasileira.	44
Tabela 2- Indicação geográfica da Própolis vermelha de Alagoas.	46
Tabela 3- Precipitação Salina.	88
Tabela 4- Fracionamento com Sulfato de Amônio.	95
Tabela 5- Purificação lectina da casca de Genipa americana.	97
Tabela 6- Concentração de fenóis totais da casca de Genipa americana.	100
Tabela 7- Precipitação Salina.	115
Tabela 8- Resultados dos Fracionamentos. (Sulfato de amônio, Etanol e Acetona).	120
Tabela 9- Teste de inibição da Atividade Hemaglutinante Específica - AHE de GaSL por carboidratos e glicoproteína.	127
Tabela 10- Atividade antimicrobiana de GaSL frente a bactéria e fungos patogênicos	135
Tabela 11- Precipitação Salina.	139
Tabela 12- Precipitação proteica com diferentes agentes precipitantes.	143
Tabela 13- Teste de inibição da Atividade Hemaglutinante Específica - AHE de RmLS por carboidratos e glicoproteína.	148
Tabela 14- Precipitação Salina.	156
Tabela 15- Precipitação proteica com diferentes agentes precipitantes.	163
Tabela 16- Teste de inibição da atividade hemaglutinante da Lectina de PVA por carboidratos.	167
Tabela 17- Atividade antimicrobiana de PVAL frente a bactéria fungos patogênicos.	173

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	27
2.1. Objetivos gerais:	29
2.2. Objetivos específicos	29
2.2.1. <i>Genipa americana</i> L. - Casca	29
2.2.2. <i>Genipa americana</i> L. – Sementes	29
2.2.3. <i>Rhizophora mangle</i> L.	30
2.2.4. Própolis Vermelha de Alagoas.....	30
CAPÍTULO I	31
3. REVISÃO DA LITERATURA	32
3.1. <i>Genipa americana</i> L.	32
3.1.1. <i>Genipa americana</i> L.: Características bioquímicas e aplicações biotecnológicas	34
3.2. Manguezal	36
3.3. <i>Rhizophora mangle</i> L.	39
3.3.1. <i>Rhizophora mangle</i> L: Características bioquímicas e aplicações biotecnológicas	40
3.4. Própolis	42
3.4.1. Própolis Vermelha de Alagoas: Características Bioquímicas e Atividades Biotecnológicas.....	44
3.5. Lectinas	50
3.5.1. Histórico, definição e propriedades gerais	50
3.5.2. Lectinas vegetais	57
3.5.2.1. Classificação de lectinas vegetais	58
3.5.3. Aplicações biotecnológicas das lectinas	60
3.5.3.1. Tipagem Sanguínea.....	62
3.5.3.2. Terapias mediada por lectina.....	63
3.5.3.3. Atividade Inseticida	63
3.5.3.4. Atividade Antiviral	65
3.5.3.5. Atividade Antimicrobiana	65
3.5.3.6. Atividade Anticoagulante	68
3.5.3.7. Atividade Anticancerígena	72
3.5.4. Métodos de purificação de Lectinas	82

CAPÍTULO II86

Genipa americana- Casca (GaBL)86

4.1. Materiais e métodos

CASCA DE Genipa americana.87

4.1.1. Obtenção e identificação do material.....87

4.1.2. Preparo do extrato87

4.1.3. Precipitação salina com sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄)88

4.1.4. Purificação da lectina.....88

4.1.5. Ensaio de atividade hemaglutinante89

4.1.6. Eletroforese SDS-PAGE e nativa90

4.1.7. Determinação da concentração de proteína.....90

4.1.8. Quantificação de Fenois totais.....90

4.1.9. Atividade biológica.....91

4.1.9.1. Ensaio de Viabilidade Celular91

4.1.9.2. Ensaio do Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado (TTPA) 91

4.1.9.3. Ensaio do Tempo de Protrombina (PT)92

4.1.9.4. Cultura de células e tratamento92

4.1.9.5. Ensaio de viabilidade celular92

4.1.9.6. Ensaios de migração celular93

4.1.9.7. Coloração fluorescente AO / EB dupla93

4.1.9.8. Isolamento de RNA e PCR em tempo real94

4.1.9.9. Análise estatística.....94

4.2. Resultados e discussões.....95

4.2.1. Preparo do extrato bruto e precipitação salina95

4.2.2. Purificação da lectina GaBL.....96

4.2.3. Eletroforese SDS-PAGE.....98

4.2.4. Concentração de fenóis totais99

4.2.5. Atividades biológicas100

4.2.5.1. Teste de Citotóxico e Viabilidade Celular100

4.2.5.2. Ensaio do Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado (TTPA) e da atividade da Protrombina.....102

4.2.5.3. Atividade Anticancerígena da Lectina (GaBL): redução da proliferação celular104

4.2.5.4. Lectina (GaBL) reduz a migração e invasão de células cancerosas	105
4.2.5.5. Efeito da lectina (GaBL) na expressão de apoptose, caspase-3, e-caderina e Col1A1	108
CAPÍTULO III	113
5.1. Materiais e métodos	
Semente de <i>Genipa americana</i>	114
5.1.1. Obtenção do Material e preparo do extrato bruto	114
5.1.2. Estratégias de Purificação de Proteínas	115
5.1.2.1. Precipitação com sulfato de amônio ((NH ₄) ₂ SO ₄)	115
5.1.2.2. Precipitação de proteínas com solventes orgânicos (acetona e etanol)	115
5.1.2.3. Cromatografia Líquida	115
5.1.3. Ensaio de atividade Hemaglutinante	116
5.1.4. SDS-PAGE, Eletroforese Nativa	116
5.1.5. Determinação da Concentração de Proteína	117
5.1.6. Ensaio de Inibição e Especificidade de Carboidratos e Glicoproteínas	117
5.1.7. Ensaio da Avaliação de temperatura, Estabilidade térmica e efeito do pH mediante a atividade Hemaglutinante	117
5.1.8. Efeito do EDTA e de Cátions divalentes sobre a Atividade Hemaglutinante	118
5.1.9. Atividade Biológica	118
5.1.9.1. Ensaio de Atividade Antifúngica	118
5.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO	120
5.2.1. Preparo do extrato bruto e e precipitação da semente de <i>Genipa americana</i>	120
5.2.2. Purificação da Lectina GaSL	122
5.2.3. Eletroforese Nativa e SDS-PAGE	125
5.2.4. Teste de Inibição com Carboidratos e Glicoproteínas por GaSL	126
5.2.5. Teste de Temperatura e Termoestabilidade	128
5.2.6. Teste de pH ótimo e Estabilidade	130
5.2.7. Efeito de Íons em GaSL	132

6.1.1.1. Atividade antimicrobiana de PVAL frente a fungos e bactérias patogênicos	133
CAPÍTULO IV.....	137
<i>Rhizophora mangle</i> - Sementes do propágulo.....	137
6.2. Materiais e métodos.....	138
6.2.1. Obtenção do Material e preparo do extrato bruto	138
6.2.2. Estratégias de Purificação de Proteínas.....	139
6.2.2.1. Precipitação salina com sulfato de amônio ((NH ₄) ₂ SO ₄)	139
6.2.2.2. Precipitação de proteínas com solventes orgânicos (acetona e etanol	139
6.2.2.3. Cromatografia Líquida	139
6.2.3. Ensaio de atividade Hemaglutinante	140
6.2.4. SDS-PAGE, Eletroforese Nativa.....	140
6.2.5. Determinação da Concentração de Proteína.....	141
6.2.6. Ensaio de Inibição e Especificidade de Carboidratos e Glicoproteínas	141
6.2.7. Ensaio da Avaliação de temperatura, Estabilidade térmica e efeito do pH mediante a atividade Hemaglutinante.....	141
6.2.8. Efeito do EDTA e de Cátions divalentes sobre a Atividade Hemaglutinante	142
6.3. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	143
6.3.1. Preparo do extrato bruto e precipitação salina	143
6.3.2. Purificação da lectina.....	145
6.3.3. Eletroforese SDS-PAGE	146
6.3.4. Teste de Inibição com Carboidratos e Glicoproteínas	147
6.3.5. Teste de Temperatura ótima e Termoestabilidade	148
6.3.6. Teste de pH ótimo e estabilidade	150
6.3.7. Efeito do EDTA e de Íons divalentes na atividade hemaglutinante da lectina	152
7. CAPÍTULO V.....	155
<i>Propólis vermelha de Alagoas</i>.....	155
7.1. Materiais e métodos.....	156
7.1.1. Obtenção do Material e preparo do extrato bruto	156

7.1.2. Estratégia de Purificação	156
7.1.2.1. Precipitação com sulfato de amônio ((NH ₄) ₂ SO ₄).....	156
7.1.2.2. Precipitação de proteínas com solventes orgânicos (acetona e etanol	157
7.1.2.3. Cromatografia Líquida	157
7.1.3. Ensaio de atividade Hemaglutinante	158
7.1.4. SDS-PAGE, Eletroforese Nativa.....	158
7.1.5. Determinação da Concentração de Proteína.....	158
7.1.6. Ensaio de Inibição e Especificidade de Carboidratos e Glicoproteínas	159
7.1.7. Ensaio da Avaliação de temperatura, Estabilidade térmica e efeito do pH mediante a atividade Hemaglutinante.....	159
7.1.8. Efeito do EDTA e de Cátions divalentes sobre a Atividade Hemaglutinante	160
7.1.9. Atividade Biológica	160
7.1.9.1. Ensaio de Atividade Antifúngica.....	160
7.1.9.2. Ensaio do Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado (TTPA)	161
7.1.9.3. Ensaio do Tempo de Protrombina (PT)	161
7.2. RESULTADOS E DISCUSSÕES	162
7.2.1. Preparo do extrato bruto e precipitação proteica	162
7.2.2. Purificação da lectina.....	164
7.2.3. Eletroforese SDS-PAGE.....	165
7.2.4. Teste de Inibição com Carboidratos e Glicoproteínas	167
7.2.5. Teste de Temperatura ótima e Termoestabilidade	168
7.2.6. Teste de Estabilidade e Variação do PH	169
7.2.7. Efeito do EDTA e de Cátions divalentes sobre a Atividade Hemaglutinante	171
7.2.8.1. Atividade antimicrobiana de PVAL frente a bactéria e fungos patogênicos	172
4.2.5.6. Ensaio do Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado (TTPA) e da atividade da Protrombina.....	175
8. CAPÍTULO VI.....	178

CONCLUSÃO.....	179
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	182
ANEXOS.....	216
Anexo 1: Artigo sobre a purificação da Lectina GaBL:	217
Anexo 2: PATENTE sobre a ATIVIDADE ANTICANCERÍGENA da Lectina GaBL:	218
Anexo 2: PATENTE sobre a ATIVIDADE ANTICOAGULANTE DE LEITE (COLABORAÇÃO).	219

1. INTRODUÇÃO

Devido a alta expressão da flora brasileira, o país é conhecido mundialmente pelo elevado número de pesquisas relacionadas ao uso dessa matéria prima para o desenvolvimento de agentes terapêuticos (RUFATTO et al., 2017). Baseado no conhecimento popular, várias plantas têm sido alvo de estudo, como é o caso da *Genipa americana* L., conhecida popularmente como jenipapo (CARDOSO et al., 2019; SOUZA; RUZZA et al., 2018; LORENZI, 2012).

Oriunda da América do Sul e Central, caracteriza-se como árvore frutífera e de ampla distribuição geográfica no continente americano, e em regiões da África e Ásia (SOUZA et al., 1996). No Brasil é encontrada em todos os biomas, exceto nos Pampas. Essa espécie apresenta elevado potencial biotecnológico e econômico, sendo utilizada em programas de reflorestamento, em indústrias de cosméticos, tinturas, carvão e setor de construção naval, civil e marcenaria (SALOMÃO; PADILHA, 2006; RENHE, 2008). Vale salientar que essa espécie pode ser empregada como fitorremediadora, devido aos componentes presentes na sua constituição (COSTA, 2018; ALMEIDA, 1993).

Outra espécie vegetal, também encontrada no território brasileiro, mas precisamente nas regiões dos mangues, e que apresenta várias aplicações biotecnológicas é a *Rhizophora mangle* L., conhecida popularmente como mangue vermelho, espécie que possui caráter arbóreo com folhas simples e adaptações fisiológica notáveis frente aos substratos anaeróbicos típicos do habitat (REGALADO et al., 2016). Trata-se de uma planta que apresentam variados usos na medicina popular, devido a presença dos metabólicos que a constitui, instigando seu reconhecimento quanto indicações etnofarmacológicas e etnobotânicas (dos SANTOS et al., 2019).

Outro produto vegetal oriundo dos manguezais e extremamente utilizada para fins terapêuticos é a própolis, utilizada na medicina popular há séculos, pelos mais diversos povos (PEREIRA; SEIXAS; AQUINO NETO, 2002; BANKOVA et al., 2000; MARCUCCI, 1996). O território brasileiro atualmente é listado, como um dos maiores produtores de própolis, em decorrência das condições climáticas favoráveis, assim como a expressiva diversidade da flora (MARTINEZ; SOARES, 2012). Dentre os treze tipos de própolis, destaca-se a Própolis Vermelha de Alagoas, encontrada, unicamente, na região de manguezais do estado, oriunda da resina de *Dalbergia*

ecastophyllum (ALBUQUERQUE; TONHOLO, 2021). Estudos demonstram que as atividades biológicas da própolis são atribuídas aos compostos químicos presentes na sua constituição, o que a classifica como excelente fitoterápico, com ação antimicrobiana, antiviral, anti-inflamatória, antiulcerativa e antitumoral (NETO et al., 2017; MACHADO et al., 2016).

Pesquisas descrevem que espécies vegetais apresentam diversos metabólitos primários e secundários, responsáveis pelo desenvolvimento das mais diversas funções. Dentre estes encontram-se as proteínas, biomoléculas essenciais para a origem, desenvolvimento e manutenção de todos os seres vivos. É sabido que algumas classes de proteínas apresentam imensa e diversificada aplicabilidade biológica, como as lectinas, proteínas de origem não imunológica e que apresenta, dentre suas infindas característica, especificidade de ligação por carboidratos e/ou glicoconjugados (COSTA et al., 2018).

Estas proteínas são amplamente distribuídas em todos os seres vivos, desde algas, fungos e bactérias até animais e plantas. Entretanto as plantas apresentam maior expressão tecidual dessas proteínas, o que torna o isolamento e a caracterização mais viável (MISHRA et al., 2019; CASTANHEIRA, 2011). Devido as diferenças estruturais e especificidades, estas proteínas apresentam diversas funções biológicas e tem se observado um aumento nas pesquisas no que se refere a purificação e caracterização bioquímica e biofísica dessas biomoléculas, a fim de melhor entender sua atuação biológica e medicinal (COSTA et al., 2018).

Na literatura observa-se várias publicações referentes as atividades biológicas advindas das lectinas, tais como, atividade inseticida (MACEDO; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2015; VANDENBORRE; SMAGGHE; DAMME, 2011), antimicrobiana e antiproliferativa (HIREMATH et al., 2020; COSTA, 2018; DIAS et al., 2015; POMPEU et al., 2015), anti-HIV (HOPPER et al., 2017), mitogênica para linfócitos (ASHRAF; KHAN, 2003; MOVAFAGH et al., 2016), anti-inflamatória (MUSZYNSKA et al., 2018), anticoagulante e antiplaquetária (DA CUNHA PEREIRA et al., 2021; NANDISH et al., 2020; SAMAH et al., 2017; ANDREA et al., 2014; ZHONG et al., 2006) e antitumoral (COULIBALY; YOUAN, 2017; YAU et al., 2015).

Desta forma, o presente trabalho tem como principal objetivo isolar, purificar e caracterizar lectinas dessas espécies vegetais e analisar as atividades citotóxica,

antitumoral, antimicrobiana e parâmetros hemostáticos das lectinas de *Genipa americana* L., *Rhizophora mangle* L. e da própolis vermelha de Alagoas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais:

Purificar, caracterizar e avaliar a atividade antitumoral, antimicrobiana e parâmetros hemostáticos das lectinas de *Genipa americana* L. (jenipapo), *Rhizophora mangle* L. (mangue vermelho) e da própolis vermelha de Alagoas.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. *Genipa americana* L. - Casca

- Realizar a extração de proteínas totais da casca da *Genipa americana* L.;
- Avaliar a atividade hemaglutinante do extrato frente a eritrócitos de coelhos;
- Realizar fracionamento salino com sulfato de amônio $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$;
- Realizar a purificação da lectina utilizando cromatografia de exclusão molecular;
- Efetuar ensaio de viabilidade, migração e proliferação celular;
- Avaliar a atividade anticoagulante da lectina pura;
- Avaliar a atividade citotóxica da lectina em linhagem celular humana;
- Avaliar a atividade antitumoral em cultura de células e tratamento B16, A431 e SCC-9.

2.2.2. *Genipa americana* L. – Sementes

- Realizar a extração de proteínas totais das sementes de *Genipa americana* L.;
- Avaliar a atividade hemaglutinante do extrato frente a eritrócitos de coelhos;
- Realizar fracionamento salino com sulfato de amônio $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$;
- Realizar a purificação da lectina utilizando cromatografias de exclusão molecular e troca-iônica;
- Caracterizar a lectina isolada quanto a especificidade a carboidratos;
- Avaliar o efeito do pH, íons e temperatura na atividade da lectina pura;
- Avaliar a atividade antimicrobiana da lectina pura.

2.2.3. *Rhizophora mangle* L.

- Realizar a extração de proteínas totais das sementes de *Rhizophora mangle*
- Avaliar a atividade hemaglutinante do extrato frente a eritrócitos de coelhos;
- Realizar fracionamento salino com sulfato de amônio $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$;
- Realizar a purificação da lectina utilizando cromatografia de afinidade com matriz de N-acetilglucosamina/ quitina;
- Caracterizar a lectina isolada quanto a especificidade a carboidratos;
- Avaliar o efeito do pH, íons e temperatura na atividade da lectina pura;
- Avaliar a atividade antimicrobiana da lectina pura.

2.2.4. Própolis Vermelha de Alagoas

- Realizar a extração de proteínas totais da Própolis Vermelha de Alagoas;
- Avaliar a atividade hemaglutinante do extrato frente a eritrócitos de coelhos;
- Realizar fracionamento orgânico com etanol;
- Realizar a purificação da lectina utilizando cromatografia de afinidade com matriz de N-acetilglucosamina/ quitina;
- Caracterizar a lectina isolada quanto a especificidade a carboidratos;
- Avaliar o efeito do pH, íons e temperatura na atividade da lectina pura;
- Avaliar a atividade antimicrobiana da lectina pura.
- Avaliar a atividade anticoagulante da lectina pura.

CAPÍTULO I

Revisão da Literatura

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. *Genipa americana* L.

O território brasileiro é listado como o país com a maior biodiversidade na flora mundial, onde dezenas de espécie vegetais são catalogadas diariamente. Sabe-se que muitas destas espécies existentes nos biomas brasileiros são classificadas como endêmicas, o que reforça a importância no cuidado e exploração sustentável dessa riqueza (COSTA, 2018). Uma vez que os produtos naturais produzidos a partir da flora brasileira são classificados como excelentes fontes de substâncias usadas nas pesquisas referentes a produção de agentes terapêuticos (RUFATTO et al., 2017).

Genipa americana L., conhecida popularmente como jenipapo é uma árvore neotropical, pertencente à família das *Rubiacea*, 550 gêneros e 9.000 espécies. No Brasil, existem cerca de 120 gêneros e 1.400 espécies, correspondendo à família mais populosa do bioma Cerrado e é um elemento importante em quase todas as formações naturais (CARDOSO et al., 2019; SOUZA; RUZZA et al., 2018; LORENZI, 2012). É oriunda da América do Sul e Central, sendo listada como uma espécie frutífera e de ampla distribuição geográfica no continente americano, e em regiões da África e Ásia (SOUZA et al., 1996). Além do termo jenipapo, a depender da região encontrada, esta planta dispõe de outros nomes populares, tais como janapapeiro, janipaba, jenipapeiro, jenipapinho, jenipá, jenipapeirol entre outros.

No Brasil, é encontrada em quase todos os biomas brasileiros, exceto os Pampas, biomas de regiões de clima tropical e semi-tropical, sendo encontrado em vários tipos de formações florestais (SOUZA-SANTOS et al., 2022; SANTOS et al., 2021; COSTA, 2018; PIRES et al., 2018). De maneira geral é preferencialmente encontrada em regiões litorâneas e margens dos rios. Devido à sua tolerância ao alagamento do solo, *G. americana* tem sido utilizada no reflorestamento de matas ciliares (SANTOS et al., 2021; Costa, 2018), sendo descrita como uma das 15 espécies nativas prioritárias para manejo silvicultural no bioma Mata Atlântica brasileira (SOUZA-SANTOS et al., 2022; Rolim et al., 2021).

A origem do nome dessa espécie é Tupi-guarani e significa ‘mancha escura ou fruto que serve para pintar’, devido a sua utilização em rituais indígenas, como corante corporal, mediante a ação da genipina, composto químico, que em contato com as proteínas da pele, deixam o corpo escuro por um período de tempo (BARROS, 1970).

A árvore possui altura que varia entre 7,0 a 20,0 metros, com caule reto e de formato cilíndrico (diâmetro de 40 a 60 cm, casca lisa, espessa e de coloração cinza-esverdeada), sua copa é composta com numerosos galhos com folhas concentradas no ápice dos ramos, sendo opostas, acuminadas e estreitas na base e comprimento variando entre 10 a 35 cm (BARBOSA, 2008). Suas flores são hermafroditas, campanuladas, terminais ou axilares, apresentando uma variação de cor entre brancas e amareladas, suavemente aromáticas, (PEREIRA; KINOSHITA, 2013). Enquanto aos frutos, esses são comestíveis, com sabor adocicado e consistente; baga subglobosa, de 8,0 a 10 cm de comprimento e 6,0 a 7,0 cm de diâmetro, amarelada quando madura, de casca mole, rugosa, amarelo-pardacento contendo polpa aromática e sabor cítrico, envolvendo numerosas sementes achatadas de cor creme com 1,0 cm de diâmetro, como mostrado na imagem abaixo (LORENZI; MATOS, 2004) (Figura 1).

Figura 1- Estruturas de *Genipa americana*- A:Caule, B: Folha, C:Árvore, D:Flor e Fruto, E: Semente



Fonte: Costa (2018)

Popularmente conhecida, esta espécie tem sido empregada para muitas propostas, sendo selecionada pelo programa “Plants of the Future” entre as dez plantas com maior potencial de uso imediato entre árvores frutíferas nativas (DIAS SOUZA; ALCANTARA MORAIS MENDONÇA; PESSOA DA SILVA, 2013). Pesquisas descrevem sobre seu potencial econômico, de maneira que sua madeira, por

exemplo, é amplamente utilizada na produção de cosméticos, tinturas, carvão e setor de construção naval, civil e marcenaria (SALOMÃO; PADILHA, 2006; RENHE, 2008). Vale salientar que essa espécie pode ser empregada, como fitorremediadora, devido aos componentes presentes na sua constituição, sendo aplicada na recuperação de solos contaminados (COSTA, 2018; ALMEIDA, 1993). Seus frutos são consumidos de forma *in natura*, ou em forma de sucos, licores, polpas, compotas, doces, geleias, xaropes e vinhos (SILVA; TASSARA, 2005).

3.1.1. *Genipa americana* L.: Características bioquímicas e aplicações biotecnológicas

Segundo Pinto et al., (2009) o extrato aquoso dos frutos da *G. americana*, apresentam uma diversidade de compostos voláteis, como álcoois, ésteres, ácidos e aromáticos, no qual muitos destes são responsáveis pelo aroma do jenipapo. Erban e Duarte (2010) descrevem sobre a presença de iridóides glicosídicos, tais como geniposídeo, ácido geniposídico e genipina, principalmente no fruto, enquanto na folha tem sido detectado compostos como o ácido geniposídico.

A genipina, composto químico que apresenta potencial antiangiogênico, antiinflamatório e antioxidante. Além de ser amplamente utilizados pelas indústrias de corantes (BYUNG-CHUL *et al.*, 2005; ALMOG *et al.*, 2004). Os ácidos genípico e genipínico apresentaram atividade antimicrobiana, sendo capaz de inibir o crescimento *in vitro* de algumas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, do fungo *Trichophyton mentagrophytes*, da alga *Chlorella vulgarise* e do protozoário *Tetrahymenagelleii* (TALLENT, 1964).

Pesquisas apontam sobre a utilização da *G. americana* na fitoterapia. Cordeiro e colaboradores (2014) descrevem que o jenipapo é uma planta com inúmeras aplicações, graças a contribuições do conhecimento popular, podendo ser empregado no tratamento de osteoporose, anemia, problemas estomacais, nervosismo, diabetes, colesterol, além de constituir excelente tônico no combate a indisposição, cansaço e fraqueza.

Alguns estudos apontam que o fruto da *G. americana*, é considerado afrodisíaco e sua polpa é usada contra icterícia, afecções do estômago, baço e fígado, no tratamento para tosse, contusões, luxações, depurativo, faringite, asma, purgativos e para anemia devido à quantidade de ferro existente no vegetal. É um

excelente tônico para problemas estomacais. Também é observado potencial antioxidante *in vitro* e também tem sido bastante utilizada para o tratamento de diabetes (DOS SANTOS TEXEIRA et al., 2021; BESSA et al., 2013; PORTO et al., 2010).

A casca tem sido muito utilizada como decôco e chás, e apresenta efeito diurético, antibacteriano, fungicida, além de ser usada no processo de emagrecimento (KFFURI et al., 2016). Existem relatos de que a goma extraída do tronco desta frutífera tem efeito antidiarreico e propriedades antigonorréicas (DA CONCEIÇÃO RIVANOR et al., 2014), doenças do fígado (AGRA et al., 2008) e febre (DELPRETE; SMITH; KLEINI, 2005). Alves et al., (2015) relataram a decocção da casca e das folhas da *G. americana* como depurativo do sangue.

Trabalhos descritos por Alves et al. (2017) e Souza et al. (2018) mostraram que o extrato das folhas e cascas do jenipapo têm sido utilizados na medicina popular para o tratamento de sífilis e doenças hepáticas, apresentando ainda propriedades antibacterianas, antiparasitárias, antitumorais, entre outras.

Estudo tem demonstrado que o decôco ou infusão das folhas e raiz tem sido utilizado no tratamento contra problemas renais, expelindo possíveis cálculos, além de ser útil para outros problemas ligados ao sistema urinário. (MESSIAS et al., 2015). O extrato das folhas de *G. americana* mostrou potencial antipalúdico *in vitro* contra *Plasmodium falciparum* e *in vivo* contra *Plasmodium berghei* (DEHARO et al., 2001), antiparasitários e antimicrobianos (NOGUEIRA et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2012).

Estudos descrevem que o óleo essencial obtido dessa planta possui um alto teor de compostos, com atividade farmacológica comprovada, tais como antiangiogênica, antitumoral e antioxidante, que induzem a apoptose ou a morte de células tumorais (REGALADO et al., 2021).

O extrato bruto e a fração da casca da *G. americana* foi avaliado quanto ao potencial antifúngico, sendo detectado que as amostras apresentaram atividade antifúngica frente a organismos patogênicos, *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*, apresentando um MIC de 25 e 12,5 µg/mL, respectivamente (COSTA, 2018). O extrato hidroetanólico da casca e polpa de *Genipa americana* (Jagua) apresentou potencial antibacteriano sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 (CRUZ ZUMARAN et al., 2019).

Lima et al., (2020) avaliaram a atividade inseticida do extrato da casca de *Genipa americana* e obtiveram resultados satisfatórios, sendo constatado que o extrato apresentou propriedades decompositoras que afetaram a mortalidade, fertilidade e promoveram distúrbios nutricionais em besouros vermelhos (*T. castaneum*) que o ingeriram.

Bautista Valuis e Mallma Quinteros (2020) observaram que o creme à base de extrato hidroalcoólico do fruto de *Genipa americana* L. (Huito) apresentou efeito cicatrizante em camundongos albinos, semelhantes a fármacos comercializados atualmente.

Um estudo realizado por Sousa-Santos (2022) mostrou o jenipapo como promissor no controle da praga do coqueiro, o ácaro, uma vez que o extrato metanólico das folhas apresentou vários significativos de toxicidade com LC (LC 50 = 0,60 mg/ml, LC 90 = 16,69 mg/ml). Ao realizar os ensaios fitoquímicos, os autores detectaram a presença de dois iridóides, genipina e geniposida, responsáveis por causar a mortalidade de em *A. guerreronis*.

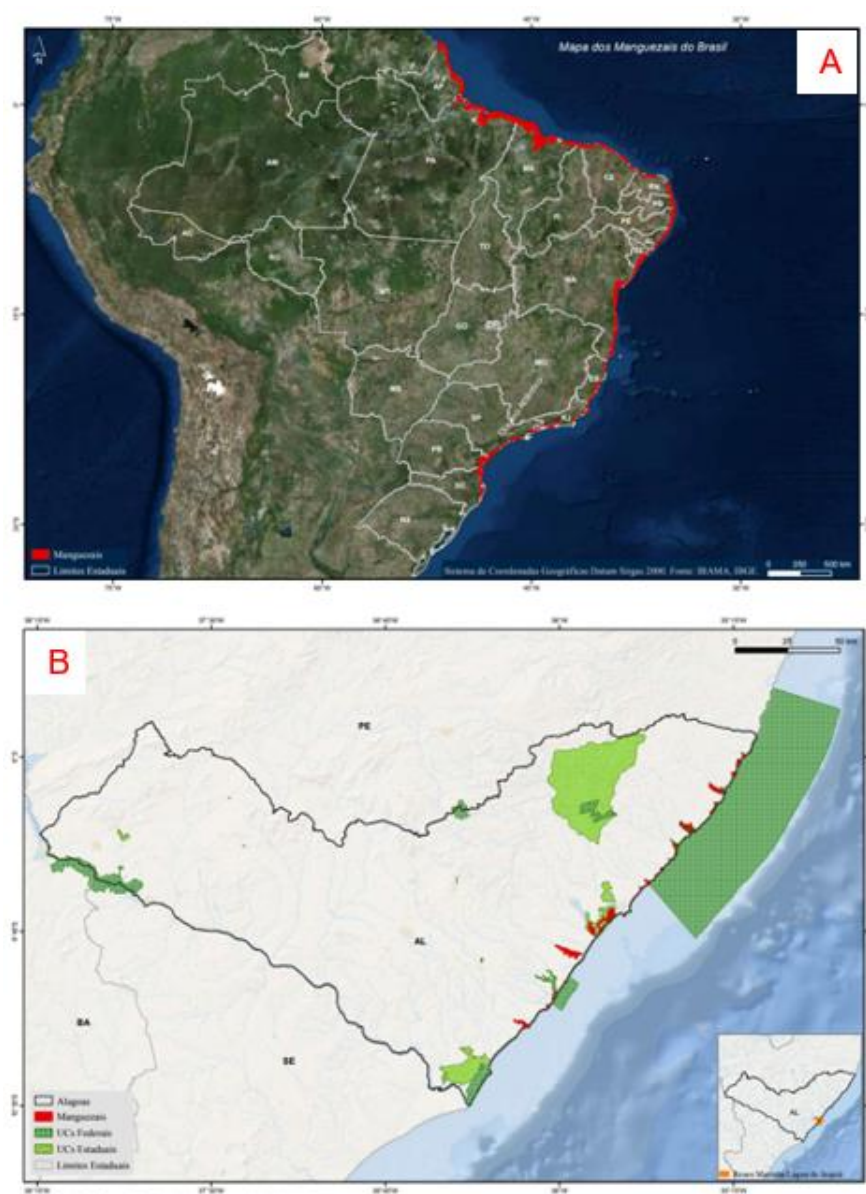
Em uma pesquisa desenvolvida por Bispo; De Almeida e Nunes (2020) foi determinado que o extrato bruto do fruto do jenipapo apresentou efeito acaricida contra o carrapato da espécie *R. microplus*. O extrato das folhas de *G. americana* mostrou atividade significativa contra as formas epimastigota, tripomastigota e amastigota de *Trypanosoma cruzi*, sugerindo morte celular por necrose com envolvimento de espécies reativas de oxigênio (DA SILVA SOUZA et al., 2018.)

3.2. Manguezal

Ecologicamente, os manguezais são ecossistemas costeiros restritos às regiões tropicais e subtropicais e ocorrem em estuários, lagunas e planícies de maré, na transição entre os ambientes terrestres e marinhos (SCHAEFFER-NOVELLI; VALE; CINTRÓN, 2015). Devido a sua localização, é reconhecido por ser habitat de diversas populações, uma vez que possui condições favoráveis para a reprodução de várias espécies de peixes, crustáceos e moluscos, sendo considerado um dos ambientes naturais mais produtivos do Brasil (BLOTTA et al., 2016; BERNINI et al., 2014), o que o configura como importantes zonas de elevada produtividade biológica, uma vez que acolhem representantes de todos os níveis tróficos da cadeia alimentar (BRASIL, 2009).

Mundialmente, esse ecossistema ocupa uma área de cerca de 137.760 km², distribuídos em 118 países e territórios, sendo que a maior área de manguezais do mundo está localizada na divisa entre o estado indiano de Bengala Ocidental e Bangladesh (GIRI et al., 2011). Os levantamentos mais recentes indicam que, no Brasil, os manguezais são encontrados em quase todo o litoral do país, abrangendo cerca de 1.398.966,1 hectares (DO BRASIL, 2018) e estende-se desde o Oiapoque (04°30'N) até a Lagoa de Santo Antônio (28°28'S) (SOARES et al., 2012) (Figura 2A). Em Alagoas, os manguezais ocorrem ao longo de todas as áreas estuarinas, ao longo dos rios, canais e junto aos corpos de água das principais lagunas costeiras (SILVA; BARROS; OLIVEIRA, 2020), com extensão territorial de 5.535,27 ha (DO BRASIL, 2018) (Figura 2B).

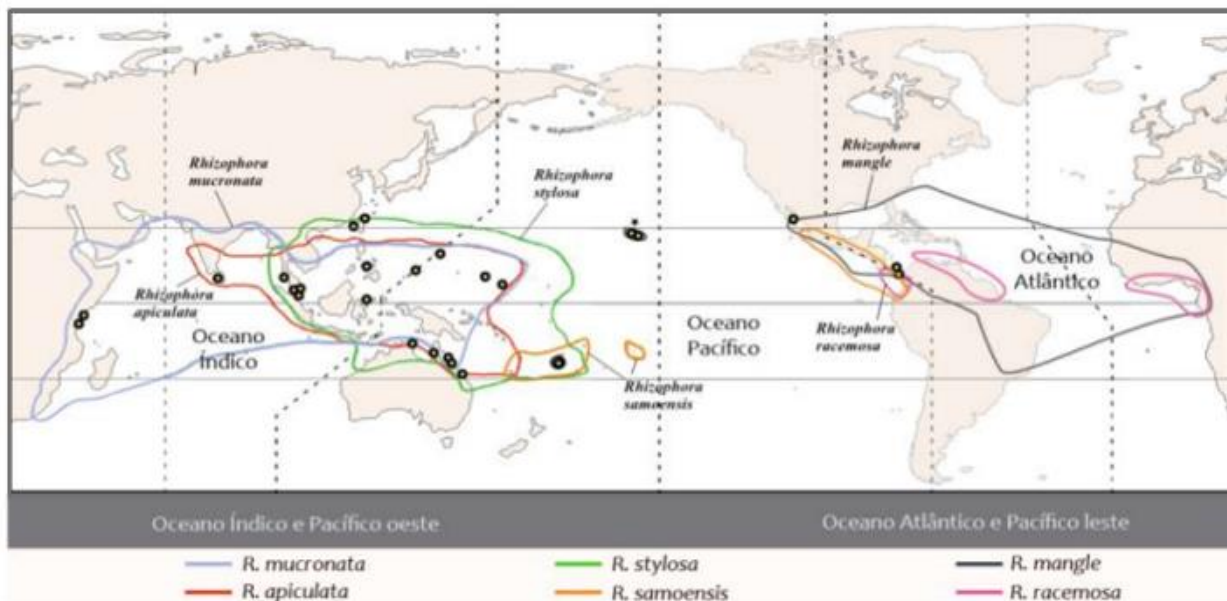
Devido as condições ambientais e relação de adaptação da flora que constitui tal ecossistema, observa-se baixa diversidade de organismos vivos, visto que muitas espécies não conseguem se adaptar às condições de maré, salinidade, substrato inconsolidado e pouco oxigenado (OLIVEIRA; TOGNELLA, 2014). Segundo relatos, globalmente, existem cerca de 70 espécies de mangues, das quais 17 são exclusivas desse habitat (BEZERRA, 2015). Os manguezais brasileiros possuem como representantes da flora arbórea apenas três gêneros (*Avicennia* L., *Laguncularia* Gaertn. e *Rhizophora* L.), distribuídos em seis espécies: *Rhizophora mangle*, *Rhizophora harrisonii*, *Rhizophora racemosa*, *Laguncularia racemosa*, *Avicennia schaueriana*, *Avicennia germinans* (DO BRASIL, 2018). Santana (2019) descreve que os manguezais brasileiros são compostos em maior quantitativo por *Rhizophora mangle* (mangue vermelho).



Fonte: DO BRASIL (2018)

É importante descrever o gênero *Rhizophora* como o gênero de mangue, não somente no Brasil, mas também mundialmente. Spalding et al., (2010) cita que seis espécies e aproximadamente o mesmo número de híbridos foram identificados, onde *R. apiculata*, *R. mucronata* e *R. stylosa* dominam os manguezais do hemisfério oriental (toda a costa banhada pelo Oceano Índico e oeste do Pacífico), enquanto *R. mangle* e *R. racemosa* dominam os manguezais do hemisfério ocidental (toda a costa banhada pelo Oceano Atlântico e leste do Pacífico) e *R. samoensis* caracteriza-se por encontra-se naturalmente nas ambas as regiões (Figura 3).

Figura 3- Distribuição global das espécies de *Rhizophora* L. (Rhizophoraceae).



Fonte: Adaptado de BEZERRA (2015).

3.3. *Rhizophora mangle* L.

Rhizophora mangle L., também conhecida como “Mangue Vermelho”, “Candapuva”, “Guaraparaíba”, “Mangue Garobeira”, “Mangue de Espeto”, “Mangue de Pendão”, “Mangue Preto”, “Mangue Sapateiro”, “Paxiubarana” e “Mangue Verdadeiro” (REGALADO et al., 2016), é uma espécie predominante dos manguezais da costa brasileira, bem como nos manguezais da costa oeste da África e do Pacífico Norte (BEZERRA, 2015).

Esta espécie possui caráter arbóreo com folhas simples e adaptações fisiológica notáveis frente aos substratos anaeróbicos típicos do habitat, denominados rizóforos, apresentam sistema de raízes escora, que suportam sua fixação no solo lamoso e sua respiração nos períodos de completa submersão, onde observa-se numerosos ramos, que surgem no caule projetando-se em várias direções do solo, bifurcando progressivamente até se fixarem. Tais características permitem que estas árvores alcancem uma altura entre 5 a 15 metros, porém existem relatos que algumas delas podem atingir até 50 m (REGALADO et al., 2016) (Figura 4). Sua melhor temperatura de crescimento varia entre 20 e 30 °C, com variações de até 8 °C, podendo suportar temperaturas mínimas de 5 °C (SILVA; BARRROS; OLIEIRA, 2020; BEZERRA, 2015).

Figura 4- Aspectos gerais de *Rhizophora mangle* L., A: Detalhe para a estrutura da floresta, B: Folhas e frutos e C: raízes.



Fonte: Adaptado de BEZERRA (2015)

3.3.1. *Rhizophora mangle* L: Características bioquímicas e aplicações biotecnológicas

Rhizophora mangle, trata-se de uma planta onde folha, caule, raízes e frutos apresentam variados usos na medicina popular, cuja preparação envolve maceração, chá ou cinzas em água. Estudos descrevem que as propriedades farmacológicas dessa espécie são oriundas aos metabolitos secundários presentes na sua composição, sendo essenciais para sua sobrevivência, visto que atuam protegendo-as dos patógenos do ambiente (PERREIRA; CARDOSO, 2012). Os compostos fenólicos descritos em trabalhos possuem indicações etnofarmacológicas e etnobotânicas, fazendo com que apresente diversas propriedades farmacológicas para esta espécie (DOS SANTOS et al., 2019).

O extrato da casca de *Rhizophora mangle* tem sido utilizado como adstringente, antisséptico, hemostático, antifúngico e antiulcerônico (ERERA; RUEDAS; GOMEZ, 2001). Sánchez et al., (1998) e Armenteros et al., (1998) descreveram que o extrato

aquoso da espécie apresenta taninos condensados ativos, apresentando propriedades antibacteriana e cicatrizantes.

Em seus estudos, Berenguer et al., (2006) e Melchor et al., (2001) descreveram que a decocção aquosa das cascas e folhas dessa espécie apresenta ampla aplicação na medicina popular para tratar doenças oculares, diarreia, lepra, distúrbios digestivos, doenças respiratórias, tuberculose, doenças venéreas e dor de garganta.

Regalo et al., (2016) e Oliveira (2018) relataram sobre polifenóis, como ácido fenólico pcumárico, ácido quínico, ácidos gálicos, elágico e clorogénico, gentisalaldeído, pelargonina, catequina e epicatequina. Estes são responsáveis por atividades biológicas encontradas na medicina popular para o tratamento de úlceras gástricas (PERERA et al., 2010; DE-FARIA et al., 2012), ação antiinflamatória (MARRERO et al., 2006), cicatrização de feridas cutâneas, antioxidante (SÁNCHEZ et al., 2006), antidiarréico (WENDEL et al., 2013) antibiótico (MELCHOR et al., 2001), como também promotor de neoangiogênese (OFORI-KWAKYE et al., 2011).

Na literatura são encontrados estudos que avaliam a incorporação do extrato de *Rhizophora mangle* em diferentes veículos de liberação de princípio ativo. Em seu trabalho, Dos Santos e colaboradores (2019) realizaram um estudo em que os extratos de *R. mangle* obtidos a partir das folhas coletadas em três regiões diferentes do mangue: franja, bacia e transição e observaram que os extratos metanólicos, nas concentrações de 25 e 50 µg/ml, reduziram significativamente a atividade de 7-etoxiresorufina -O- desetilase (EROD) em ratos, enzima da classe das CYPs, responsável pela metabolização de diversas substâncias, quando comparados ao controle.

O gel tópico da *Rhizophora mangle* foi avaliado no tratamento de feridas e queimaduras (ROGER, 2011). Em dois outros trabalhos, foram avaliados cremes com incorporação do extrato de *R. mangle* (50% e 5%) para o tratamento de feridas cutâneas e queimaduras, respectivamente (RIVERO, 2016; ARAÚJO, 2015).

O extrato da casca de *R. mangle* foi avaliado quanto a presença de taninos com propriedades antiulcerogênicas em ratos, sendo constatado que foram capazes de reduzir as lesões gástricas nesses animais (PERERA; RUEDAS; GOMEZ, 2001). Alarcon- Aguilara e colaboradores (1998), em seu estudo, verificaram que a decocção da casca se mostrou eficaz no tratamento de diabetes, testado com animais de laboratório.

A decocção das folhas apresentou atividade antifúngica contra as espécies *Candida albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* (CÁCERES et al., 1993) e antibacteriana, visto que foi capaz de inibir as bactérias associadas a feridas (MELCHOR et al., 2001). Willians e colaboradores (1999) descobriram que os triterpinóides (taraxerol e cinamioil-lupeol) extraídos da casca da Mangue Vermelho são eficazes como inseticida no controle do *Cylas formicarius*.

Além das diversas atividades biológicas relatadas sobre a espécie *Rhizophora mangle*, esta árvore também apresenta grande importância ambiental e econômica, uma vez que os mangues vermelhos servem como barreiras naturais contra erosão costeira, devido à estrutura geral da planta e do seu sistema radicular, o estabelecimento dessa espécie (OSORIO et al., 2019), reduz a turbidez das águas costeiras, através do aprisionamento de sedimentos que são transportados pelos rios (BEZERRA, 2015), também apresentam importância por serem habitat e berçário para diversas espécies de aves e peixes, agem como espécies sequestradoras de carbono e são fonte de detritos e materiais orgânicos, que serão levados para os ecossistemas vizinhos (DE YOE et al., 2020).

A casca e madeira são listados como recursos naturais valiosos para as indústrias. Os taninos presentes na casca são utilizados na fabricação de corantes, usados no curtimento do couro, enquanto a casca é usada pelas indústrias de construção na fabricação de postes, estacas e dormentes (DE YOE et al., 2020; SATYANARAYNA et al., 2012; BLANCHARD; PRADO, 1995).

3.4. Própolis

A própolis é um produto que tem chamado a atenção dos pesquisadores. Seu nome vem do grego, onde '*pro*' significa para ou em defesa e '*polis*' significa cidade, emblemático a defesa da cidade, que neste caso seria a sociedade da colmeia (AGUIAR, 2015). Para tanto é utilizada pelas abelhas para proteger seu habitat, reparar frestas e embalsamar insetos invasores ou mortos e manter o ambiente asséptico. (SANTOS, 2020). Posteriormente a palavra foi empregada por Plínio em latim para nomear a resina coletada pelas abelhas de várias partes de plantas, como brotos, exsudatos, galhos e folhas, e em vegetais e misturada com enzimas salivares (β -glicosidase) que é usada para selar buracos nos favos de mel e alisar as paredes internas (REIS et al., 2021; DE MARCO et al. 2017; DA SILVA et al. 2018).

Ela é considerada uma mistura complexa formada por um material resinoso e balsâmico de origem vegetal, coletada pelas abelhas a partir do exsudato de diferentes partes das plantas, como ramos, flores, pólen, brotos e exsudatos, que ao serem levadas para a colmeia, são modificadas pela ação de enzimas salivares (RODRIGUES, 2020; SANTOS, 2020; PETER et al., 2017).

Sua utilização vem ocorrendo sistematicamente na medicina popular, durante séculos, pela humanidade, podendo citar exemplo os povos egípcios, que a utilizavam para embalsamar os mortos no processo de mumificação, a fim de retardar a decomposição natural dos corpos, já os gregos e romanos costumavam fazer uso como antisséptico e cicatrizante de ferimentos (PEREIRA; SEIXAS; AQUINO NETO, 2002; BANKOVA et al. 2000; MARCUCCI, 1996). Porém, somente no século XVI, o termo própolis foi utilizado pela primeira vez no que se refere a questões científicas, mais precisamente na França, quando a farmacopeia de Londres, a citou como uma droga oficial. (PINTO; PRADO; CARVALHO, 2011) e em 1950 e 1960, a própolis passou a ser reconhecida no meio medicinal, como forma de tratamento para problemas de saúde pública (AGUIAR, 2015).

No Brasil o interesse pela própolis ocorreu, inicialmente, na década 80, quando Ernesto Ulrich Breyer, conseguiu demonstrar as suas propriedades terapêuticas e utilização como antibiótico natural, registradas em seu livro, “Abelhas e saúde” (LUSTOSA et al., 2008). Martinez e Soares (2012) descreve que atualmente o país é listado, mundialmente, como um dos maiores produtores de própolis, em decorrência das condições climáticas favoráveis, assim como a expressiva diversidade da flora.

O território brasileiro apresenta uma variedade de tipos de própolis, das quais incluem-se própolis verde, marrom, preta, amarela, vermelha e a geoprópolis, que se diferenciam pela cor, odor e consistência (RODRIGUES, 2020). Dessas diferenças estão associadas a origem botânica e a espécie de abelha produtora (LUZ; FRAGA, 2016).

Sua composição tende a variar de acordo com a fonte de extração, porém de modo geral é composto de 50% de resina e bálsamo vegetal, 30% de ceras, 10% de óleo essencial e aromático, 5% de grãos de pólen e 5% de várias outras substâncias, incluindo restos orgânicos (REIS et al., 2021). É sabido que as atividades biológicas da própolis são atribuídas aos compostos químicos presentes na sua constituição, destacando-se os ácidos fenólicos, flavonoides, terpenos e sesquiterpenos (SENA-

LOPES et al., 2018; ANDRADE et al., 2017; AWALE et al., 2008), oriundos de plantas que agem em diferentes processos fisiológicos e são os principais responsáveis pelo seu efeito benéfico.

Diversos estudos têm relatado sobre as atividades biológicas do extrato da própolis, tais como atividades antioxidantes (DEVEQUI-NUNES et al., 2018; RIGHI et al., 2011; ALENCAR et al., 2007), antimicrobiana (DEVEQUI-NUNES et al., 2018; NETO et al., 2017; GRAIKOU et al., 2016), anti-inflamatórias (CAVENDISH et al., 2015; BUENO-SILVA et al., 2013), anticâncer (CAVENDISH et al., 2015; BUENO-SILVA et al., 2013) e anti-nociceptiva (CAVENDISH et al., 2015).

Ao longo do tempo, foram descobertos e catalogados 12 tipos diferentes de própolis, de acordo com as propriedades físico-químicas (cor, textura, composição química) (PINTO et al., 2011). Recentemente foi descoberto um novo tipo de própolis (tipo 13), denominado como própolis vermelha devido a sua coloração intensa (MELO et al., 2022). A Tabela 1 descreve a classificação das própolis encontradas nas regiões brasileiras seguindo os critérios de grupo, cor, região de origem e origem botânica.

Tabela 1- Classificação da própolis brasileira.

GRUPOS	COR	REGIÃO ORIGEM	BOTÂNICA GRUPO
Grupo 01	Amarelo	Sul (RS)	<i>Myrceugenia eurosma</i> (Myrtaceae)
Grupo 02	Castanho claro	Sul (RS)	<i>Myrceugenia eurosma</i> (Myrtaceae)
Grupo 03	Castanho escuro	Sul (PR)	<i>Myrceugenia eurosma</i> (Myrtaceae)
Grupo 04	Castanho claro	Sul (PR)	<i>Myrceugenia eurosma</i> (Myrtaceae)
Grupo 05	Marrom esverdeado	Sul (PR)	<i>Choupos</i> (<i>Populus</i> sp.)
Grupo 06	Marrom avermelhado	Nordeste (BA)	<i>Resina de folhas jovens de Hyptis divaricata</i>
Grupo 07	Marrom esverdeado	Nordeste (BA)	Não identificada
Grupo 08	Castanho escuro	Nordeste (PE)	Não identificada
Grupo 09	Amarelo	Nordeste (PE)	Não identificada
Grupo 10	Amarelo escuro	Nordeste (CE)	Não identificada
Grupo 11	Amarelo	Nordeste (PI)	Não identificada
Grupo 12	Verde ou Marrom esverdeado	Sudeste (SP)	<i>Resina de folhas jovens da Baccharis dracunculifolia</i>
Grupo 13	Vermelha	Nordeste (AL)	<i>Exudato seroso do caule da Dalbergia ecastophyllum</i>

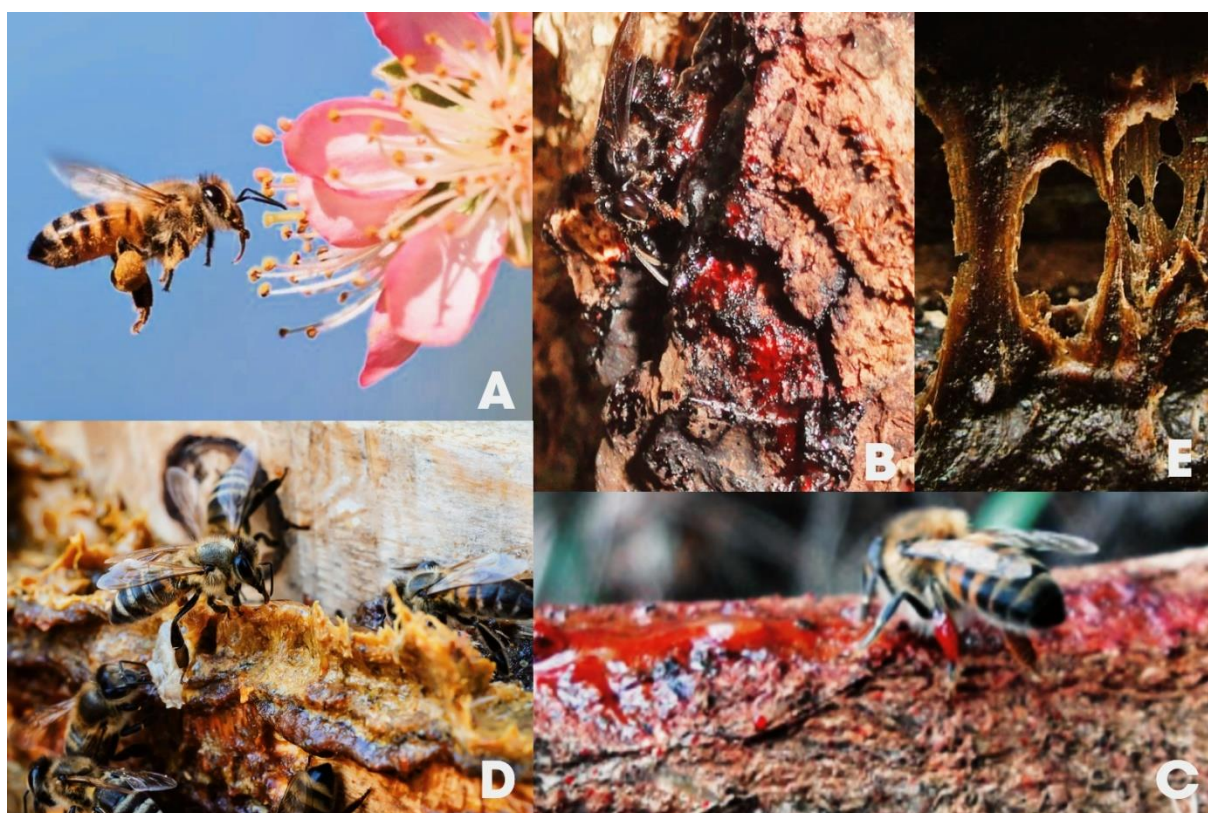
Fonte: Adaptado de ALBUQUERQUE; TONHOLO (2021)

3.4.1. Própolis Vermelha de Alagoas: Características Bioquímicas e Atividades Biotecnológicas

A própolis vermelha de Alagoas (PVA) é produzida pelas abelhas da espécie *Apis malífera* e sua principal origem botânica é a *Dalbergia ecastophyllum* (L) Taub.

(*Fabaceae*), conhecida popularmente como rabo-de-bugio ou marmelo-do-mangue (RUFATTO et al., 2017) (Figura 5). Albuquerque e Tonholo (2021) descrevem que esta família vegetal é amplamente estudada devido a suas características químicas e farmacológicas. O gênero *Dalbergia* é originário da África e possui cerca de 500 espécies, onde dessas foram detectadas no território brasileiro. As abelhas *A. melífera* transformam o exsudado que apresenta coloração avermelhada, presentes nos galhos brocados naturalmente da planta rabo-de-bugio, em uma mistura de coloração e odor característico, denominada como Própolis vermelha (RIGHI, 2011).

Figura 5- *Dalbergia ecastophyllum*, Inflorescência multiflora (A); *Apis melífera* coletando exsudato (B) e (C); *Apis melífera* tampando as frestas da colmeia (D); Própolis (E).



Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

PVA é classificada como o 13º tipo de própolis, e apresenta um alto percentual de compostos fenólicos como: isoflavonas, chalconas, isoflavonas, pterocarpanos, terpenos, benzofenonas polipreniladas (*guttiferonas*), taninos condensados, e outros, característica notável que a diferencia dos demais tipos de própolis (NASCIMENTO et al, 2018).

A própolis vermelha de Alagoas é encontrada na região de manguezais do estado de Alagoas, localizados na região litorânea e lagunar do estado e banhado pelo Oceano Atlântico (SANTOS, 2020). As condições climáticas e vegetação encontradas nesses locais favorecem o desenvolvimento das características que a diferencia dos demais tipos de própolis, permitindo que o estado seja o único produtor mundial (ALBUQUERQUE; TONHOLO, 2021).

A própolis vermelha de Alagoas *in natura*, apresenta as seguintes características: coloração avermelhada, sabor balsâmico, aroma anis-adocicado, é insolúvel em água e parcialmente solúvel em acetona, álcool, amoníaco, clorofórmio, éter, benzeno e tricloroetileno, é rígida em temperatura abaixo dos 20°C, e consistente maleável entre 20 a 40°C (ALBUQUERQUE; TONHOLO, 2021; SILVA; BALTAZAR; ALMEIDA, 2015).

A composição química e atividade biológica da própolis vermelha vem sendo estudada desde a década de 90 e observa-se que estas variam de acordo com algumas condições como, origem da espécie vegetal *Dalbergia ecastophyllum* dos manguezais alagoanos em conjunto com o trabalho desenvolvido pela *Apis melífera*, assim como a época de coleta e condições climáticas da região (REIS et al., 2021; ALBUQUERQUE; TONHOLO, 2021). Atualmente, a própolis vermelha é listada como o segundo tipo de própolis brasileiro mais produzido e comercializado, sendo produzido principalmente no litoral do estado de Alagoas, região nordeste brasileira (SALATINO; SALATINO, 2018).

Visando obter sua proteção e restringir sua exclusividade as áreas litorâneas, próximos a complexos estuarinos lagunares e manguezais no estado de Alagoas, a PVA obteve indicação geográfica em 17/07/2012 e está registrada sob número IG201101, como mostrado na tabela 2 (SANTOS, 2020).

Tabela 2- Indicação geográfica da Própolis vermelha de Alagoas.

	DADOS TÉCNICOS
Número	IG201101
Nome Geográfico	Manguezais de Alagoas
UF	Alagoas
Requerente	União dos Produtores de Própolis Vermelha do Estado de Alagoas
Produto	Própolis vermelha e extrato de própolis vermelha
Data do Registro	17/07/2012
Delimitação	A área geográfica localiza-se nos municípios do litoral e complexo estuarino lagunar, no estado de Alagoas

Fonte: Adaptada de SANTOS (2020).

Pesquisas mostraram que a própolis vermelha de Alagoas apresenta elevadas quantidades de isoflavonas, que atuam em sinergismo com os demais compostos. A formononetina é listada como a principal isoflavona presente nas amostras de própolis vermelha (NEVES et al., 2016; RIBEIRO et al., 2015). Vestitol, neovestitol, biochanina A e liquiritigenina, compostos também encontrados na própolis vermelha também mostraram diversos efeitos biológicos (LIMA et al., 2022; ALDANA-MEJÍA et al., 2021; SILVA et al., 2020; REIS et al., 2019).

Atualmente são observados diversos trabalho na literatura que expressam sobre as atividades biológicas apresentadas por tal espécie, tais como capacidade antimicrobiana, antiviral, anti-inflamatória, antiulcerativa e antitumoral (NETO et al., 2017; MACHADO et al., 2016; FROZZA et al., 2013; BUENO-SILVA et al., 2013; OLDONI et al., 2011). Em um trabalho realizado por Dantas Silva et al. (2017) foi detectado capacidade antioxidante e antiparasitária e Teles e colaboradores (2015), demonstraram ainda que a própolis vermelha apresentou potencial de atenuação da hipertensão e do dano renal.

A atividade antimicrobiana da própolis vermelha foi estudada por Alencar et al. (2007), sendo observado que esta pode atuar significativamente contra fungos, bactérias e protozoários, uma vez que, quando testada, a fração de clorofórmio mostrou-se ativa contra as *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) e *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) com ativa concentração inibitória mínima (CIM) equivalente a 25–50 µg/mL. Resultados semelhantes foram encontrados por Oldoni et al. (2011), que mostrou que a fração de clorofórmio se mostrou ativa contra *S. aureus* (CIM = 31,2–62,5 µg/mL), *S. mutans* e *A. naeslundii* (CIM = 62,5–125 µg/mL).

Silva et al. (2012) verificaram que o extrato etanólico apresentou elevada atividade antimicrobiana em um percentual de 100% de ativação contra cepas Gram-positivas e 62,5% Gram-negativas, de maneira que o autor afirma que as espécies analisadas: *Shigella flexneri*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *S. aureus*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, foram suscetíveis à fração acetato de etila que demonstrou a melhor atividade.

Em suas pesquisas, Neves et al. (2016) verificaram a atividade antimicrobiana da própolis vermelha brasileira contra as bactérias e leveduras: *S. aureus* ATCC 13150, *S. aureus* ATCC 25923, *S. epidermidis* ATCC 12228, *P. aeruginosa* ATCC 9027, *P. aeruginosa* ATCC P-12, *P. aeruginosa* ATCC P-03, *C. albicans* ATCC

76645, *C. albicans* LM P-20, *Candida tropicalis* ATCC 13803, *Candida tropicalis* LM 6, *Cryptococcus neoformans* ICB 59, *Cryptococcus neoformans* LM 2601, onde detectaram que as frações de hexano, acetato e metanol de própolis utilizadas inibiram todas as cepas testadas, com valores de MIC = 128–512 µg/mL para as bactérias e MIC = 32–1024 µg/mL para as leveduras.

Sabe-se que muitas características biológicas da própolis são direcionadas para a atuação das moléculas vestitol e neovestitol, porém outras moléculas isoladas também foram testadas quanto à sua atividade antibacteriana. Em uma pesquisa foi determinado que o composto (6aS,11aS)-medicarpina exibiu atividade antibacteriana potente contra *S. aureus*, *Bacillus subtilis* e *P. aeruginosa*, com valores de CIM de 16, 32 e 32 µg/mL, respectivamente (INUI et al., 2014).

A atividade antifúngica também é descrita na literatura. Bezerra e colaboradores (2015) demonstraram em seu estudo a ação antifúngica do extrato de própolis vermelha a 25% contra *Candida*, fungo relacionado com o desenvolvimento da candidíase oral. Em outro estudo, o extrato alcoólico da própolis apresentou atividade antifúngica contra *T. rubrum* (8–128 µg/mL), *Trichophyton tonsurans* (32–128 µg/mL) e *Trichophyton mentagrophytes* (16–128 µg/mL), fungos responsáveis pelo desenvolvimento das infecções na pele, unhas e cabelos.

O aumento dos níveis de radicais livres, no organismo, é considerado um problema de saúde, visto que estes tendem a desencadear uma série de patologias, incluindo doenças cardíacas, neurológicas, osteoporose, inflamações, diabetes, neoplasias malignas, dentre outras (DEVASAGAYAM et al., 2004). Estudos tem demonstrado que a própolis vermelha apresenta potencial antioxidante, gerado por meio dos compostos químicos presentes na sua constituição (MARQUELE et al., 2005).

Silva et al. (2018) analisaram atividade antioxidante da própolis vermelha de Alagoas e determinaram que o extrato apresentou atividade antioxidante constatado pela presença de manchas amarelas no fundo roxo, e confirmada pelo método quantitativo as concentrações de DPPH avaliadas de extrato etanólico, apresentando valor de EC 50 de 3,97 µg/mL pelo método DPPH. Também foi determinado que o extrato foi capaz de sequestrar peróxido de hidrogênio em um percentual acima de 86% em concentrações de 5-100 µg/mL.

Cabral et al. (2011) avaliaram a atividade antioxidante da própolis vermelha, através da fração hexânica e constataram elevada atividade antioxidante (74,4%), sequestrando o radical livre DPPH. O extrato hidroalcoólico de própolis vermelha também apresentou bons resultados de capacidade de eliminação de DPPH (IC 50270,13 µg/mL) (DA SILVA FROZZA et al., 2013). Righi et al. (2011) descreveu, em seus estudos que o extrato metanólico da própolis vermelha apresentou atividade sequestradora de DPPH, com resultados de 39,12% na concentração de 25 µg/mL.

Na literatura também é observado estudos que avaliaram a atividade anti-inflamatória da própolis vermelha. Bueno-Silva et al. (2013) ao estudarem a capacidade anti-inflamatório do extrato etanólico de própolis vermelha, neovestitol e vestitol (10 mg/kg) em camundongos Balb/c machos, verificaram elevada atividade de inibição contra a migração de neutrófilos.

Outro estudo buscou entender o mecanismo de ação do vestitol na modulação da migração de neutrófilos no processo inflamatório, onde verificou-se que esse composto foi capaz de reduzir a migração de neutrófilos induzida por LPS ou mBSA e a liberação in vivo de CXCL1/KC e CXCL2/MIP-2, nas concentrações de 1, 3 ou 10 mg/kg e os níveis in vitro de CXCL1/KC e CXCL2/MIP-2 em sobrenadantes de macrófagos (1, 3 ou 10 µM) (FRANCHIN et al., 2016). Cavendish et al., (2015), ao realizar pré-tratamento com o extrato hidroalcoólico de própolis vermelha (10 e 30 mg/kg) e formononetina (10 mg/kg) detectou que este foi capaz de reduzir o número de contorções abdominais, inibindo a migração de leucócitos induzida por carragenina. Além disso, as concentrações de extrato testadas (3, 10 e 30 mg/kg) foram capazes de inibir a fase tardia (dor inflamatória) da lambertura induzida pela formalina.

A própolis vermelha também tem sido estudada quanto ao seu potencial anticancerígeno, como determinado por Begnini e colaboradores (2014), que observaram que extrato etanólico de própolis vermelha apresentou citotoxicidade contra células cancerígenas de bexiga humana (IC 50 de 95 µg/mL) e induziu mecanismos semelhantes a apoptose. Silva et al. (2018) perceberam que o extrato da própolis apresentou elevado percentual de inibição contra as linhagens celulares de tumor ovariano (OVCAR-8), glioblastoma (SF-295) e carcinoma de cólon humano (HCT116). Em outro estudo, Dantas Silva et al. (2017) demonstrou que as células tumorais do cólon (HCT-116) eram menos sensíveis aos extratos de própolis (IC50

variando de 14,40 a 41,59 µg/mL e que as amostras R02Et.B2 e R01Et.B2 exibiram efeitos citotóxicos contra linhagem tumoral de glioblastoma (SF-295) com valores de IC 50 de 11,22±16,65 µg/mL e 15,10±22,59 µg/mL, respectivamente.

Novak et al. (2014) perceberam que a fração BRP-IV foi capaz de inibir o crescimento de linhagens de células tumorais com IC 50 = (20,5 ± 2,4) a (32,6 ± 2,6) µg/mL, como xenoenxertos de tumor de melanoma em camundongos, leucemia promielocítica aguda (HL-60), leucemia mielóide crônica humana (K562), mieloma múltiplo humano (RPMI 8226) e melanoma murino (B16F10), enquanto o extrato etanólico induziu efeito citotóxico com IC 50 de (29,7 ± 1,5) a (42,1 ± 8,7) µg/mL.

O extrato hidroalcólico da própolis vermelha, quando testado nas concentrações de 50 e 100 mg/kg, foi capaz de inibir o crescimento de carcinoma espinocelular oral induzido por DMBA, além de também promoveu um atraso de 3 semanas no desenvolvimento de tumores clinicamente detectáveis em modelos murinos (camundongos machos suíços adultos, *Mus musculus*) (RIBEIRO et al., 2015).

3.5. Lectinas

3.5.1. Histórico, definição e propriedades gerais

As proteínas são biomoléculas essenciais para a origem, desenvolvimento e manutenção de todos os seres vivos, pois desempenham imprescindíveis funções biológicas, como enzimática, anticorpos, hormonal, transporte de gases, imunológica, antimicrobianas, antitumorais, anticoagulantes dentre outras. É sabido que algumas classes de proteínas apresentam imensa e diversificada aplicabilidade biológica, como as lectinas, proteínas de origem não imunológica e que apresenta, dentre suas infindas característica, especificidade de ligação por carboidratos e/ou glicoconjugados.

O estudo das lectinas começou há mais de 130 anos com a identificação, por Peter Hermann Stillmark em 1888, de uma proteína altamente tóxica presente nas sementes da mamona (*Ricinus communis* L.), que foi capaz de aglutinar células sanguíneas de pombo. Pouco tempo depois, H. Hellin demonstrou haver uma substância em sementes de jequiriti (*Abrus precatorius*) com essa mesma ação aglutinante e também tóxica, e a batizou como abrina (VASCONCELOS, 2010; TSANEVA; VAN DAMME, 2020).

Em 1898, Elfstrand sugeriu o termo hemaglutinina para denominar as proteínas até então descobertas, ricina e abrina, pelo fato de exercerem atividade hemaglutinante. Paul Ehrlich aproveitou as descobertas de ricina e abrina para realizar estudos imunológicos e propôs os princípios fundamentais da imunologia, em 1891. Em 1902, Karl Landsteiner observou que as atividades hemaglutinantes de vários extratos de sementes variavam quando testadas com eritrócitos de diferentes animais.

Em 1952, Walkins e Morgan evidenciaram que esta propriedade justificava-se pela especificidade de ligação entre lectina e carboidrato. Até meados do século XX, a denominação hemaglutinina ainda era utilizada (ARAÚJO, 2011), bem como a designação fitoaglutininas, para aquelas proteínas identificadas em vegetais (BARBOSA, 2013). Essa descoberta fascinou William C. Boyd, que, em 1954, testou sementes do feijão-de-lima (*Phaseolus lunatus*) para averiguar a especificidade de grupos sanguíneos. No sangue tipo A houve aglutinação, mas não houve no B e no O (MISHRA et al., 2019).

Em 1919 uma hemaglutinina pura foi obtida pela primeira vez por James B. Sumner, a partir do feijão-de-jaca (*Canavalia ensiformis*), sendo denominada como concanavalina A (ConA). Mas somente depois de duas décadas, Sumner e Howell descreveram a atividade hemaglutinante dessa proteína contra eritrócitos e leveduras. Além disso, constataram também que essa atividade foi inibida pela sacarose e sugeriram que a hemaglutinação causada pela conA seria o resultado de uma reação desta com carboidratos da superfície celular dos eritrócitos (SHARON e LIS, 2004).

Durante a Segunda Guerra Mundial, houve um grande interesse com relação à tipagem sanguínea pela necessidade de transfusão de sangue, o que resultou na identificação de várias lectinas específicas para vários tipos de sangue (OLIVEIRA, 2017). A partir dessa especificidade e da diferenciação supracitada, Boyd e Elizabeth Shapleih sugeriram, em 1954, que as fitoaglutininas fossem denominadas lectinas, visto que seu significado etimológico é escolher ou selecionar (BARBOSA, 2013; OLIVEIRA, 2018).

Sharon e Lis, em 1972, listaram as lectinas de plantas isoladas e caracterizadas até o momento, e frente a uma extensa aplicabilidade dessas proteínas, passou-se a utilizar o termo “lectinologia”, expressão introduzida por Potapov para referir-se ao estudo e à pesquisa sobre lectinas (CASTANHEIRA, 2011). A partir disso, o termo

passou a ser usado para todas as proteínas com potencial de aglutinar células ou precipitar polissacarídeos e glicoproteínas (BARBOSA, 2013).

Considerando estes estudos pioneiros e suas divulgações, surgiram diversos outros trabalhos envolvendo lectinas vegetais. Uma descoberta marcante foi realizada por Peter Nowell, em 1960, o qual relatou a atividade mitogênica da lectina do feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*), fato que contribuiu ainda mais para os avanços de pesquisa no campo da imunologia (SANTOS, 2018).

Três anos depois ocorreu a publicação do primeiro trabalho sobre lectinas e câncer, por Joseph C. Aub, onde foi demonstrado que extratos de *Triticum vulgare* (trigo) inibiram o crescimento tumoral pela aglutinação das células cancerígenas (CASTELÃO, 2017). Isso fez com que cientistas relacionassem as mudanças na membrana plasmática e a tendência de aglutinação pelas lectinas com o desenvolvimento das células cancerígenas (BARBOSA, 2014).

De 1970 até os dias atuais, houve um avanço significativo no que se refere ao conhecimento da estrutura e das aplicações de lectinas, principalmente devido ao surgimento e evolução dos métodos utilizados na purificação e caracterização de proteínas. A publicação de trabalhos nessa área contribui bastante para difundir as propriedades exclusivas dessas proteínas, além de provocar o interesse em explorar novos organismos (COSTA, 2018).

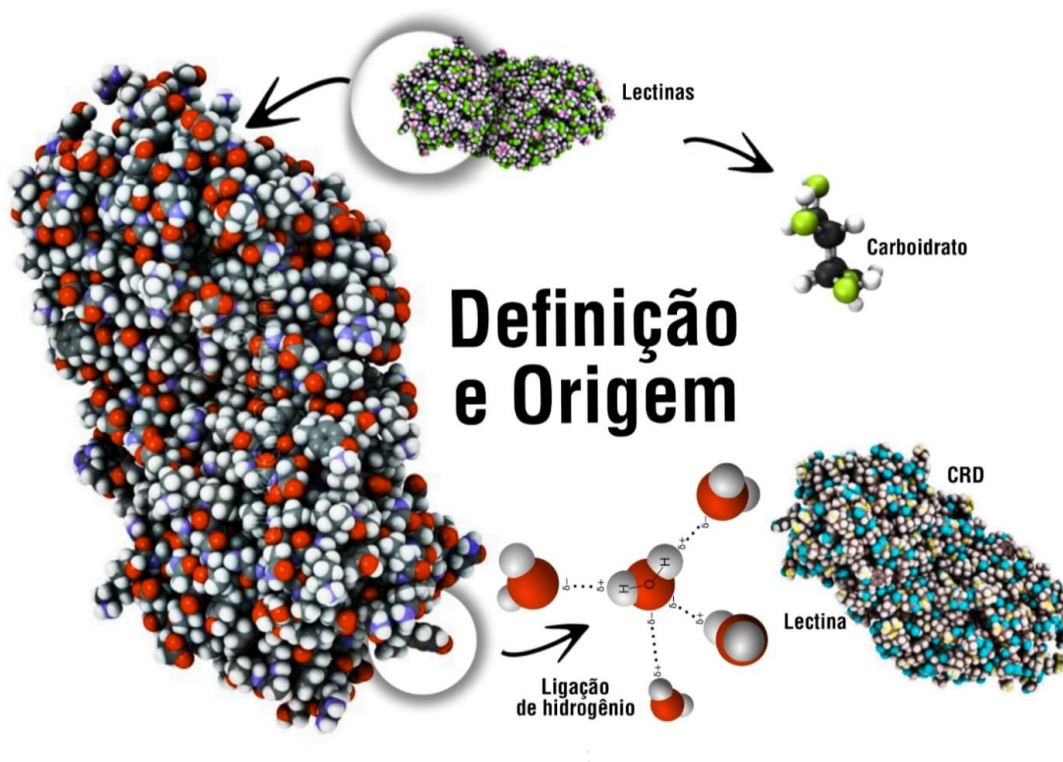
Pinto-Júnior (2019) afirma que a partir de 1980 a disponibilidade de lectinas puras permitiu o estudo não só das propriedades físico-químicas, mas também da particularidade de suas atividades biológicas. O progresso tecnológico e os avanços da bioquímica, biologia molecular e informática possibilitaram determinar a estrutura proteica, a especificidade de ligação a carboidratos e o sequenciamento dos aminoácidos.

A definição feita por Goldstein e colaboradores, em 1980, com base na especificidade de ligação a açúcares e na inibição da atividade hemaglutinante (AH), lectinas são proteínas ou glicoproteínas, de origem não imune, que aglutinam células e precipitam glicoconjugados. Em 1981, Kocourek e Horejsi propuseram que lectinas são proteínas ou glicoproteínas, de natureza não imune, que se ligam a carboidratos, mas não atuam como enzimas e não necessitam de grupos hidroxila para efetivar a ligação (VASCONCELOS, 2010).

Sobre a origem não imunológica das lectinas, Gomes (2013) explica a necessidade de destacar a diferença entre essas proteínas e os anticorpos que aglutinam células. Enquanto estes são produtos de uma resposta imune e são pouco variáveis estruturalmente entre si, aquelas são produzidas inclusive por organismos que não apresentam sistema imune e podem distinguir-se bastante quanto aos constituintes primários, necessidade de metais, massa molecular, estrutura tridimensional e a presença de glicídios em sua estrutura.

A definição mais aceita e utilizada no campo científico atual foi criada por Peumans e Van Damme, em 1995, e estabelece que lectinas sejam proteínas ou glicoproteínas de origem não imune com capacidade de se ligar específica e reversivelmente a carboidratos, possuindo pelo menos um domínio não catalítico (domínio de reconhecimento a carboidratos – DRC) (Figura 6). Este domínio de reconhecimento a carboidratos, pertencente à estrutura polipeptídica, é o local onde ocorre a ligação das lectinas com os carboidratos sem alterar a estrutura destes, sendo esta a característica mais importante das lectinas (TSANEVA e VAN DAMME, 2020).

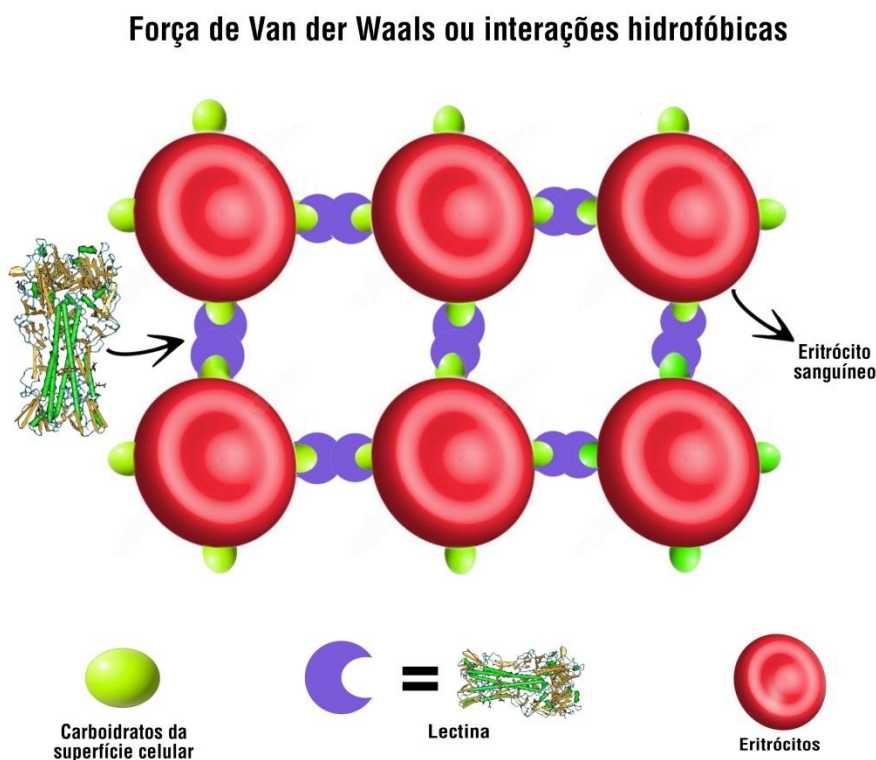
Figura 6- Representação da ligação das lectinas com os carboidratos e seu DRC



Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

A particularidade desta interação pode ser comparada com a que ocorre entre enzima e substrato e ou entre antígeno e anticorpo (SILVA, 2018). Há uma relação direta entre o mecanismo de ligação e à especificidade existente em todas as lectinas: diferentes DCR resultam em diferentes especificidades ao carboidrato. E tudo isso se associa com as bioatividades que essas proteínas apresentam (CASTELÃO, 2017). As forças estabilizadoras das ligações reversíveis entre lectina e açúcar são as interações hidrofóbicas, forças de van der Waals e ligações de hidrogênio (PAIVA et al., 2010) (Figura 7).

Figura 7- As forças estabilizadoras das ligações reversíveis entre lectina e carboidratos.



Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

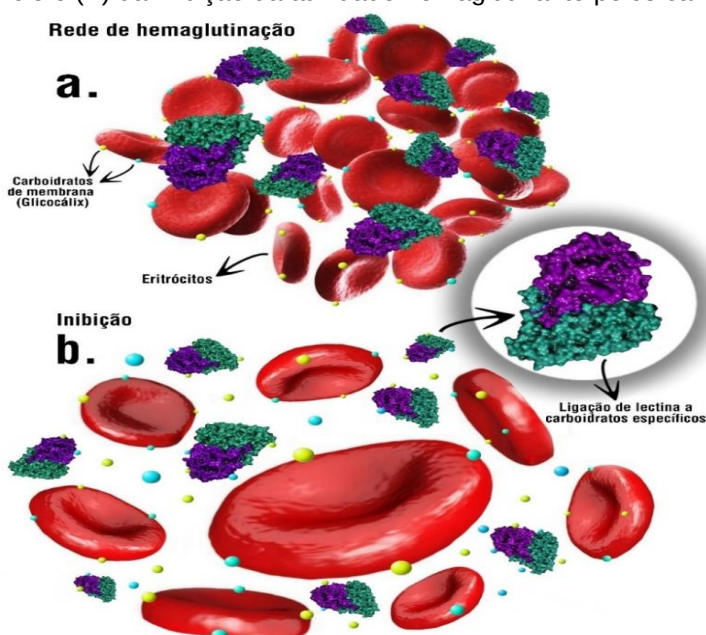
Para denominar lectinas de forma a facilitar sua citação, geralmente se adota um padrão de nomenclatura, comumente utilizado na literatura por uma sigla derivada do nome científico das espécies das quais foram purificadas (BARBOSA, 2014). Por exemplo, Silva et al. (2016) purificaram uma lectina a partir da raiz de *Portulaca elatior*, a qual foi designada por PeRoL: Pe - *Portulaca elatior*, Ro – root, L – lectin. Silva (2017) isolou uma lectina da folha de *Schinus terebinthifolius* (aroeia da praia), que ficou conhecida como SteLL: Ste - *Schinus terebinthifolius*, L – Leaf ou folha, L – lectin

ou lectina. Costa (2018) isolou uma lectina da casca de *Genipa americana* L. (Jenipapo), denominada GaBL: Ga – *Genipa americana*, B – Bark ou Casca, L – lectin ou lectina.

A técnica conhecida como hemaglutinação permite identificar facilmente lectinas em uma amostra. (Figura 8A). A amostra é diluída de forma seriada e, em seguida, incubada com eritrócitos (humanos ou animais), que podem ser tratados enzimaticamente (melhorando a sensibilidade das células à lectina) ou quimicamente (para fixar os eritrócitos e conservar por mais tempo) (SILVA, 2015). A atividade hemaglutinante (AH) corresponde ao inverso da maior diluição em que se observa a hemaglutinação (GOMES, 2013).

Com o objetivo de confirmar se a atividade hemaglutinante foi promovida por uma lectina, se faz necessário novos testes, como o de inibição da atividade hemaglutinante (Figura 8B), onde a amostra também é diluída em série em uma solução de carboidratos ou glicoproteínas livres, para posterior adição dos eritrócitos. Assim, os DRC das lectinas poderão ser ocupados por essas moléculas livres em solução, o que impede a interação com os açúcares da superfície celular e resulta na precipitação dos eritrócitos. Esse ensaio também permite determinar qual carboidrato é específico para a lectina, sendo este o que mais inibe a AH (SILVA, 2015).

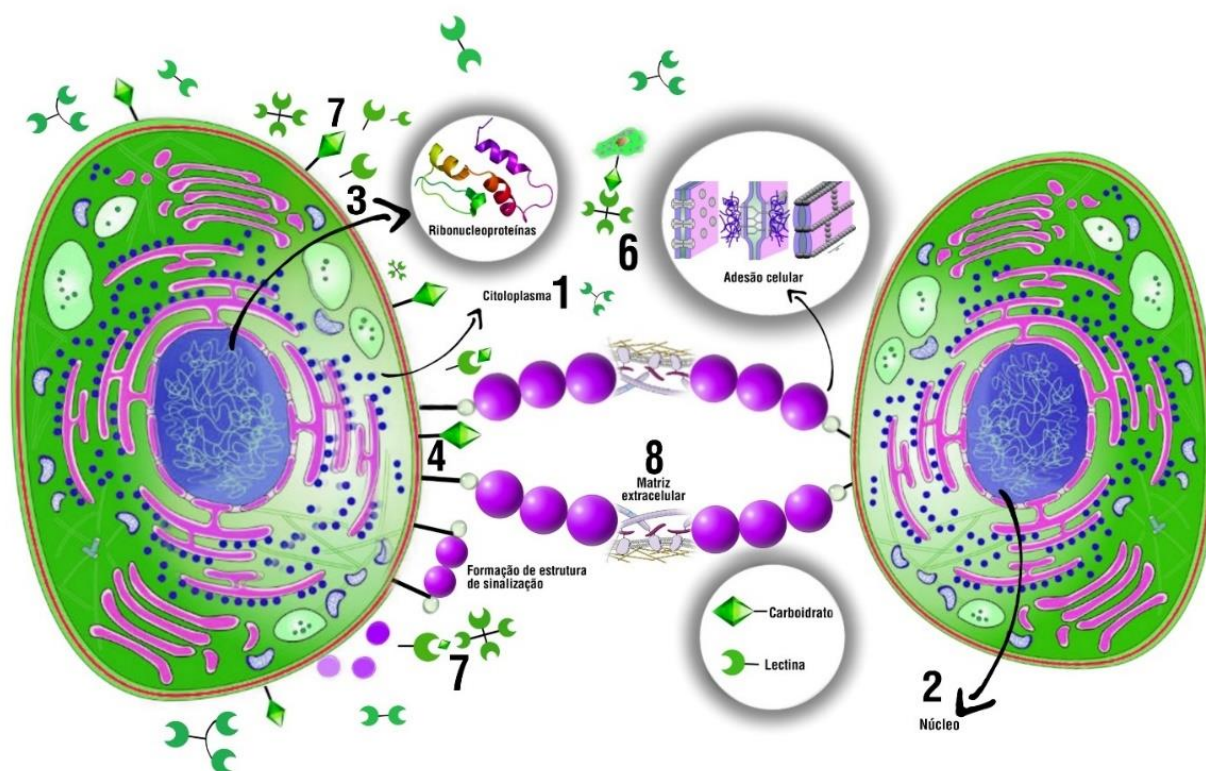
Figura 8- Representação esquemática (A) da rede de eritrócitos promovida pela ligação da lectina aos carboidratos de superfície e (B) da inibição da atividade hemaglutinante pelos carboidratos livres.



Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Devido as diferenças estruturais e especificidades, estas proteínas apresentam diversas funções biológicas. A Figura 9 ilustra algumas das várias funções desempenhadas pelas lectinas.

Figura 9- Representação das diferentes funções das lectinas.



Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

As lectinas sintetizadas, presentes no citoplasma (1) podem ser armazenadas nos vacúolos de reserva proteica, translocadas para o núcleo da célula (2) ou secretadas para o meio extracelular (3), onde exercerão a função de receptores de carboidratos dos agentes patogênicos (4), podem ainda estabelecer ligações entre si, formando complexos que se ligam a carboidratos presentes na célula produtora da mesma (5) e a carboidratos da matriz extracelular (6). Ou ainda podem desencadear cascatas de sinalização (apoptose, migração celular, liberação de mediadores) (7) ou promover interações célula-célula e célula-matriz (8) (SILVA, 2016).

Costa (2018) destaca a importância de se averiguar que a hemaglutinação é de natureza lectínica através do teste de inibição por açúcares, pelo fato de que compostos como lipídeos, taninos ou íons bivalentes podem contribuir, por meio de ligações não específicas, para um falso resultado da atividade hemaglutinante.

3.5.2. Lectinas vegetais

Lectinas são amplamente distribuídas em todos os seres vivos, desde algas, fungos e bactérias até plantas e animais. Entretanto as plantas apresentam maior expressão tecidual dessas proteínas, o que torna o isolamento e a caracterização mais viável (MISHRA et al., 2019; CASTANHEIRA, 2011). Além disso, o rápido avanço das técnicas de purificação de lectinas tem contribuído para o entendimento de seus efeitos biológicos e das possíveis aplicações clínicas (KONOZY et al., 2022).

Desde milênios atrás os povos como os egípcios, hebreus dentre tantos outros, faziam o uso das ervas medicinais para infindos propósitos curativos e medicinais. Sem deixar de citar as tribos indígenas que até os dias atuais trazem consigo essa cultura e valorização, reconhecendo que nas plantas existem diversas substâncias que carregam consigo o poder da cura (SANTOS, 2020). E que hoje é sabido que essas propriedades são derivadas de seus compostos secundários e/ou primários, e até mesmo devido ao sinergismo dessas moléculas, presentes nos mais diversos tecidos vegetais (COSTA et al., 2018).

Dentre os compostos primários mais bioativos presentes nas plantas, pode-se citar as proteínas, que apresentam inúmeras atividades biológicas e biotecnológicas conhecidas, tais como inseticida, antibacteriana, antiviral, antifúngica, anticoagulante, antitumoral dentre infindas propriedades. Como nobre exemplo, podemos citar os inúmeros achados que a literatura pode nos embasar em relação à classe de proteínas denominadas de lectinas.

Inicialmente as lectinas vegetais foram encontradas prioritariamente em tecidos de reserva como sementes, e por esse motivo focava-se principalmente na purificação de lectinas de sementes. Contudo, novos estudos vêm comprovando que outros tecidos como, raízes, caules, cascas, folhas, flor e fruto também se mostram importantes fontes dessas proteínas, devidos a esses achados, nas últimas décadas, a lectinologia vegetal foi impulsionada, resultando no isolamento e caracterização de lectinas com uma variedade e diversidade de estruturas, características e funções (VAN DAMME, 2022).

Grande parte das lectinas vegetais possui especificidade por carboidratos simples (monossacarídeos e derivados desses) como, por exemplos, manose, N-acetilglicosamina e ácidos siálico, galacturônico, xilurônico, N-glucurônico, L-idurônico, e N-acetilmurâmico, ou complexos (oligo e polissacarídeos) como lactose,

sacarose, maltose, dentre outros (GOMES, 2013).

As lectinas localizam-se predominantemente em cotilédones e endospermas, mas estão presentes também em outros tecidos. Lectinas de plantas já foram isoladas a partir da casca, cladódios, flores, folhas, rizomas, raízes e sementes. (GONDIM, 2014; PAIVA et al., 2010).

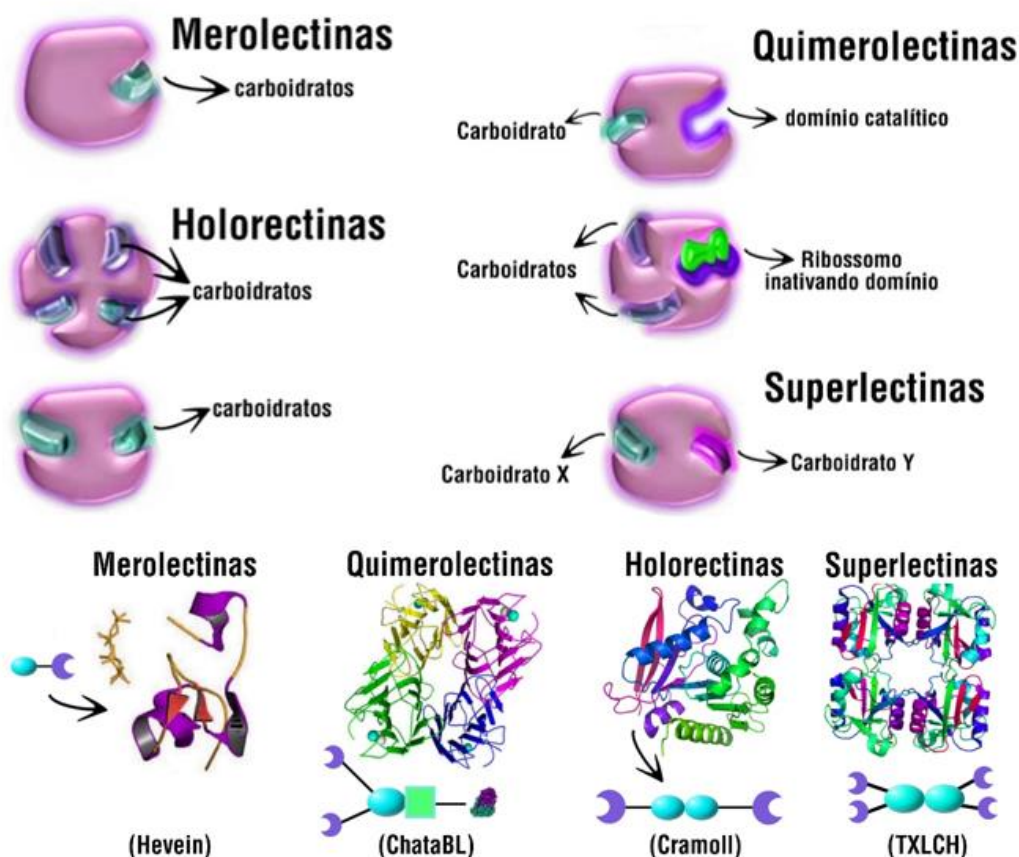
Em se tratando da fisiologia das plantas, as lectinas podem atuar como reservatório, fornecendo aminoácidos para o desenvolvimento da planta, participam da defesa contra microrganismos patógenos e/ou herbívoros, e agem na sinalização dos danos provocados na superfície celular ou intracelular das plantas. Esse mecanismo de defesa envolve a interação entre proteína e carboidrato: lectinas reconhecem e se ligam a carboidratos específicos que podem estar na superfície celular do invasor, ou podem ter sido gerados pela própria planta. Essa interação promove uma sinalização celular, como reflexo ao ataque sofrido (OLIVEIRA, 2018; FONSECA, et al., 2022).

3.5.2.1. Classificação de lectinas vegetais

As lectinas vegetais podem ser diferenciadas com base em três sistemas de classificação, que levam em consideração a sua estrutura tridimensional, especificidade aos carboidratos e relações evolutivas (BARBOSA, 2013; AHMED et al., 2022). Quanto a sua estrutura, essas proteínas podem ser organizadas em quatro tipos (Figura 10):

As merolectinas apresentam apenas um domínio de reconhecimento a carboidratos, o que impossibilita o processo de aglutinação de eritrócitos ou de precipitação de gliconjugados. As hololectinas possuem dois ou mais domínios que se ligam a carboidratos iguais ou estruturalmente semelhantes, podendo aglutinar células e precipitar glicoconjugados e a maioria das lectinas pertencem a esta classe. Quimerolectinas têm um domínio que reconhece carboidratos e um outro domínio que atua de forma independente, com ação catalítica ou de atividade biológica distinta. Já as superlectinas apresentam, no mínimo, dois domínios de ligação a açúcares, sendo estes com estruturas diferentes (NAITHANI et al., 2021; SANTOS, 2018).

Figura 10- Representação esquemática de quatro tipos de lectinas vegetais: merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

De acordo com a especificidade por carboidratos, as lectinas vegetais podem agrupar-se como ligadoras de fucose, ligadoras de glicose/manose, ligadoras de galactose/N-acetilgalactosamina, ligadoras de N-acetilglicosamina, ligadoras de ácido siálico e ligadoras de glicanos complexos (DA SILVA, 2016; PINTO-JÚNIOR, 2019).

As características evolutivas das lectinas, que abrangem suas propriedades estruturais e a sequência de aminoácidos, as dividem em doze famílias distintas. Essas famílias recebem o nome da primeira lectina que foi caracterizada detalhadamente. São elas: a família de aglutininas de *Agaricus bisporus*, as Amarantinas, as lectinas relacionadas à quitinase, as do domínio Cyanovirin, as relacionadas ao gênero *Euonymus*, as relacionadas à aglutinina de *Galanthus nivalis* (GNA), as do domínio Heveína, as relacionadas à Jacalina, as lectinas das leguminosas, as do domínio Lysin M (LysM), as lectinas relacionadas à aglutinina de *Nicotiana tabacum* (Nictaba) e as lectinas do domínio Ricina-B (VAN DAMME, 2022).

De acordo com Silva (2017), algumas lectinas, para exercerem sua função

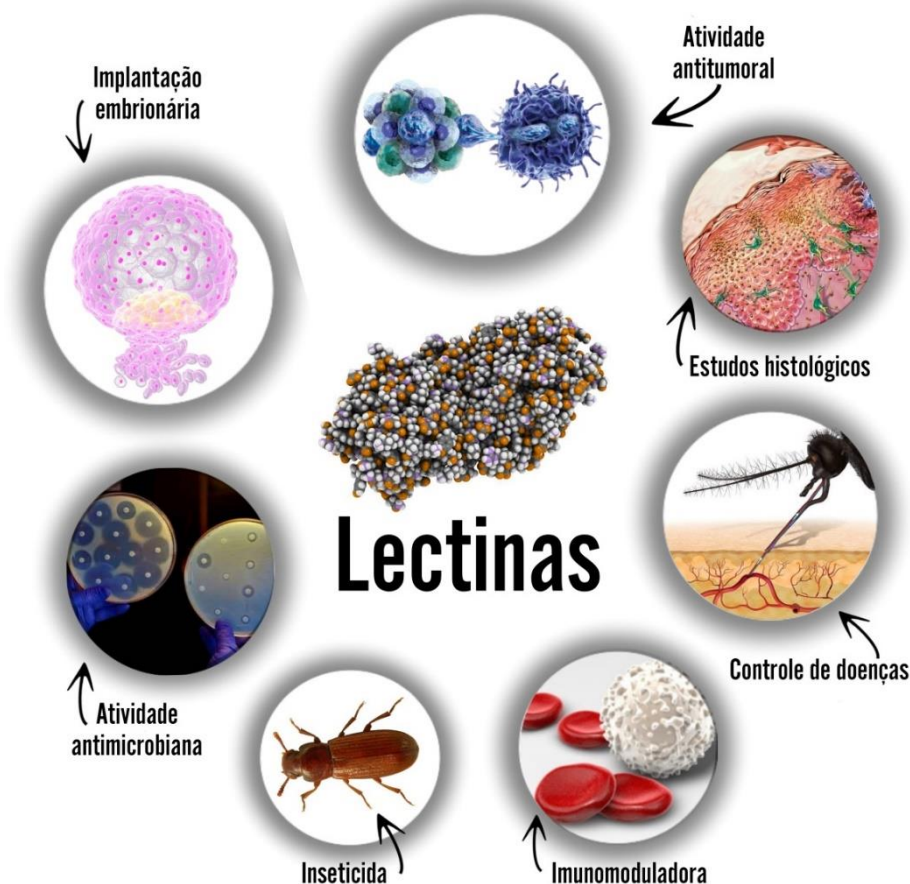
biológica, necessitam de íons divalentes, como os cátions magnésio, cálcio, manganês e zinco. Segundo Oliveira (2018) essas proteínas são denominadas metaloproteínas e os sítios de ligação desses metais são adjacentes ao domínio de reconhecimento a carboidratos.

Lectinas que não dependem de íons metálicos já estão com o seu arranjo espacial necessário para reconhecer carboidratos. Quando apresentam porção glicídica em sua estrutura, são denominadas de glicoproteínas, e essa característica diminui tanto o processo proteolítico, quanto a desnaturação por temperatura e pH, o que confere a proteína maior estabilidade. Além disso, contribui para a solubilidade e viscosidade em soluções aquosas, bem como para a associação com outras moléculas (GOMES, 2013).

3.5.3. Aplicações biotecnológicas das lectinas

Com o surgimento de novas técnicas de isolamento, purificação e caracterização de proteínas, juntamente com as descobertas de que as lectinas apresentavam a capacidades de ligaram-se a carboidratos específicos e induzir diversos processos celulares, a partir da década de 1970, houve um grande salto no que diz respeito a pesquisa, conhecimento e aplicação dessas proteínas nas áreas biotecnológicas (MISHRA et al., 2019; NAPOLEÃO et al., 2019; OLIVEIRA, 2018). Essas biomoléculas podem atuar em vários setores, dos quais pode-se citar sua aplicabilidade nas áreas de biologia molecular e celular, bioquímica, imunologia, biomedicina e diagnóstico e tratamento de doenças, como câncer (Figura 11).

Figura 11- Aplicações das Lectinas em diferentes áreas.

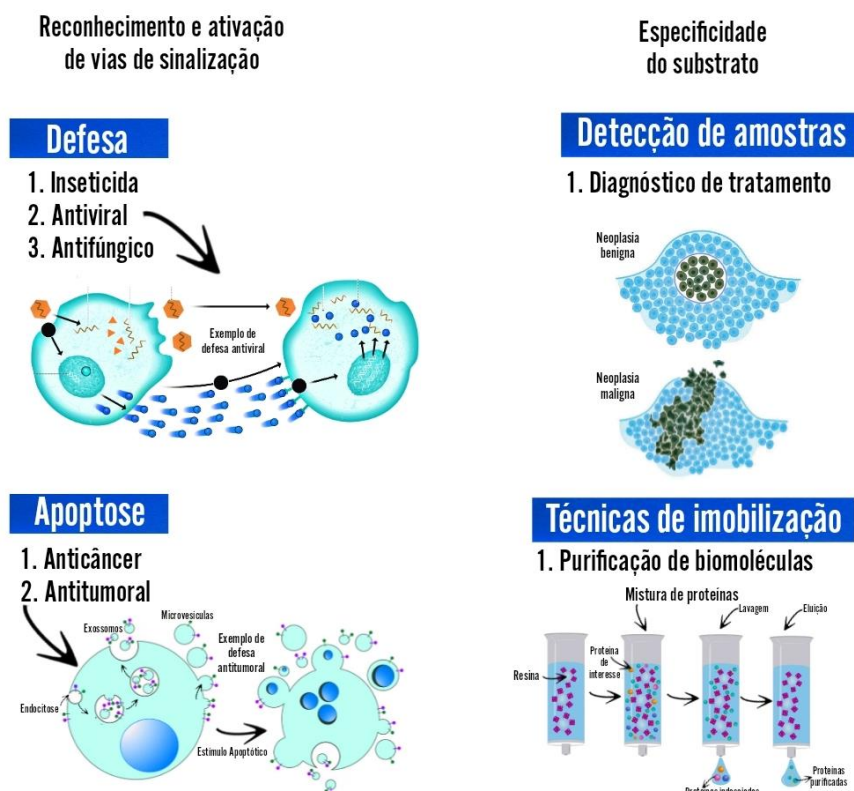


Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Na literatura observa-se várias publicações referentes as atividades biotecnológicas advindas das lectinas, tais como, atividade inseticida (MACEDO; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2015; VANDENBORRE; SMAGGHE; DAMME, 2011), antimicrobiana e antiproliferativa (HIREMATH et al., 2020; COSTA, 2018; DIAS et al., 2015; POMPEU et al., 2015), anti-HIV (HOPPER et al., 2017), mitogênica para linfócitos (ASHRAF; KHAN, 2003; MOVAFAGH et al., 2016), anti-inflamatória (MUSZYNSKA et al., 2018), anticoagulante e antiplaquetária (DA CUNHA PEREIRA et al., 2021; NANDISH et al., 2020; SAMAH et al., 2017; ANDREA et al., 2014; ZHONG et al., 2006) e antitumoral (COULIBALY; YOUAN, 2017; YAU et al., 2015) (Figura 12).

Figura 12- Aplicações biotecnológicas das Lectinas.

Lectinas



Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

3.5.3.1. Tipagem Sanguínea

A identificação da tipagem sanguínea é descrita como uma das primeiras aplicações biotecnológicas das lectinas, e aconteceu durante Segunda Guerra Mundial, devido a necessidade de transfusão sanguínea. Tal característica é resultado da ação hemaglutinante seletiva que ocorre entre a proteína e os glicídios, como galactose, galactosamina entre outros, que constituem os glicocálix que compõe a membrana dos eritrócitos, formando aglomerados de células, denominados como aglutinados, resultado da reticulação celular (OLIVEIRA, 2018; DE JUAN et al., 2017; KHAN et al., 2002, SHARON, LIS, 1972). Dentre as lectinas comercializadas para a identificação dos antígenos dos grupos sanguíneos podemos citar as lectinas vegetais: *Dolichos biflorus* (DBA, anti-A1), *Griffonia simplicifolia* (GS-I, anti – B) e *Ulex europaeus* (UEA-I, anti - O) (KHAN et al., 2002).

3.5.3.2. **Terapias mediada por lectina**

A interação existente entre lectinas e carboidratos é caracterizada como um método de reconhecimento seletivo em diversos processos biológicos, intimamente ligados a uma diversidade de doenças humanas, como metástase tumoral (GONDIM et al., 2017; YAU et al., 2015), invasão viral (HOPPER et al., 2017) e processos inflamatórios (MUSZYNSKA et al., 2018).

Mesmo com o avanço na área medicinal, ainda se observa grandes limitações nas terapias que utilizam agentes químicos, fazendo com que seja necessário, na maioria das vezes, aumentar a dosagem e/ ou o modo de ação da droga utilizada, o que tende a provocar sérios desconfortos ao paciente, e podem desencadear sintomas ou fatores adversos, tornando o método pouco eficiente (BIES; LEHR; WOODLEY, 2004).

Visando minimizar essa problemática, tem-se observado várias pesquisas utilizando lectinas como carreadoras de drogas, visto que essas proteínas tem a capacidade de interagir diretamente com o local alvo do tratamento, aumentando a eficiência do tratamento e evitando que os tecidos saudáveis sejam atingidos (PLATTNER et al., 2009). É importante salientar que, para sua utilização é necessário que as lectinas apresentem baixa toxicidade, além de alta especificidade pelo glicocálix das células alvo (CHETTRI et al., 2021).

Efeitos antinociceptivos e anti-inflamatórios foram apresentados pela lectina de sementes de beri-silvestre (*Canna limbata*), no trabalho de Araújo (2011), sugerindo sua utilização no tratamento da inflamação e da dor. Barbosa (2013) e Pereira-Júnior (2014) observaram a ação anti-inflamatória na lectina de sementes do feijão-bravo do Ceará (*C. brasiliensis*) e na lectina purificada de sementes de *Dioclea reflexa* (DrfL), respectivamente.

3.5.3.3. **Atividade Inseticida**

Várias pesquisas descrevem sobre as propriedades inseticidas das lectinas vegetais, viabilizando o controle de pragas e insetos na área agrícola, a fim de minimizar os impactos causados pelos inseticidas tradicionais, sobre o meio ambiente e outros organismos inofensivos (EL-DEEB, 2021; CAVADA et al., 2020; REYES-MONTAÑO; VEGA-CASTRO, 2018; MACEDO; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2015).

Essas proteínas atuam como substâncias antinutritivas e/ ou tóxicas, devido a sua capacidade de ligação nas células presentes na membrana que revestem o trato digestivo do inseto, desenvolvendo uma série de reações sistêmicas prejudiciais (STOGER et al., 1999). Devido ser composta de quitina, proteoglicanos e proteínas, a matriz peritrófica do inseto atua como barreira de proteção para o epitélio intestinal contra partículas abrasivas de alimentos, além de regular a passagem de moléculas entre os diferentes compartimentos intestinais (CAVADA et al., 2020) A interrupção do metabolismo de lipídios, carboidratos e proteínas tem efeitos deletérios para o nascimento, crescimento e desenvolvimento de insetos, processo denominado de metamorfose (EL-DEEB, 2021; DUTTA et al., 2005).

POWELL et al. (1998), determinou a toxicidade da lectina de *Galanthus nivalis* (GNA) em cigarrinhas de arroz integral (*Nilaparvata lugens*), através da ligação de GNA à superfície celular do epitélio do intestino médio, causando alterações na morfologia das células do epitélio e ruptura das células na região da borda em escova das microvilosidades.

As lectinas de feijão e soja inibiram a atividade de proteases totais e α -amilase, diminuindo a atuação da lagarta rosada, *Pectinophora gossypiella* (EL-DEEB, 2021). Macedo e colaboradores (2007) analisaram a ação inseticida da lectina da folha de *B. monandra* (BmoLL) contra as larvas de *C. maculatus*, *Z. subfasciatus* e *A. kuehniella* e observaram uma taxa de mortalidade de 50% para *Z. subfasciatus* e *C. maculatus* sem diminuir significativamente as larvas de *A. kuehniella*, exceto por uma diminuição de 40% no peso.

Em um estudo desenvolvido por Lehane (1997) foi determinado que a lectina II extraída das sementes e folhas de *Griffonia simplicifolia* (GSL), e sua forma recombinante (rGSLII) foram capazes de ligar-se a matriz peritrófica de *Callosobruchus maculatus* (F.) e diminuir a absorção de nutrientes. Em 2009, um trabalho realizado por Lima e Paiva revelou que lectinas das folhas de *Myracrodruon urundeuva* (aroeira-do-sertão) foram agentes larvicidas contra *A. aegypti*. Dornelles e Paiva (2011) utilizaram esta espécie vegetal para isolar lectinas da entrecasca (MuBL), cerne (MuHL) e folhas (MuLL) e testaram contra bactérias simbiotes do extrato de intestinos de operários e soldados de cupim (*N. corniger*).

As lectinas vegetais quando expressas em plantas transgênicas ou nas dietas artificiais mostraram apresentar reações negativas contra pragas como as

pertencentes às ordens *Lepidoptera*, *Coleoptera*, *Diptera* e *Hemiptera* (VANDENBORRE; SMAGGHE; VAN DAMME, 2011). Os dados apresentados mostraram ação termiticida das lectinas relacionada ao efeito prejudicial sobre essas bactérias que são necessárias para a digestão de componentes da alimentação dos insetos.

3.5.3.4. **Atividade Antiviral**

Algumas lectinas apresentam capacidade de inibir a atuação de vírus através da interação com as glicoproteínas presentes no envelope celular, bloqueando os receptores na superfície da célula hospedeira ou ligando-se às enzimas polimerase do vírus em seu sítio ativo (AHMED et al., 2022; EL-DEEB, 2021; MAZALOVSKA; KOUOKAM, 2018; MITCHELL; RAMESSAR; O'KEEFE, 2017). Devido a capacidade dessas biomoléculas interferirem na entrada do vírus e consequentemente inibirem a produção de proteínas virais, foram avaliadas *in vitro*, quanto aos seus efeitos de neutralização em diferentes espécies virais envelopadas, incluindo HIV e coronavírus (AHMED et al., 2022; MAZALOVSKA; KOUOKAM, 2018).

Em seus estudos, Barbosa et al. (2021) descrevem que as lectinas estão sendo utilizadas como ferramentas glicoanalíticas, no desenvolvimento de biossensores utilizados no diagnóstico de doenças infecciosas e detecção de patógenos virais. Para tanto, Simão et al. (2020) observaram que a lectina de *Concanavalina A* (ConA) foi capaz de reconhecer as glicoproteínas estruturais do arbovírus. Andrade et al., (2011) construíram um biossensor utilizando a lectina *Bauhinia monandra* e nanopartículas de ouro-polianilina e perceberam que a lectina foi capaz de detectar glicoproteínas de sorotipos do vírus da Dengue com boa sensibilidade e reprodutibilidade, além de manter sua atividade no sistema. Dados de um estudo realizado por KO e colaboradores (2014) com cinco lectinas oriundas de fontes vegetais, lectina de *Dolichos biflorus* (DBA), *Helix pomatia*lectina (HPA), lectina de amendoim (PNA), lectina de soja (SBA) e lectina de *Ulex europaeus* (UEA-1), determinaram que SBA apresentou ação antiviral contra o vírus da hepatite A (HAV).

3.5.3.5. **Atividade Antimicrobiana**

As lectinas comumente apresentam atividade antimicrobiana, devido sua capacidade de mediar a identificação de microrganismos através da interação com

peptidoglicanos, polissacarídeos, lipopolissacarídeos e ácidos teicoicos presentes na parede celular fúngica (PROCÓPIO et al., 2017; IORDACHE et al., 2015) promovendo comunicações hospedeiro-patógeno, ativação de defesa imunológica e sinalização célula- célula, o que resulta em mecanismos antimicrobianos de bloqueio de invasão e infecção, inibição do crescimento e germinação, regulação da adesão e migração de células microbianas (BREITENBACH BARROSO COELHO et al., 2018).

Arfin e colaboradores (2022) purificaram uma mistura de lectinas ligantes de quitina de frutos de tomate (*Solanum lycopersicum*), (TCLs), usando cromatografia de afinidade utilizando uma coluna de quitina acetilada, e perceberam que TCLs demonstrou forte atividade antifúngica contra *Aspergillus niger*, assim como também foi observado uma expressiva atividade antibacteriana contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Shigella boydii*.

A lectina GaBL mostrou notável atividade fungica contra as cepas de *C. albicans* e *C. neoformans*, apresentando um MIC de 25 e 12,5 µg/mL, respectivamente. Vale salientar que estes microrganismos possuem características distintas, com relação a estrutura e mecanismos de ação, isso mostra a versatilidade que a lectina em estudo mostrou ao inibir organismos patogênicos distintos, podendo ser uma promissora ferramenta contra agentes patológicos (COSTA, 2018).

Em um estudo desenvolvido por Procópio et al. (2017) foi averiguada a atividade antifúngica e antibacteriana da lectina isolada da folha de *Calliandra surinamensis* (CasuL), contra quatro espécies de *Candida*, sendo detectado que *C. krusei* apresentou alta sensibilidade a lectina, sendo observado que CasuL afetou a integridade da parede de *C. krusei*, assim como também demonstrou atividade antibacteriana e efeito antibiofilme contra *S. saprophyticus*.

A lectina de *Machaerium acutifolium* (MaL) apresentou atividade antifúngica *in vitro* de MaL contra *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* e reduziu o crescimento de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, mas foi mais ativo contra *C. parapsilosis* (DIAS et al., 2020). Da raiz de *Portulaca elatior* foi isolada uma lectina com potencial atividade antimicrobiana por Silva (2016), denominada como PeRoL. Da folha de *Bauhinia monandra* (árvore-orquídea), Silva (2008) extraiu uma lectina (BmoLL) que também apresentou ação antimicrobiana.

A lectina das folhas de *Lantana camara* (LCL) inibiu o crescimento de todas as três espécies testadas de bactérias (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e

Klebsiella pneumonia) e fúngicas (*Aspergillus niger*, *Purpureocillium lilacinum* e *Metarhizium anisopliae*) após tratamento por 24 h, 48 h respectivamente em comparação com medicamentos comerciais como Ampicilina, Clotrimazol conhecidos por seus potenciais no tratamento de doenças bacterianas e fúngica (HIREMATH et al., 2020).

A lectina isolada da citobactéria *Scytovirina* mostrou atividade antifúngica contra criptococos patogênicos, *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* e *C. gattii*. Os autores relatam que a lectina inibiu o crescimento de células fúngicas através da ligação a parede celular (JONES et al., 2017). As lectinas fúngicas presentes nos corpos frutíferos do cogumelo *Sparassis latifolia* demonstraram atividade antibacteriana contra *E. coli* e cepas resistentes de *S. aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* e atividade antifúngica em espécies de *Candida* e *Fusarium* (CHANDRASEKARAN et al., 2016).

As lectinas presentes em extratos das espécies de fungos *Penicillium corylophilum*, *P. expansum* e *P. purpurogenum* exibiram atividade antifúngica contra *Aspergillus niger*, *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae*. As lectinas também demonstraram atividade antibacteriana, inibindo o crescimento de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* (SINGH et al., 2013). As lectinas encontradas em *Fusarium chlamydosporium*, *F. culmorum* e *F. crookwellense* mostraram atividade antimicrobiana contra *E. coli*, *S. aureus*, *B. cereus* e *C. albicans* (SINGH et al., 2014).

A lectina isolada da folha de *Euphorbia helioscopia* apresentou considerável atividade antimicrobiana (RAFIQ et al., 2014). Gomes (2013) também relatou a atividade contra bactérias e fungos de importância médica da lectina SteLL, extraída das folhas de *S. Terebinthifolius*. Essa mesma lectina foi avaliada, por Lima et al. (2019), frente a macrófagos infectados por *S. aureus*, onde a mesma aumentou a ação bactericida dessas células, conferindo à lectina efeito anti-infeccioso.

Lunatin, uma lectina purificada a partir das sementes de *Phaseolus lunatus*, exibiu elevada atividade antifúngica para fungos fitopatogênicos das espécies *S. rolfii*, *P. piricola*, *F. oxysporum* e *B. cinerea*. A lectina purificada demonstrou possuir efeito antiproliferativo frente as linhagens de células tumorais HepG2 e HeLa e para K562 células de leucemia em diferentes graus. Isso mostra que lectinas são fortes candidatas em processos como controle do crescimento de carcinoma, assim como

controle de fungos fitopatogênicos, que tem sido alvo de grandes transtornos, principalmente para culturas perenes (WU et al., 2016).

Sá et al. (2009) conseguiram isolar uma lectina do cerne de *Myracrodruon urundeuva* (aroeira-do-sertão), que inibiu bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e impediu o crescimento de fungos fitopatogênicos. Hiremath e colaboradores (2020), descrevem sobre a purificação de LCL, uma lectina de folha da planta medicinal cambará (*Lantana camara*), com potente atividade antibacteriana e antifúngica, e que também inibe o crescimento de células HT29 (linhagem celular de câncer de cólon).

A lectina extraída da couve-flor (*Brassica oleracea* ssp. *Botrytis*) por Duarte et al., (2017) foi analisada quanto aos efeitos contra macrófagos (a primeira linha de defesa contra invasões microbianas) em células de levedura. Os dados obtidos evidenciaram a atividade imunomoduladora da lectina, que estimulou a fagocitose e a produção de mediadores inflamatórios por macrófagos, o que contribuiu com a ativação da resposta imune. O efeito imunomodulador também foi relatado por De Siqueira Patriota et al., (2022) em seu trabalho de purificação e caracterização da lectina de sementes da castanha da Índia (*Aesculus hippocastanum* L.). O trabalho de purificação parcial de lectinas do tomate, realizada por Arfin et al., (2022) demonstrou que essas proteínas possuem não só atividade antibacteriana e antifúngica, mas também ação antibiofilme e antiproliferativas contra células de carcinoma de ascite de Ehrlich.

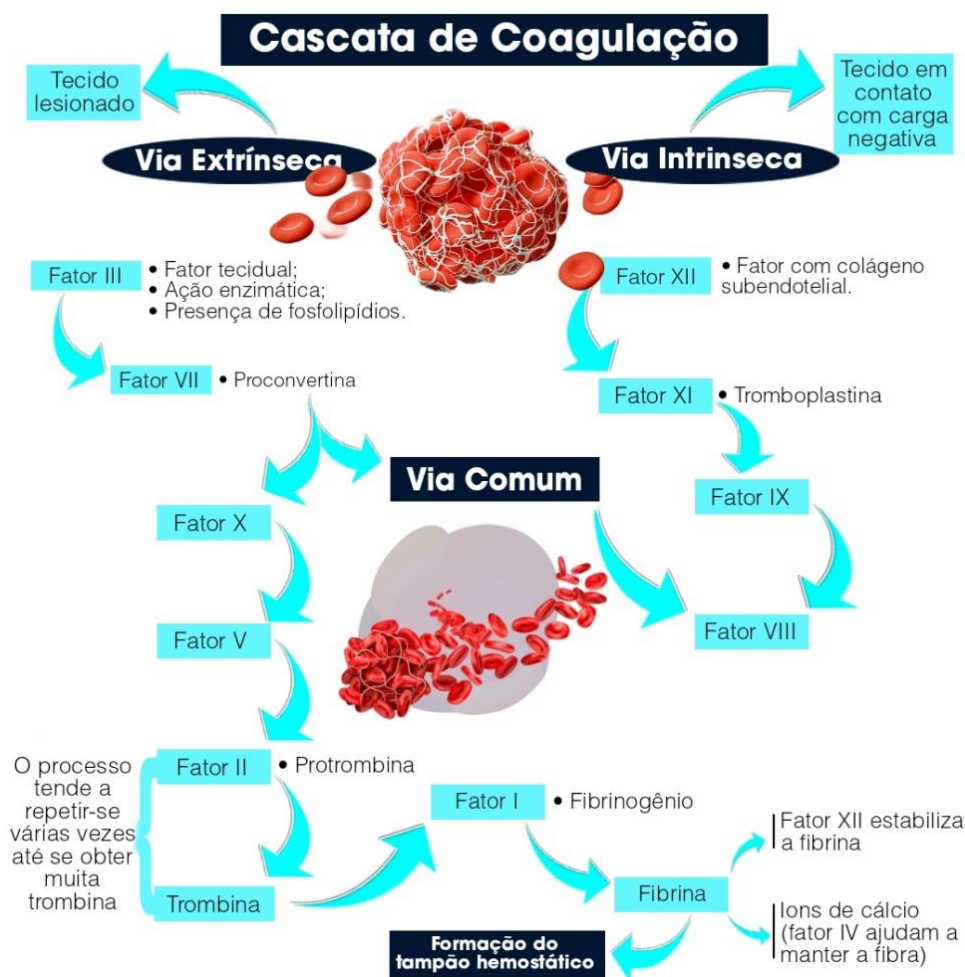
3.5.3.6. **Atividade Anticoagulante**

É importante salientar que a hemostasia é o processo fisiológico extremamente necessário nos organismos vivos e consiste em um complexo mecanismo de regulação formado por diversos componentes como: células, moléculas e íons, que em conjunto, buscam evitar que o organismo tenha hemorragia ou trombose, que ocorre por meio do equilíbrio entre mecanismos procoagulantes e anticoagulantes, aliados a um processo de fibrinólise, que mantém o sangue em estado fluido dentro dos vasos (RIBEIRO, 2020).

Desde 1964, ano em que foi proposta, até poucos anos atrás, o processo de ativação dos fatores de coagulação foi explicado através do modelo de cascata: Onde existem duas vias: a extrínseca e a intrínseca, que se iniciam independentemente e seguem por meio da ativação proteolítica sequencial de pró-

enzimas por proteases plasmáticas, até o momento que se unem formando uma via comum para a formação do coágulo (Figura 13) (DAHLBÄCK, 2000; RIDDEL et al., 2007). Essa hipótese facilita o ensinamento didático da coagulação; permitido avanço no entendimento dos testes laboratoriais de coagulação, sendo até hoje, aceita para a coagulação *in vitro*, pois é conveniente para a interpretação dos testes laboratoriais (REZENDE, 2010; SILVA; DE MELO, 2016; SUSREE; PANTELEEV; MOHAN, 2019). Porém através dos dados clínicos e experimentais fica claro que essa hipótese de cascata não contempla os eventos da hemostasia *in vivo* em sua totalidade (HOFFMAN, 2003).

Figura 13- Esquema das vias de coagulação: Intrínseca e extrínseca.



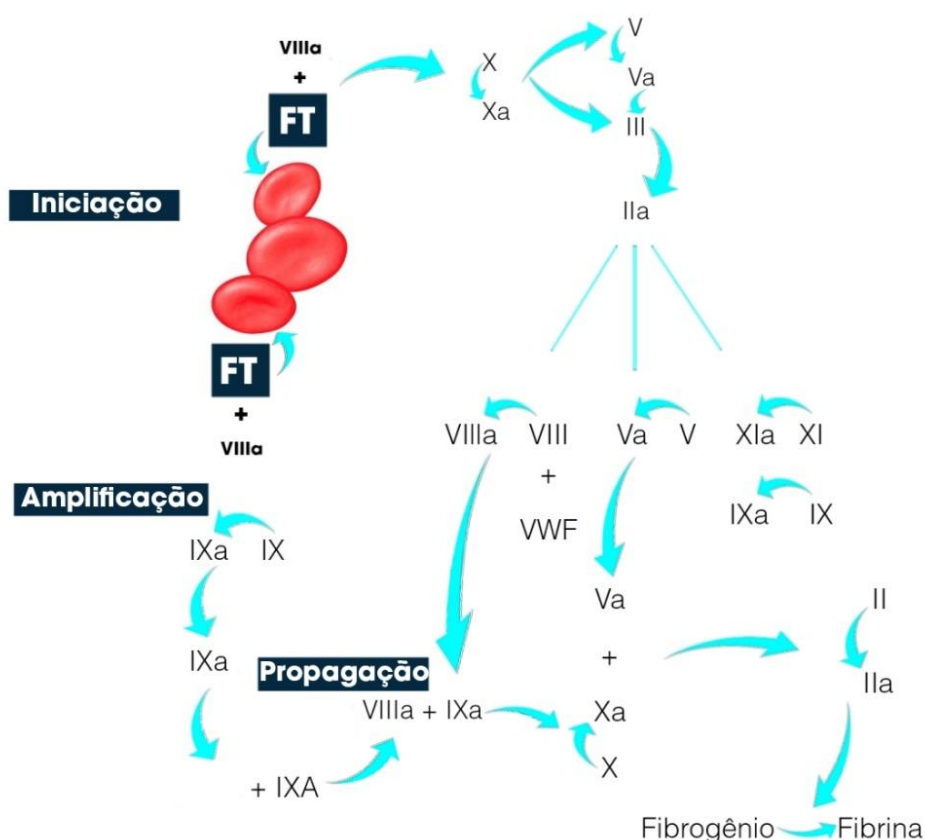
Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Atualmente a teoria de coagulação mais aceita é a que se baseia na superfície celular (Figura 14), pois explica de forma completa e autêntica o processo de coagulação, quanto aos eventos hemostáticos *in vivo* (REZENDE, 2010; FERREIRA et al., 2010; SILVA; DE MELO, 2016), de maneira que, o processo de coagulação ocorre em quatro estágios simultâneos: iniciação, amplificação, propagação e

terminação (REZENDE, 2010). Nesse modelo a via extrínseca atua na iniciação e a intrínseca na propagação da coagulação, atuando em papéis distintos e complementares (SILVA; DE MELO, 2016).

Nesse modelo, ao sofrer uma lesão vascular, as células ativas são fundamentais pois as substâncias procoagulantes ativadas, responsáveis pela expressão do fator tecidual (FT) em sua superfície— células musculares lisas e fibroblastos, como também células endoteliais e plaquetas, impedindo que a coagulação se espalhe pelo sistema vascular causando trombose, permanecem em suas superfícies. Vale salientar que os anticoagulantes naturais também são essenciais para a formação autolimitada do trombo (FERREIRA et al., 2010).

Figura 14- Esquema da coagulação sanguínea baseada em superfícies celulares.



Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Para avaliar a integridade das vias de coagulação, normalmente se utiliza testes laboratoriais, como tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) e o tempo de protrombina (TP) são dois testes comumente utilizados que avaliam a integridade

das vias intrínseca e comum e extrínseca e comum, respectivamente (REZENDE, 2010). Para tanto, o papel ativo das superfícies das células nas condições in vivo pode ser ignorado, uma vez que seu papel é substituído por reagentes comerciais que simulam in vitro as condições fisiológicas (FERREIRA et al., 2010). Esses testes também são utilizados em pesquisas por novas moléculas com potencial anticoagulante ou procoagulante (DE ANDRADE LUZ et al., 2013; PONIEDZIALEK et al., 2019).

A determinação do TTPA ocorre mediante a adição de fosfolipídeos e cálcio ao plasma até que ocorra a formação de fibrina insolúvel, sendo útil na detecção de deficiências dos fatores da via intrínseca e comum (I, II, V, VIII, IX, X, XI e XII). Enquanto o TP inicia-se após a introdução de cálcio tromboplastina ao plasma, sendo finalizado quando ocorre formação do coágulo, avalia eventuais deficiências nos fatores da via extrínseca e comum (I, II, V, VII e X), onde, em ambos os ensaios, a deficiências refletem em prolongamento ou diminuição do tempo necessário para a formação do coágulo (REZENDE, 2010).

Devido a sua capacidade de interação com diferentes glicídios, as lectinas também são utilizadas nos processos de coagulação. Uma lectina tipo C, RVsnaclec, purificada do veneno de *Daboia russelii russelii* mostrou alta atividade coagulante, aumentada linearmente com o aumento da concentração, de 0,75 a 3,0 µg/mL (MUKHERJEE.; DUTTA; MACKESSY, 2014).

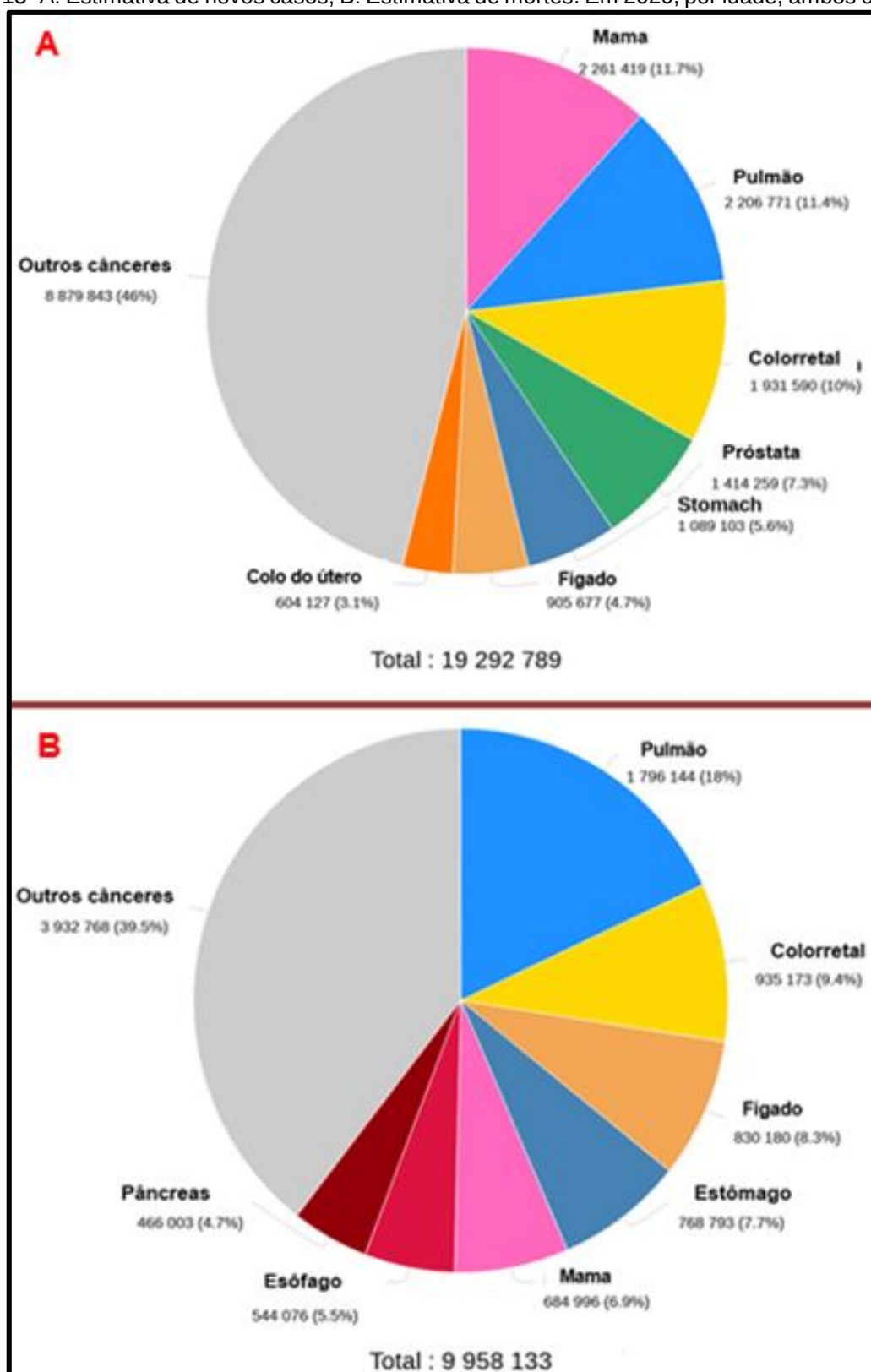
Estudos realizados por Samah et al. (2017) demonstraram a ação anticoagulante de Cc-Lec, uma lectina tipo C purificada do veneno de *Cerastes cerastes* por cromatografia de afinidade, cromatografia de exclusão e cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa. Os pesquisadores descreveram que esta proteína apresentou um elevado e duradouro efeito anticoagulante in vivo, sendo observado em até 48 horas após a injeção em camundongos. Tais resultados, segundo os autores, são resultados da interação entre Cc-Lec com os fatores de coagulação Xa e IXa, elementos-chave na iniciação e amplificação da coagulação. Cc-Lec também foi capaz de inibir a atividade amidolítica de FXa de maneira dependente de cálcio. Tais resultados podem estar relacionado à sua especificidade para carboidratos, uma vez que a glicosilação dos fatores de coagulação foi relatada como importante para sua atividade (YANG; MANITHODY; REZAIE, 2009).

3.5.3.7. **Atividade Anticancerígena**

O termo câncer refere-se ao conjunto de mais de 100 patologia, que tem em comum o crescimento desordenado de células que ocasionam o surgimento de tumores malignos de grande complexidade e heterogeneidade, resultado das várias mutações genéticas observadas, alterando as funções adequadas dos órgãos, uma vez que bloqueiam nutrientes e oxigênio, além de possibilitar o aumento da toxicidade e consequentemente promover a morte celular (GARCIA-BERMUDEZ et al., 2021; CATANZARO et al., 2019). Para tanto essas doenças se configuram como problema de saúde pública, visto que são responsáveis por um grande quantitativo de casos e mortes provocadas mundialmente (AZEVEDO et al., 2021; WOLIN, 2021).

Segundo relatório da Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC), em 2020, foi observado um aumento expressivo nos números de novos casos e óbitos decorrentes do câncer em todo o território mundial. De acordo com a publicação, em 2020 a incidência mundial de câncer foi superior a 19,2 milhões de novos casos (Figura 15A) e 9,9 milhões de mortes (Figura 15B) e estes números tendem a aumentar ainda mais, podendo atingir mais de 50 milhões de novos casos e 13 milhões de mortes nos próximos cinco anos.

Figura 15- A: Estimativa de novos casos; B: Estimativa de mortes. Em 2020, por idade, ambos os sexos.



Fonte: Adaptado de GLOBOCAN (2020).

A metástase tumoral em órgãos vitais do corpo humano é a principal causa de morte e não o tumor primário e ocorre por meio de processos seletivos de órgãos,

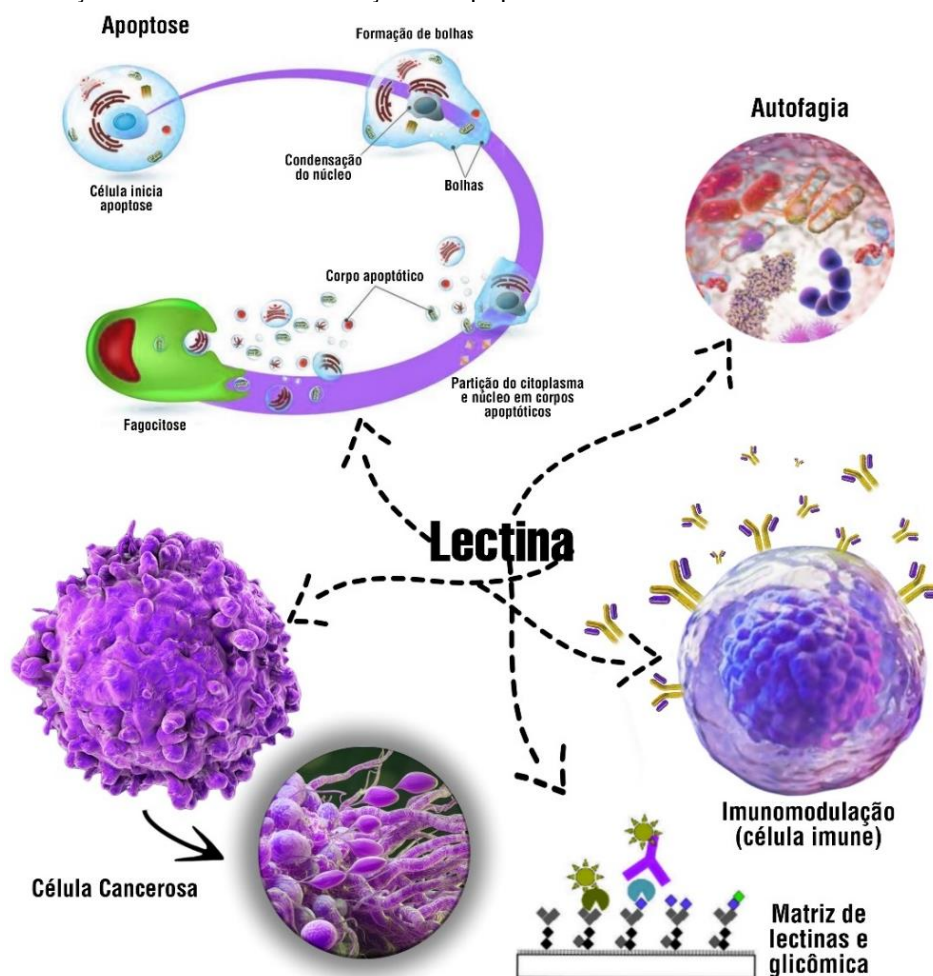
através de várias etapas que se iniciam com o deslocamento das células malignas do tumor primário e finalizam após o desenvolvimento dos tumores em microambientes teciduais distantes. Tais etapas incluem a formação de vasos, adesão celular, migração, invasão e proliferação celular (MAJIDPOOR; MORTEZAEE, 2021; SINDHURA et al., 2017). Estes eventos ocasionam a seleção de vias que tendem a ser vantajosas para as células malignas e que também são capazes de recrutar vias estromais que acomodam essas células (FOLLAIN et al., 2020).

O câncer de cabeça e pescoço, acomete os órgãos do trato aero digestivo superior, que incluem as regiões de cavidade oral, faringe e laringe. Silva et al., (2020) descreve que cerca de 40 % das neoplasias de cabeça e pescoço ocorrem na região de cavidade oral, onde se encontram o assoalho bucal, língua, base da língua, palato duro e lábios, 15 % na faringe, composta por orofaringe, hipofaringe e nasofaringe, 25% na laringe; e 20 % nas glândulas salivares e tireoide. De acordo com o Instituto Nacional De Câncer José De Alencar Gomes da Silva (INCA), nos primeiros três meses de 2020, ocorreram cerca de 36.620 novos casos de Câncer de cabeça e pescoço entre a população brasileira (DIAS et al., 2021).

O tratamento tradicional dos tumores malignos, consiste na maioria dos casos, da utilização de quimioterapias, mesmo apresentando vários efeitos indesejados e danosos às células normais e, conseqüentemente, ao paciente. Visando minimizar esta problemática, tem observado um aumento significativo nas pesquisas com produtos naturais, como é o caso das lectinas vegetais, que tem mostrado alta seletividade as células cancerígenas, além de serem de fácil acesso e oferecem menos efeitos colaterais, quando comparadas com os tratamentos tradicionais (KONOZY; OSMAN; DIRAR, 2022; CHETTRI et al., 2021; CATANZARO et al., 2019; OLIVEIRA, 2018).

Pesquisas demonstram que as lectinas apresentam características favoráveis para serem utilizadas como biomarcadores tumorais, visando analisar os padrões de glicosilação específicos das células tumorais, contribuindo no diagnóstico do câncer e podendo curiosamente, resultar na destruição do tumor por apoptose e autofagia (Figura 16) (WOLIN, 2021; CHETTRI et al., 2021; MAZALOVSKA; KOUOKAM, 2020; GAUTAM et al., 2020; BHUTIA et al., 2019; RYVA et al., 2019; CAVADA et al., 2018; BATISTA et al., 2017; PINTO-JUNIOR, 2016; XIAO, et al., 2015; HAMID et al., 2013).

Figura 16- Atuação das Lectinas na indução da apoptose.



Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

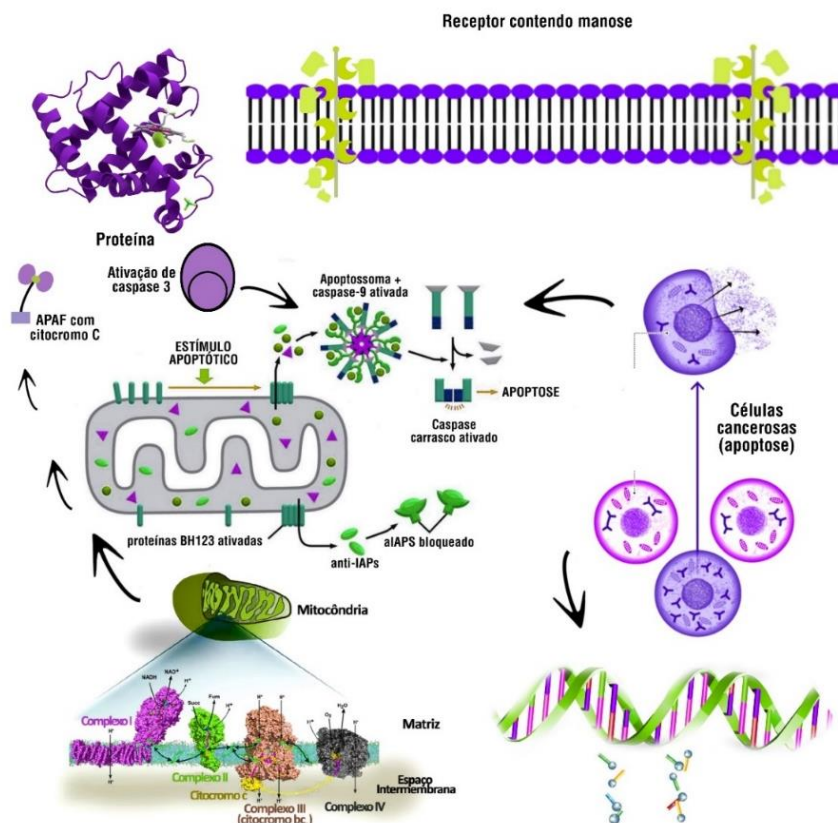
A apoptose trata-se da morte celular programada mediada por caspases, onde as células apresentam características morfológicas diferentes como arredondamento, retração dos pseudópodos, redução do volume nuclear e celular (picnose), condensação e fragmentação da cromatina (kariorrhexis), protuberâncias na membrana plasmática (blebbing), formação de corpos apoptóticos, e alterações bioquímicas como, por exemplo, a exposição da fosfatidilserina (PS) na superfície da membrana plasmática o que leva à invaginação das células pelos fagócitos em condições in vivo, podendo ocorrer através de dois processos de indução: apoptose extrínseca, quando é observada a atuação dos receptores de morte de superfície, e intrínseca, quando ocorre a liberação mitocondrial de citocromo c (BHUTIA et al., 2019; CHEN; KANG, 2018).

A via extrínseca ocorre por meio da ligação entre os receptores de superfície celular (TNF-R, DR-3,-4 e -5 e Fas-R) e ligantes específicos, que ativaram e

transmitirão os sinais apoptóticos, como a proteína do domínio de morte associado ao TNF-R tipo 1 (TRADD) e proteína associada ao Fas com domínio de morte (FADD) que se combinam e ativam o complexo de sinalização indutor de morte (DISC), impulsionando a clivagem de caspase-3, 6 e 7. Já a via intrínseca é ativada através de estímulos intracelulares que induzem a permeabilização da membrana externa mitocondrial (MOMP), através da dimerização das proteínas pró-apoptóticas Bax e Bak, antes da liberação do citocromo c no citosol da membrana mitocondrial. A formação de um complexo multiproteico (apoptossomo), ocorre por meio da ligação entre o citocromo c e o fator de ativação apoptótica-1, que ativará a caspase-9 e caspase-3, sequencialmente (GAMIE et al., 2017).

Através de processos de endocitose, as lectinas vegetais interagem com o receptor de ligação ao carboidrato existente na membrana plasmática formando as vesículas que as transportam até as mitocôndrias, para a geração das espécies reativas de oxigênio (EROs) e liberação do citocromo c no citoplasma. As EROs ativam moléculas proteínas efetoras a jusante importante na regulação de Bax e Bcl-2, ativando ainda mais a apoptose mediada por p21-Foxo1a-Bim. Ao ser liberado e interagindo com as caspases, o citocromo C ativa a via extrínseca da apoptose. As lectinas vegetais podem ainda regular NF-kB, ERK, Ras a fim de induzir a parada do ciclo celular e apoptose (Figura 17) (BHUTIA et al., 2019).

Figura 17-- Mecanismos de atuação da Lectina no câncer, por apoptose.



Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Outro processo estudado no mecanismo de morte celular é a autofagia, processo adaptativo, que ocorre em resposta a estresse metabólico como ausência de fatores de crescimento, escassez de nutrientes e estresse oxidativo, portanto autofagia é considerada como um mecanismo citoprotetor relacionado a manutenção, diferenciação e defesa celular, remodelação de tecidos, controle do crescimento e adaptação metabólica à sobrevivência celular (WOLLIN, 2021), que ocorre através de processo de autodegradação e reciclagem dos componentes celulares mediante a formação de complexos lisossomais (OHSUMI, 2014). Porém nas células tumorais, a autofagia atua nos mecanismos fisiológicos de sobrevivência temporal, possibilitando a morte celular quando o estresse ocorre de forma contínua ou quando se observa excesso desse processo (BHUTIA et al., 2019).

A depender do mecanismo de entrega da carga citoplasmática, a autofagia pode ser classificada em: macroautofagia: quando se observa a formação do autofagossomo que se funde aos lisossomos; microautofagia: processo gerado quando as proteínas citosólicas são diretamente englobadas pelos lisossomos e

autofagia mediada por chaperonas: na qual utiliza-se as chaperonas presentes no citoplasma para entregar as proteínas às superfícies dos lisossomos (COOPER, 2018; DEGTYAREV; REICHELT; LIN, 2014).

Esse processo pode ocorrer em cinco etapas, sendo elas: iniciação da formação do autofagóforo ou autofagossomo, alongação, maturação e fusão. De forma geral, inicialmente ocorre a formação do autofagossomo, também denominado como estrutura pré-autofagossomal, em seguida esta estrutura se alonga, engloba as organelas, proteínas ou outros materiais que serão degradados e se funde para a formação do autofagossomo. Este autofagossomo, inicialmente se funde com o endossomo e em seguida com o lisossomo para iniciar a degradação propriamente (DIKIC; ELAZAR, 2018; FAN et al., 2013).

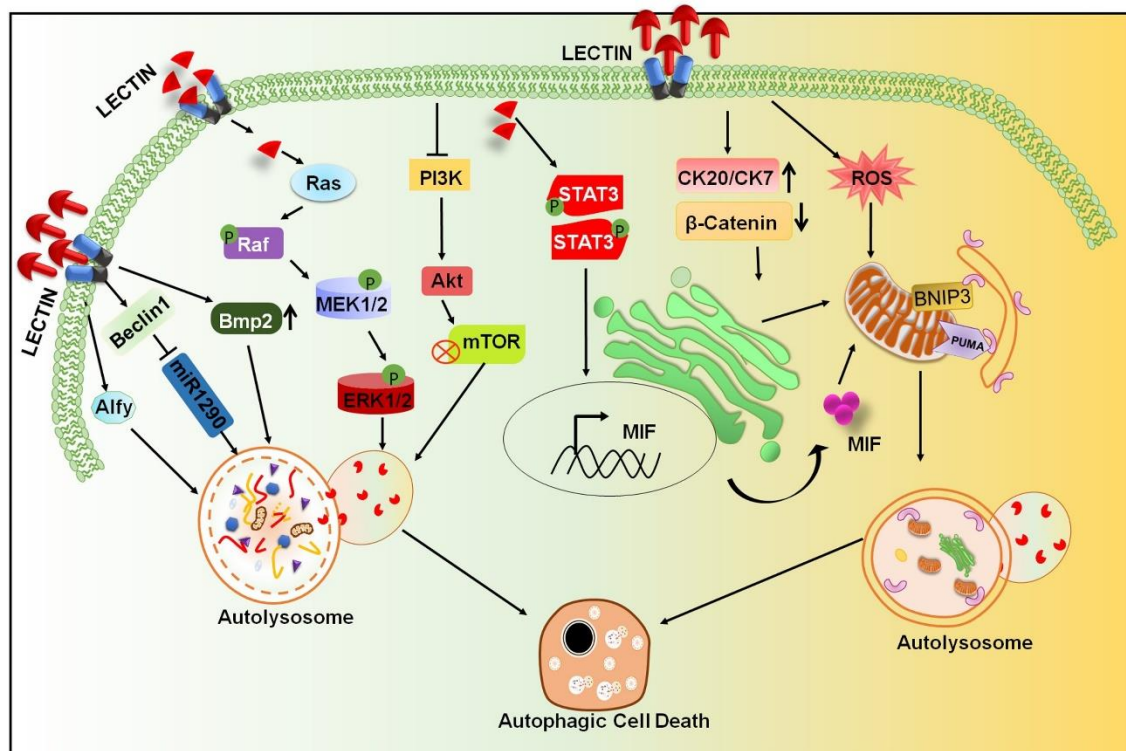
O processo de autofagia é iniciado por meio da nucleação do fagóforo, para tanto um alvo mamífero da rapamicina (mTOR), classificado como um sensor de estresse, é inativado após a indução do estresse celular, resultando na hipofosforilação de Atg13, este por sua vez irá se ligar a Atg1 por meio do auxílio de Atg17. Logo após Atg1 recruta Atg9, que promove a necessidade de lipídios nos fagóforos em extensão. Um complexo de fosfoinosítídeo (PI)-3-quinase de classe III atua auxiliando no alongamento e maturação do fagóforo e produz fosfatidilinositol-3-fosfato (PI3P). A formação do autofagossomo e o alongamento da vesícula são realizados mediante uma conjugação dependente de ATP de Atg12 com Atg7. Posteriormente o Atg12 se liga de forma não covalente ao Atg10 e se liga ao Atg5 e em seguida ao Atg16. O complexo Atg5-Atg12-Atg16 induz a curvatura no fagóforo em crescimento através do recrutamento assimétrico de LC3B processado (WOLIN, 2021; BHUTIA et al., 2019).

Outro sistema semelhante à ubiquitina ocorre por meio da lipidação da cadeia leve 3 associada a microtúbulos (LC3). Para tanto LC3 é clivada proteoliticamente por Atg4, produzindo LC3I, este por sua vez irá se conjugar com Atg7, necessário para sua ativação. Posteriormente, LC3I ativado é transferido para Atg-3 e conjugado com fosfatidiletanolamina (PE) gerando LC3II. Sabe-se que a interação seletiva entre os receptores que residem na membrana do fagóforo com as porções adaptadoras presentes nas organelas ou moléculas sequestradas defende a degradação seletiva. Uma molécula multiadaptadora associada a proteínas ubiquitinadas, denominada com p62/SQSTM1, incita a captação através da interação com LC3. O autofagossomo

então se funde com um lisossomo, produzindo uma estrutura conhecida como autolisossomo, responsável pela degradação do material celular para fornecer nutrientes à célula. A morte celular associada ao excesso de autofagia é conhecida como morte celular autofágica que atua como potencial mecanismo supressor de tumor (Wollin, 2021; BHUTIA et al., 2019)

As lectinas vegetais demonstraram exercer efeitos antitumorais através de processos de autofagia (Figura 18). Para tanto essas proteínas se ligam as glicoproteínas de membranas ligação ao açúcar para entrarem e ativarem a autofagia através da regulação negativa de PI3K/AKT/mTOR e indução da via MEK/ERK. As lectinas podem aumentar a expressão de Beclin-1 e Bmp2 induzindo a autofagia e modulando o crescimento do câncer, ou ainda podem ativar MIF (fator de transcrição), promovendo a autofagia dependente de STAT3-MIF-BNIP3 a fim de inibir tumor e metástase. Estas proteínas podem ainda gerar espécies reativas de oxigênio, que implicará no desenvolvimento da autofagia seletiva através de PUMA, promovendo a morte celular (BHUTIA et al., 2019).

Figura 18- Mecanismos de atuação da Lectina no câncer, por autofagia.



Fonte: BHUTIA et al., 2019.

Muitas lectinas vegetais exibem a capacidade de causar a morte seletiva de células cancerígenas por apoptose ou de atuar como agentes antiproliferativos (KONOZY; OSMAN; DIRAR, 2022). As lectinas de leguminosas, lectinas tipo II de proteínas inativadoras de ribossomo, aglutinina *Galanthus nivalis* (GNA), lectinas de ligação à quitina e lectinas de jacalina compõem o grupo de lectinas com maior número de estudos relacionados a indução da apoptose no câncer.

Sindhura et al. (2017), ao estudar sobre o potencial anticancerígeno da lectina RVL purificada da espécie *Remusatia vivípara*, com ligação de N-glicano de alta manose, foi observado que RVL induziu a apoptose em células de câncer de mama, limitando a motilidade e a invasividade, sendo observado que esta lectina se ligou aos glicanos da superfície celular das células MDA-MB-468 e MCF-7 e exibiu elevado efeito citotóxico mediado por glicídios. Em outro estudo, a lectina oriunda da seiva do fruto de *Praecitrullus fistulosus*, denominada PfLP, demonstrou elevada atividade aglutinante contra eritrócitos tripsinizados de coelho e exibiu papel funcional contra a progressão tumoral, em modelos *in vitro* e *in vivo* (SHIVAMADHU et al., 2017).

Propriedades antitumorais também foram descritas por Pinto-Junior (2019) ao purificar a lectina de sementes de *Dioclea lasiophylla* (mucunã), denominada DlyL, pois provocou a autofagia e apoptose em células de glioma da linhagem C6, configurando uma potente ação antitumoral e antiglioma. Palharini et al. (2017) verificou que a lectina extraída do látex do avelós, ou *Euphorbia tirucalli* (eutirucallina) agiu contra várias linhagens celulares: HeLa, PC-3 (câncer de próstata), MDA-MB-231 (câncer de mama) e MCF-7 (adenocarcinoma de mama), apresentando atividade antiproliferativa nessas células tumorais. Araújo (2015) ao isolar uma lectina das sementes do feijão-da-praia (*Canavalia marítima*) observou que a mesma afetou a viabilidade das linhagens tumorais A549 (adenocarcinoma), 786-0 (câncer renal), HT29 (câncer de cólon) e HeLa (câncer cervical).

Deepa et al. (2012) realizaram tratamento com a lectina da folha de *Morus alba*, MLL, nas células MCF-7 (linhagem celular de câncer de mama humano) e HCT-15 (linhagem celular de adenocarcinoma colorretal humano) e confirmaram alterações morfológicas e apoptose induzidas, confirmadas pela coloração dessas células com corantes específicos (Anexina V e EtBr/laranja de acridina).

Ao longo dos últimos anos, numerosos estudos na literatura demonstraram que a lectina Concanavalina A (ConA), isolada da semente da leguminosa *Canavalia*

ensiformis, pode apresentar atividades antiproliferativas sobre diversas linhagens de células cancerígena (FU et al., 2011; JIANG et al., 2015). Esta lectina pode provocar a morte celular através de via mitocondrial em diferentes células cancerígenas, podendo citar sua atuação nas células da linhagem A375 de melanoma humano, de maneira a aumentar os níveis de citocromo C citoplasmático, o que favorece a estimulação das caspases-3 e 9 a apoptose (WOLLIN, 2021; JIANG et al., 2015; LI et al., 2011).

Nascimento et al., (2018) analisou a atuação da lectina DVL, oriunda da espécie vegetal *Dioclea violácea* frente as linhagens celulares de glioma de rato C6 e percebeu que a lectina induziu a ativação da caspase- 3, assim como a morte celular apoptótica e dano à membrana celular. Também foi observado neste estudo que a lectina aumentou o número de vesículas ácidas e clivagem de LC3, o que indica a ativação de processos autofágicos. A lectina TCLs, purificada dos frutos de tomate (*Solanum lycopersicum*) mostrou moderadas atividades antiproliferativas moderadas contra células de câncer de ascite de Ehrlich, além de também induzir a apoptose, visto que TCLs foi capaz de alterar a morfologia celular (ARFIN et al., 2022).

Pesquisas mostram que as lectinas de leguminosas, como lentilhas (*Lens culinaris*), ervilhas (*Pisum sativum*), favas (*Vicia faba*), soja (*Glycine max*) e grão de bico (*Cicer arietinum*), mostraram-se excelentes promissoras à pesquisa do câncer, uma vez que estas estimulam o sistema imunológico, ligam-se às membranas das células tumorais, reduzindo a proliferação celular e induzem a apoptose (DE MEJÍA; PRISECARU, 2005; FIK et al., 2001). Em seus estudos, Hiremath e colaboradores (2020) isolaram uma lectina (LCL) de *Lantana câmara*, com atividades antiproliferativas para câncer de cólon humano metastático primário, mostrando alta interação com tais células e nenhuma ligação com células saudáveis do mesmo tecido, em outras palavras, LCL atuou como excelente inibidor do crescimento das células HT29.

Em um estudo realizado por Chen e colaboradores (1994), com a lectina das sementes de *Griffonia simplicifolia* (GSLI), observou que esta lectina apresentou toxicidade para dois tipos de células cancerígenas do cólon humano, LS174t e SW1116, em doses de 10 a 160 pg/mL, onde em concentrações acima de 80 pg/mL, se observou que mais de 99 e 90% de LS174t e SW1116, respectivamente, foram mortos. Em 2015, Lacerda isolou uma lectina de sementes de *Phaseolus lunatus* var.

casca de laranja, com alta ação antioxidante, que reduziu a viabilidade de células tumorais de melanoma humano e apresentou atividade gastroprotetora *in vivo* em camundongos.

No trabalho realizado por Araújo et al., (2011), a lectina CrataBL, extraída da casca de *Crataeva tapia* ou trapiá, apresentou não somente efeito anti-inflamatório e analgésico, mas também expressivo efeito antitumoral contra Sarcoma-180, uma linhagem celular de câncer em camundongos. E as lectinas nativa e recombinante da semente de camaratuba (*Cratylia mollis*) induziram a morte de células PC-3 através do comprometimento da integridade da membrana e homeostase mitocondrial (FIGUEIRÔA et al., 2017).

3.5.4. Métodos de purificação de Lectinas

Para avaliar as características bioquímicas e as funções biológicas de uma proteína é necessário ser feito sua separação dos demais constituintes da amostra, sendo de extrema importância selecionar o melhor método de extração, bem como analisar fatores físicos, como a temperatura e pH, visto que essas biomoléculas podem desnaturar quando em presença de temperaturas elevadas ou tampão inadequado. O processo de purificação é classificado como um gargalo no estudo sobre estas macromoléculas, devendo, o pesquisador avaliar os melhores passos metodológicos a serem utilizados, fazendo com que o processo de obtenção de proteína seja produtivo e viável (COSTA, 2018).

As lectinas são proteínas que podem ser oriundas das mais diversas fontes, como microrganismos, animais e vegetais e, portanto, é importante salientar que se trata de um extrato complexo e, na maioria das vezes, de difícil separação (AUGUSTO, 2012).

Para a obtenção do extrato bruto são utilizadas metodologias com processos mecânicos, como trituração ou maceração da fonte proteica, utilizando soluções salinas ou orgânicas. Costa e colaboradores (2018) utilizaram solução tampão Tris-HCl para extraírem as lectinas presentes nas cascas de *Genipa americana*. Wang et al., (2018) utilizou solução de tampão fosfato salino (PBS) na extração da lectina do fungo *Laetiporus sulphureus*. Em seus estudos, Oliveira e colaboradores (2017) utilizaram solução salina de NaCl para extraírem a lectina da espécie leguminosa *Crotalaria spectabilis* R. Enquanto Virgens et al., (2016) utilizaram solvente orgânico, etanol, para extrair a lectina da *Jatropha curcas* L. Para obtenção de bons resultados

no preparo do extrato é importante analisar fatores como manutenção da agitação magnética, controle do pH, temperatura, concentração salina e polaridade de solventes orgânicos (STRYER, TYMOZKO; BERG, 2006).

Após o preparo do extrato é iniciado o processo de purificação, onde é realizado o fracionamento proteico, podendo utilizar sais ou solventes orgânicos. Para a precipitação de lectinas, o procedimento mais utilizado consiste na utilização de sal (salting out), uma vez que a solubilidade proteica é reduzida em meio salino, para tanto o sulfato de amônio é listado como o mais utilizado para esta finalidade devido apresentar características hidrofílicas, sendo capaz de remover a camada de solvatação proteica e consequentemente submetê-las a precipitação e maior interação proteica no meio aquoso (PROCÓPIO et al., 2017). Após esse método, as frações são submetidas a processo de diálise em membranas semipermeáveis, onde estas ficam retidas no interior da membrana, enquanto moléculas pequenas, como os sais ou carboidratos, presentes na amostra são deslocadas para a solução externa a membrana (THAKUR et al., 2007)

Dentre os métodos de purificação conhecidos e empregados atualmente, as cromatografias líquidas demonstram maior refinamento e efetividade para a purificação de proteínas, dentre estas destaca-se as cromatografias de exclusão molecular, também conhecida como gel filtração, troca iônica e afinidade. É sabido que estas técnicas são ferramentas fundamentais na área da proteômica e a sua valorização está relacionado à utilização em setores das indústrias de alimentos, farmacêutica e química.

Na purificação de lectinas pode-se utilizar métodos cromatográficos que utilizam matrizes vinculadas a especificidade aos carboidratos (cromatografia de afinidade), carga líquida (cromatografia de troca iônica) ou tamanho molecular da proteína (cromatografia de gel filtração) (NASCIMENTO, et al., 2012).

A cromatografia de exclusão molecular, também denominada de gel filtração é classificada como uma etapa de purificação que busca separar proteínas e outras moléculas baseando-se em tamanhos variados, além de também ser utilizada para estimar a massa molecular da macromolécula (BURGESS, 2018; COSKUN, 2016) (Figura 19). Devido as esferas (bids) de diferentes tamanhos, presentes na fase estacionária dessas colunas, as proteínas de maior massa molecular são eluidas de forma mais rápida, visto que não entrarão em todos os bids, diferente das proteínas

menos que percorrem um percurso maior e, portanto, são eluidas de forma mais lenta (COSTA, 2018). É importante salientar que alguns fatores são essenciais para a obtenção de uma boa recuperação nesse processo cromatográfico, tais como altura da coluna, volume e concentração e viscosidade da amostra. (NGOC et al., 2015; ODDEPALLY et al., 2013; ZHAO, et al., 2015; NASCIMENTO, et al., 2016).

Na literatura são descritos vários trabalhos de purificação de lectina purificadas a partir da utilização de cromatografias de exclusão molecular. Em um estudo anterior nosso grupo de pesquisa purificou uma lectina da casca da *Genipa* América, GaBL, utilizando esse método. Outros pesquisadores também fizeram uso de cromatografia de exclusão (WANG et al., 2021; SINGH; WALIA; KENNEDY, 2019; SINGH; WALIA; KENNEDY, 2018; SAMAH et al., 2017; WU et al., 2016; RUPACHANDRA et al., 2014).

Outro método cromatográfico muito empregado para a purificação de lectinas são as cromatografias de troca iônica, que consistem em separar proteínas mediante a diferença de cargas. Para isso, a eluição da proteína ocorre por meio da variação do pH ou a concentração de sal da fase móvel de modo a criar um gradiente salino ou de pH (Figura 19) (BKHAIRIA et al., 2016; COSKUN, 2016 FEKETE, 2015).

Nesse método a fase estacionária é formada por uma resina derivada de compostos inorgânicos, resina sintética ou por polissacarídeos, que apresentem cargas. Para tanto, esta coluna deve ser devidamente preparada para aceitação da amostra, que deve possuir carga oposta, pois neste método as proteínas com cargas contrárias as da matriz são retidas enquanto as demais são eluidas durante a lavagem da coluna.

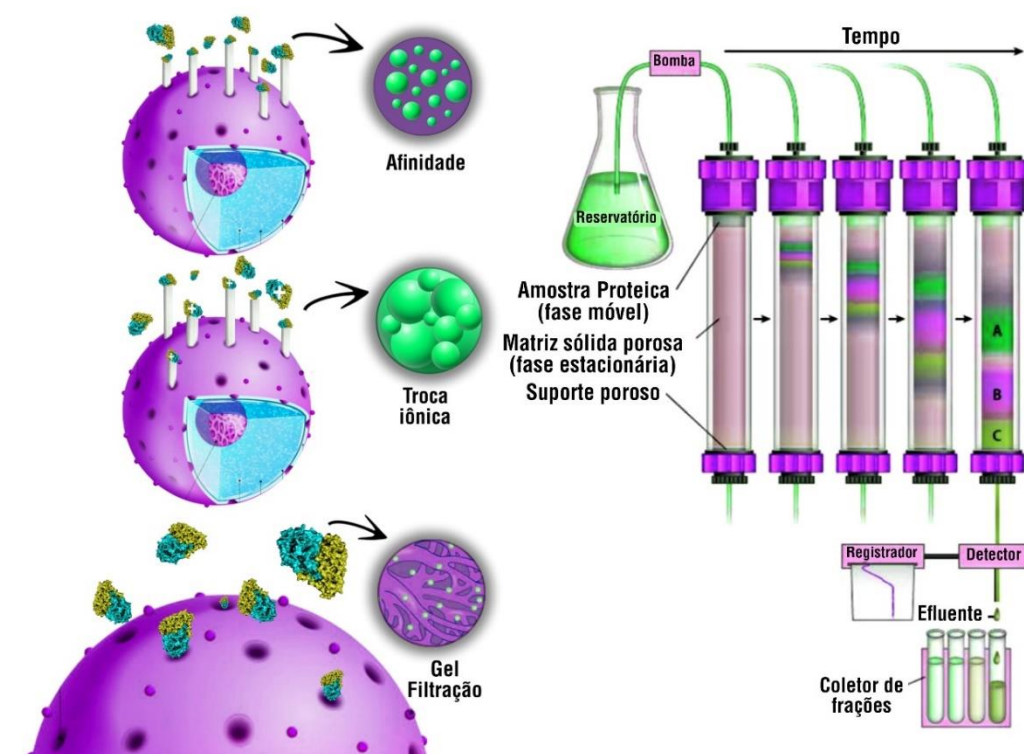
A cromatografia de troca iônica tem sido utilizada em processos de purificação de lectina em virtudes das características apresentadas, tais como método simples de utilização, com alto controle do processo, elevada capacidade, e alto poder de resolução (IMAMICHI et al., 2022; DE SIQUEIRA PATRIOTA et al., 2022; WANG et al., 2021; SINGH; WALIA; KENNEDY, 2019; CHAVES et al., 2018; MARQUES et al., 2017; WU et al., 2016).

Por fim se observa a utilização da cromatografia por afinidade, listada como uma das principais técnicas adotadas para a purificação de lectinas. Dentre as três metodologias, esta é a que apresenta maior recuperação e se mostra mais eficaz para a separação de proteínas, visto que se baseia no biorreconhecimento, favorecendo interação entre o substrato presente na fase estacionária e a proteína alvo, porém,

esta técnica costuma ter maior custo financeiro, quando comparada aos outros dois métodos. (ARORA; SAXENA; AYYAR, 2017; COSKUN, 2016; W.LEE, K., 2004) (Figura 19).

A cromatografia de afinidade não é indicada para extratos muito complexos, tendo em vista o custo relativamente alto da matriz, assim como a alta especificidade pela molécula de interesse no isolamento. A proteína de interesse se liga a matriz através de interações fracas. As proteínas que não possuem afinidade são eluídas juntamente ao tampão de corrida e apenas as proteínas de interesse ficam ligadas a matriz, para serem desligadas se faz necessário um novo eluente com alterações brandas no pH, na concentração de sal ou a utilização de uma molécula com maior afinidade a matriz estacionária que a proteína ligada. (XIU et al., 2015; VASCONCELOS et al., 2015). Muitos trabalhos destacam o uso da cromatografia de afinidade para a purificação de lectinas (HÜTTE et al., 2022; IMAMICHI et al., 2022; KAMEI et al., 2022; DE-SIMONE; PROVANCE, 2021; WANG et al., 2021; HIREMATH et al., 2020; PREETHAM et al., 2020; OLADOKUN et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2016; GOMES et al., 2013; NASCIMENTO; COELHO, 2012).

Figura 19- Esquema ilustrativo das cromatografias. Em A: Exclusão molecular, B: Troca-iônica e C: Afinidade.



Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

CAPÍTULO II

***Genipa americana*- CASCA (GABL)**

Metodologias e Resultados

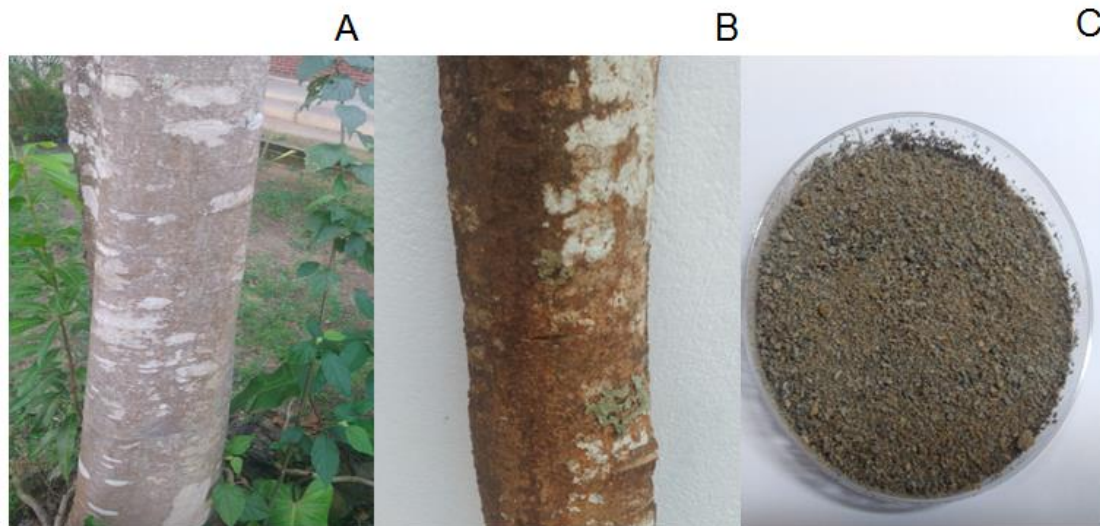
4.1. MATERIAIS E MÉTODOS

CASCA DE GENIPA AMERICANA.

4.1.1. Obtenção e identificação do material

A casca do jenipapo (*G. americana*) foi coletada em Coruripe, região sul do litoral de Alagoas, BR, com a autorização do Sistema Nacional do Patrimônio Genético e Gestão de Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN) (processo número A87C1CC) e uma amostra foi enviada ao Instituto Ambiental de Alagoas (IMA) para identificação, obtendo-se número de registro 64576. O material vegetal foi armazenado, em embalagem plástica e encaminhado para o Laboratório de Metabolismo e Proteômica - LAMP, da Universidade Federal de Alagoas. Em seguida este foi limpo, separado, cortado e triturado em liquidificador até a condição de pó, e então colocado para secagem, em bandejas plásticas esterilizadas, e após foram levadas a estufa a 35°C e permaneceram por 7,0 dias até estarem totalmente secas (Figura 20), o pó foi acondicionado no freezer a -4 °C.

Figura 20- Imagens das estruturas e processos utilizados pra preparação do extrato; A: Caule de *Genipa americana*. B: Casca e C: Pó da casca.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

4.1.2. Preparo do extrato

O pó da Casca de *Genipa americana* foi retirado do freezer e mantido em temperatura ambiente por 30 min. Em seguida foi pesado 10 g do pó, em uma balança analítica (Marte AY220), transferido para um Béquer de 50 mL e adicionados 40,0 mL de solução tampão de extração (Tris- HCl 50 mM pH 8,0). Para a extração dos

compostos, a amostra foi mantida sobre agitação magnética durante 12 h (Agitador magnético, IKA IKAMAG C-MAG HS7), a 4 °C. Decorrido o tempo, a solução foi transferida para um tubo falcon de 50,0 mL e centrifugada (HERMLE- Z236K), durante 5,0 minutos a 15.000 xg, sob temperatura de 4 °C. O sobrenadante foi transferido para um novo recipiente e definido como extrato bruto.

4.1.3. Precipitação salina com sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄)

Após a indicação indireta da presença de lectina no extrato proteico obtido a partir da casca do jenipapo, através da atividade hemaglutinante, realizou-se o processo de purificação da molécula estudada, iniciado pela precipitação salina com sulfato de amônio, como forma de eliminar demais proteínas contaminantes e, concentrar a atividade enzimática numa amostra de maior resolução. O material usado para essa análise foi obtido conforme mostrado no item 4.1.2.

O fracionamento utilizado é mostrado na Tabela 3. As etapas de precipitação foram realizadas a 15.000 xg a 4 °C por 10 min, utilizando centrífuga refrigerada (HERMLE- Z236K).

Tabela 3- Precipitação Salina

Fração (%)	Massa de (NH ₄) ₂ SO ₄ (g)
0- 20	0,106 g/ml
20- 40	0,113 g/ml
40- 60	0,120 g/ml
60- 80	0,129 g/ml
80- 100	_____

Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

4.1.4. Purificação da lectina

A fração que apresentou maior atividade oriunda do fracionamento salino (Precipitado – 20 %) foi aplicado em uma coluna cromatográfica de exclusão molecular Sephacril S-100 (60 mL de leito) (Figura 21), automatizada ao FPLC (ÄKTA Pure M1, GE Healthcare Life Science). Para tanto utilizou-se como tampão de equilíbrio e eluição, Tris-HCl pH 8,0 50 mM (A), a um fluxo de 0,1mL/min em 2 volumes de coluna, sendo coletadas frações de 2 mL, a 25 °C. O equipamento foi monitorado a 280 nm e ao final, as frações foram avaliadas quanto a atividade hemaglutinante (AH).

Figura 21- Coluna de Cromatografica Gel Filtração Sephacril S-100, com amostra de *G. americana*.

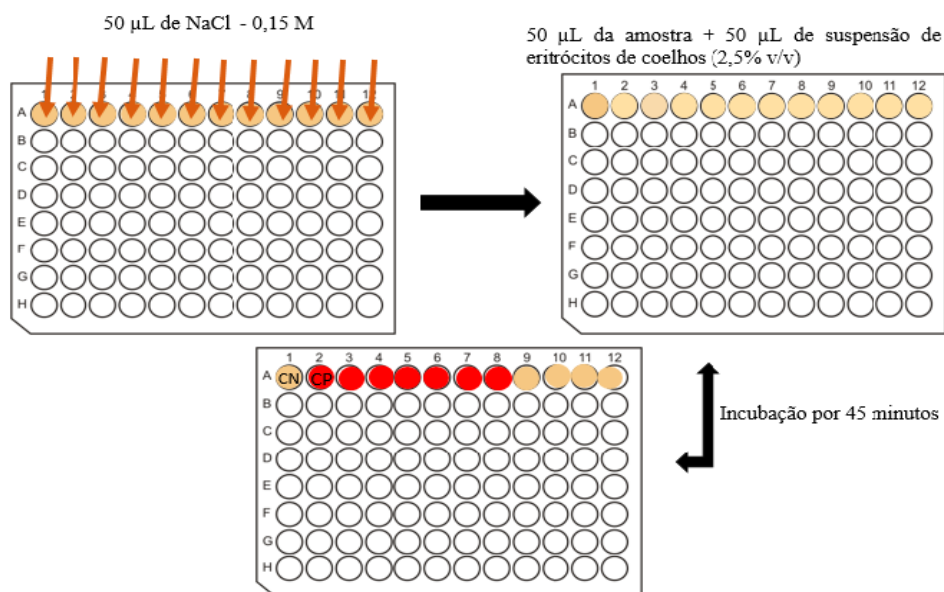


Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

4.1.5. Ensaio de atividade hemaglutinante

O ensaio de atividade hemaglutinante (AH) foi realizado em placas de microtitulação (Figura 22), de acordo com a metodologia descrita por Paiva e Coelho (1992). Alíquota (50 μ L) da amostra foi diluída serialmente em NaCl 0,15 M antes da adição de 50 μ L 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. AH específica (AHE) foi definida pela razão entre o título e a concentração proteica (mg/mL).

Figura 22- Imagem ilustrativa da atividade Hemaglutinante.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

4.1.6. Eletroforese SDS-PAGE e nativa

As eletroforeses foram executadas e a voltagem constante, utilizando gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio, nas condições redutoras e nativas, com géis de 10 e 12 %; 5 % e 15 % (m/v) para os géis de empilhamento e separação respectivamente (LAEMMLI, 1970). Foi utilizado como tampão de amostra Tris-HCl pH 6.8 0.5 M; 2 % SDS; 10 % Glicerol; 5 % 2-Mercaptoetanol; 0,001 % de azul de Bromofenol. As amostras foram aquecidas por 5 min a 100 °C. A massa aproximada da enzima foi estimada com marcador de peso molecular (AmershamTMFull-Range RainbowTM (12000-225000 Da). Quanto a eletroforese nativa, seguimos o mesmo protocolo, sendo que nestas as amostras não foram submetidas a aquecimento, nem foram reduzidas com 2-mercaptoetanol.

Os géis foram corados com azul de coomassie dissolvido em ácido acético a 10 % (v/v), por 4hs e em seguida revelado com solução descorante (10 % ácido acético, 40 % de metanol e 5 0% água destilada).

4.1.7. Determinação da concentração de proteína

A concentração da proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976), usando albumina de soro Bovino como padrão (250-0,009 µg/mL). Para isso 10 µL das amostras diluídas (1:10), adicionados 790 µL de Água e 200 µL de reagente de Bradford. Posteriormente as amostras foram incubadas por 5 min, e medido a absorbância a 595 nm. As unidades correspondentes são (mg/mL) de proteína.

4.1.8. Quantificação de Fenois totais

O teor de fenol total do extrato bruto da casca, F1 20% e GaBL foi determinado utilizando o método de Folin-Ciocalteu com base na redução do reagente de ácido fosfomolibdico-fosfotungstico em um meio alcalino (Morais et al., 1999). O reagente de Folin-Ciocalteu (solução 1: 10 em água destilada, 2 - 5 ml) e carbonato de sódio (75 g l⁻¹, 2 ml) foram adicionados às amostras (0 - 5 ml) e as misturas foram incubadas a 50°C durante 5 min. Após arrefecimento durante 30 min, a absorvância foi medida a 760 nm. O teor de fenol foi determinado com base em uma curva padrão de ácido tânico (9- 6-48 mg.ml⁻¹).

4.1.9. Atividade biológica

4.1.9.1. Ensaio de Viabilidade Celular

O efeito do extrato bruto da casca de *Genipa americana*, da fração, e da lectina pura (GaBL) sobre a viabilidade dos fibroblastos foi avaliado através do ensaio de MTT (MOSMANN, 1983). As células foram semeadas em placas de 96 poços *overnight*, e, em seguida, foram tratadas com diferentes concentrações das amostras (0,5, 1, 5, 10 e 50 µg/mL) por 24 ou 48 horas. Após incubação com o tratamento, 22,5 µL de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma-Aldrich – EUA) (5,0 mg/mL em PBS) foi adicionado em cada poço por 4 horas. Posteriormente, o sobrenadante foi desprezado e 150 µL de DMSO foram adicionados para a solubilização dos cristais de formazan. A absorbância de cada poço foi mensurada utilizando um espectrofotômetro de placas e a densidade óptica foi calculada através da seguinte fórmula: (DO das células tratadas/DO das células não tratadas) X 100.

4.1.9.2. Ensaio do Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado (TTPA)

O ensaio de TTPA foi avaliado pela interferência das proteínas em estudo, no tempo de coagulação do plasma de camundongo, que foi adquirido no biotério da escola paulista de medicina (UNIFESP), segundo a metodologia descrita por De Andrade Luz et al. (2013). Nos ensaios foi usado plasma de camundongo sexo masculino em boas condições de saúde, segundo o Comitê de Ética da Universidade Federal de São Paulo, número CEP 1793/11, de acordo com a legislação federal brasileira. O plasma coletado por punção venosa não-traumática, foi transferido imediatamente para o tubo contendo anticoagulante citrato de sódio 100 mM, ocorrendo a separação imediata do plasma do concentrado de hemácias por centrifugação a 3000 x rpm por 5 minutos.

Os testes foram realizados com GabL, em concentrações crescentes em mg/mL (0,056, 0,11, 0,14, 0,22, 0,26, 0,36, 0,55 e 1,1), tendo como controle negativo uma solução salina (NaCl 0,15 M), e como controle positivo Heparina (12,5 U) (liquemine® – Roche). Os resultados foram expressos pelo tempo para formação do coágulo, em segundos.

4.1.9.3. Ensaio do Tempo de Protrombina (PT)

Coleta, materiais, soluções tampões utilizados são idênticos aos utilizados na avaliação do APTT. 50 µL das alíquotas foram adicionados à 50 µL de plasma, separadamente. A solução foi mantida por 300 segundos a 37°C. Decorrido o tempo adicionou-se 100 µL de tromboplastina cálcica previamente incubada a 37°C. Então o cronômetro foi acionado e a contagem encerrada imediatamente após a formação do coágulo. Controles negativos foram feitos contendo apenas uma solução salina (NaCl 0,15 M), e como controle positivo Heparina (12,5 U) (liquemine® – Roche). Os resultados foram expressos pelo tempo para formação do coágulo, em segundos, segundo a metodologia descrita por (DE ANDRADE LUZ et al., 2013).

4.1.9.4. Cultura de células e tratamento

As células B16, A431 e SCC-9 foram adquiridas comercialmente (ATCC, USA). Estas foram estocadas em ultra freezer a -80°C e criopreservadas em solução específica. Para utilização nos ensaios, foram cultivadas a 37 °C em 5 % de CO₂ em mistura de nutrientes F12 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) suplementado com 400 ng/ml de hidrocortisona (Sigma, St. Louis, MO) e soro fetal bovino a 10 %.

4.1.9.5. Ensaio de viabilidade celular

As células foram semeadas em uma placa de 96 poços a uma densidade de 1×10^4 células/ poço, cultivadas por 12 h abaixo de 37 °C em 5 % de CO₂, então tratadas com diferentes concentrações (1, 5 e 10 µg/ml) de GaBL por 24h. Ao final do tratamento, MTT (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio brometo) (Sigma-Aldrich - EUA) (5 mg/mL em PBS) foi adicionado, e as células foram incubadas por mais 4 horas. Dimetilsulfóxido (DMSO; 200 µl) foi adicionado a cada poço após a remoção do sobrenadante. Após agitar a placa por 10 min, a viabilidade celular foi avaliada medindo a absorbância a 490 nm usando um Enzyme-labeling instrument (EX-800 type); todas as medidas foram realizadas em triplicata. A curva de crescimento celular foi concluída usando o tempo como abcissa e valor A (média ± DP) como ordenada.

4.1.9.6. Ensaios de migração celular

As células foram semeadas em placas de seis poços em diferentes concentrações e as placas foram incubadas durante a noite a 37 °C em uma atmosfera umidificada com 5 % de CO₂. Uma vez que uma monocamada confluenta se formou, uma ferida reta de aproximadamente 1 cm de comprimento foi criada no centro do poço usando uma ponta de pipeta P200 estéril. Após a raspagem, a mídia foi lentamente aspirada e descartada, e os poços foram lavados com meio de crescimento (1 mL) para remover os resíduos e alisar a borda da raspagem. Após a lavagem com solução salina balanceada de Hanks (HBSS), meio fresco foi adicionado às células com ou sem GaBL (10 µg/ ml). As placas foram então incubadas a 37 °C em 5 % de CO₂ por até 24 horas. Durante a incubação, as placas foram monitoradas periodicamente usando microscopia de contraste de fase para determinar o tempo necessário para que as células em migração fechassem completamente a ferida. A medição da ferida foi obtida medindo-se a largura da lacuna em cinco pontos no centro da ferida, usando uma grátula ocular com escala micrométrica. Após 24 horas, as células foram lavadas duas vezes com HBSS e fixadas com metanol gelado a -20 °C durante 30 minutos. Após a fixação, as células foram então hidratadas com duas lavagens em PBS e contra-coradas com solução de Haematoxilina Harris. Em seguida, foram lavados brevemente em água corrente da torneira antes que o excesso de água fosse drenado por 1 minuto e as placas deixadas para secar em temperatura ambiente. As placas resultantes foram vistas em um microscópio de dissecação Nikon (Nikon, C D55230, Japão) e imagens digitais foram adquiridas para cada amostra.

4.1.9.7. Coloração fluorescente AO / EB dupla

Coloração fluorescente dupla de laranja de acridina/ brometo de etídio (AO/EB), visualizada sob um microscópio fluorescente, pode ser usado para identificar alterações associadas à apoptose das membranas celulares durante o processo de apoptose. Este método também pode distinguir com precisão células em diferentes estágios de apoptose. Aqui, apresentamos um método simples para identificar a apoptose celular. A coloração dupla AO/EB foi usada para examinar a apoptose em uma linha de células de câncer oral humano tratada com GaBL (10 µg/ml). As amostras em uma placa de 96 poços foram divididas em 2 grupos, com amostras de

24 poços em cada grupo correspondente a diferentes concentrações de reagentes. Solução de coloração fluorescente dupla (1 µL) contendo 100 µg/ ml de AO e 100 µg/ ml de EB (AO / EB, Sigma, St. Louis, MO) foi adicionado a cada poço. A morfologia das células apoptóticas foi examinada e 500 células foram contadas em 20 min usando um microscópio fluorescente. O método da coloração dupla de laranja de acridina / brometo de etídio (AO / EB) foi repetido 3 vezes pelo menos.

4.1.9.8. Isolamento de RNA e PCR em tempo real

O RNA foi isolado do tecido tumoral usando o reagente TRIzol (GIBCO Invitrogen), de acordo com o fabricante. O RNA total foi transcrito reversamente e o cDNA subsequente foi aquecido a 95 °C para terminar a reação. Para PCR em tempo real, 2 µl do cDNA foram adicionados a TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) com o HIF-1 $\pm$, Ecadherin, Col1A, Caspase- 3 - conjunto de primer / sonda específico (Applied Biosystems); a amplificação foi realizada em um Sistema de detecção de sequência ABI 7000. Todas as reações foram feitas em triplicata, e 18S rRNA serviu como um controle interno. Os resultados foram quantificados como valores de Ct, em que Ct foi definido como o ciclo limite de PCR em que o produto amplificado é detectado pela primeira vez e definido como expressão relativa do gene (a razão de alvo / controle).

4.1.9.9. Análise estatística

Os dados foram apresentados como as médias $\pm$ DP. A significância estatística foi determinada usando Teste t de alunos e ANOVA. As diferenças foram consideradas significativas quando os valores P foram <0,05.

4.2. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os dados referentes a purificação da lectina GaBL foram publicados no periódico *International Journal of Biological Macromolecules*, como mostrado no anexo 1 desta tese.

4.2.1. Preparo do extrato bruto e precipitação salina

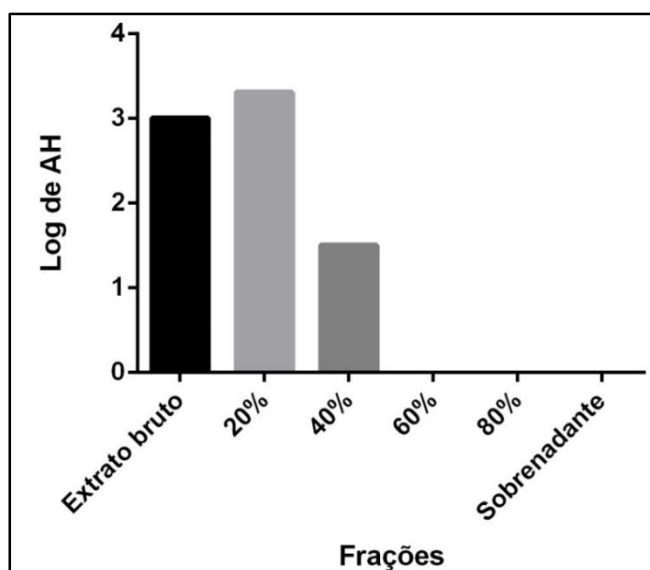
O extrato bruto (EB) da casca *G. americana* apresentou concentração proteica equivalente a 24 mg/ mL, com atividade hemaglutinante específica igual a 640. Visando concentrar a proteína de estudo, este extrato foi fracionado utilizando sulfato de amônio em cinco frações, sendo observado que a fração 20% (F1) foi responsável pela maior atividade hemaglutinante específica (1.561) (Tabela 4, Figura 23).

Tabela 4- Fracionamento com Sulfato de Amônio.

Frações da Precipitação	Quantificação de Proteínas – Bradford	Atividade Hemaglutinante – AH
Extrato Bruto	0,800 (25 mL)	1024
F1- 0-20% (Precipitado)	1.312 (2,5 mL/ 25 mL)	2048
F2- 20-40% (Precipitado)	0,846 (2,5 mL/ 24 mL)	32
F3- 40-60% (Precipitado)	0,531 (2,5 mL/ 23 mL)	0
F4- 60-80% (Sobrenadante)	0,503 (1,0 mL/ 22 mL)	0
F5- 80-100% (Sobrenadante)	0,255 (22 mL)	0

Fonte: elaborado pelo autor (2022)

Figura 23- Fracionamento com Sulfato de Amônio, frações com que apresentaram atividade hemaglutinante.



Fonte: elaborado pelo autor (2022).

Ao analisar os dados contidos na Tabela 4 e a imagem 23 percebe-se que o método utilizado demonstrou alta eficácia, uma vez que a atividade hemaglutinante foi preservada, em maior percentual, na fração 20%. A utilização de sulfato de amônio como pré-purificação tende a favorecer as demais etapas de purificação de lectina, visto que essa metodologia não requerer uma diálise do conteúdo proteico para os ensaios de atividade hemaglutinante. Este resultado corrobora com outros estudos descritos na literatura, como os de Kocazorbaz et al., (2021) e Akev; Candoken; Kuruca (2020) que utilizaram o mesmo método de precipitação para isolar a lectina do bulbo de *Cyclamen mirabile* e da casca de *A. vera*, respectivamente.

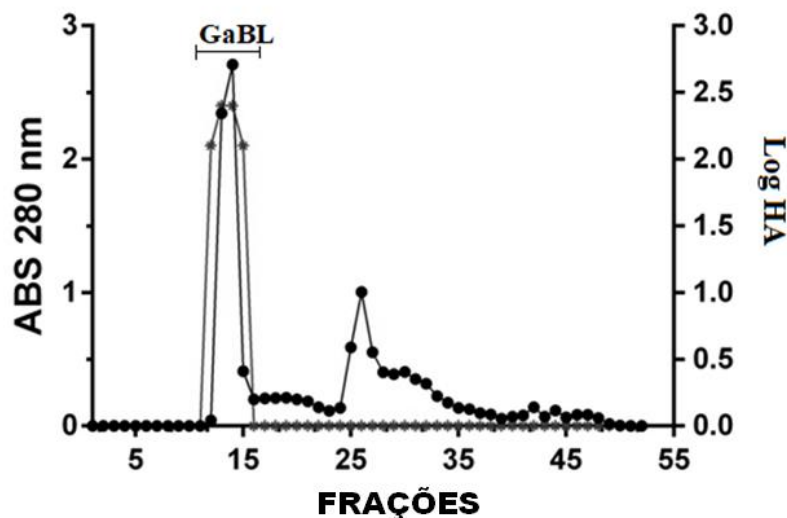
A partir dos ensaios para determinação de composto fenólicos, foi observado que o extrato e a fração F1 apresentaram conteúdo de fenol equivalentes a 6,59 e 14,85 mM, respectivamente. Desta maneira percebe-se que a precipitação salina também concentrou o conteúdo de fenóis, presentes no extrato. Porém estes foram eliminados no processo cromatográfico.

4.2.2. Purificação da lectina GaBL

Constatada a maior atividade hemaglutinante interligada ao aumento da concentração da lectina, a fração F1 foi submetida a cromatografia de exclusão molecular, com coluna Sephacryl S-100 equilibrada com Tris-HCl 0,05 M pH 8,0.

Ao observar o cromatograma da Figura 24, verifica-se que o método cromatográfico apresentou um excelente perfil de eluição, com alta resolução, sendo constatado a presença de um pico proteico com HA (atividade hemaglutinante específica de 1.838).

Figura 24- Perfil cromatográfico da Exclusão Molecular Sephacril S-100. *Atividade Hemaglutinante de GaBL (Genipa americana bark lectin). • Leitura da abs 280 nm (Perfil Proteico).



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

A Tabela 5 resume o processo de purificação, na qual se observa que GaBL foi purificada com eficácia utilizando apenas dois processos, sendo um para concentrar a proteína (precipitação salina) e um outro cromatográfico (exclusão molecular), de modo a ocorrer um aumento na atividade hemaglutinante específica mediante as etapas de purificação, com rendimento de purificação de 100 % e 2,9 vezes em relação ao extrato bruto.

Tabela 5- Purificação lectina da casca de Genipa americana.

Amostra	AH	Proteína (mg/mL)	AHE	Fator de purificação	Rendimento (%)
Ex. Bruto	512	0,8	640	1	100
F0-20	2048	1,312	1561	2,4	40
GaBL	1024	0,557	1838	2,9	100

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

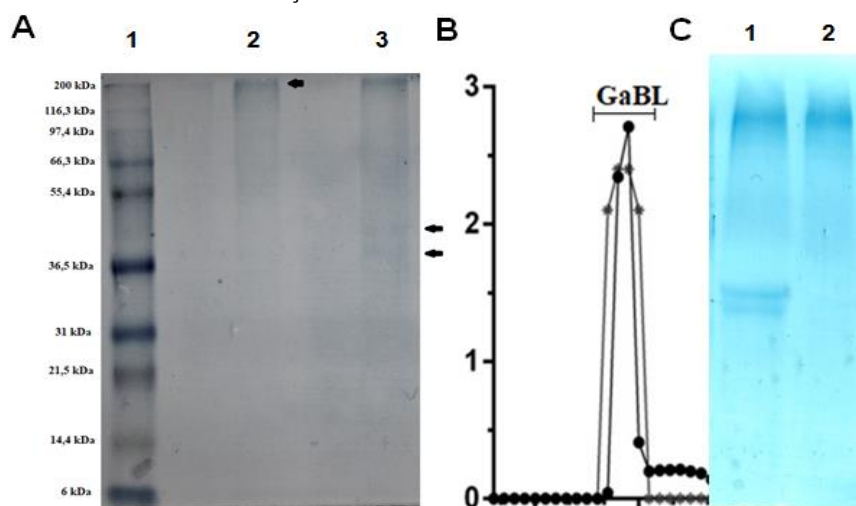
Outras lectinas de origem vegetal também foram purificadas usando apenas um passo cromatográfico, como é o caso da lectina extraída de sementes de *Collaea speciosa* que foi purificada utilizando cromatografia de exclusão molecular com matriz Sephadex G-50. (OLIVEIRA et al., 2021). Kocazorbaz et al., (2021) purificou a lectina do bulbo de *Cyclamen mirabile*, por meio de cromatografia de afinidade com

alginate. Oliveira e colaboradores (2021) purificaram a lectina extraída de sementes de *Collaea speciosa* (CsL) utilizando cromatografia de afinidade em Sephadex G-50.

4.2.3. Eletroforese SDS-PAGE

Após a etapa cromatográfica, as frações que apresentaram maior atividade hemaglutinante foram submetidas ao método de eletroforese SDS-PAGE, a fim de analisar o perfil de proteínas e consequentemente sua massa molecular aparente (Figura 25). É importante ressaltar que essa metodologia foi efetuada em condições redutoras e nativas, como descrito no item 2.1.6, a fim de avaliar se a proteína de interesse apresentava subunidades.

Figura 25- A: SDS- PAGE a 12%. As linhas 2-3 correspondem à fração 14. A eletroforese foi processada a voltagem constante (90 mV), e as bandas coradas com Comassi Blue. B: Pico proteico, fração 14 com atividade exportada do cromatograma. C: Gel de Eletroforese SDS- PAGE 10%. 1 GaBL Condições redutoras. 2 GaBL em condições não redutoras.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Os resultados expressos na Figura 25A mostram um gel de eletroforese a 10 %, com aplicabilidade nas canaletas 1-3, onde a canaleta 1 caracteriza-se pela presença do marcador molecular, a segunda canaleta pela lectina purificada (GaBL) em condições não redutoras, onde se observa uma única banda proteica de alto peso molecular, e a terceira canaleta, GaBL em condições redutoras apresentando subunidades proteicas. Na Figura 25B é verificado a presença do pico protéico de proteína, mostrando a eluição de GaBL no início do gradiente da coluna de exclusão molecular. Na Figura 25C é apresentado um novo gel de eletroforese a 12 %, onde se observava, na primeira canaleta a lectina (GaBL), em condições redutoras e na

segunda canaleta a Lectina (GaBL), em condições não redutoras, confirmando seu alto peso molecular. A determinação da coloração das proteínas foi realizada usando o corante Comassie Brilliant Blue, que se dá por meio de interação eletrostática com os grupamentos amino de peptídeos e proteínas, permitindo a detecção de até 0,5 µg/cm² de produto no gel (SYROVY e HODNY, 1991).

Através da metodologia de cromatografia de exclusão molecular foi possível purificar a lectina da casca de *G. americana* (GaBL), com 100% de rendimento. GaBL apresentou elevada massa molecular de aproximadamente 242,5 kDa, formada por um heteromultímero ligado por ligações dissulfeto nas duas subunidades de 42,1 e 38,4 kDa (Figura 25C). Consoante a este resultado, destacamos os trabalhos de Arfin et al., (2022) que isolaram uma lectina ligante de quitina de frutos de tomate (*Solanum lycopersicum*- TCLs) com massas moleculares de cerca de 115 KDa e De Siqueira Patriota e colaboradores (2022), purificaram uma lectina presente nas sementes de *Aesculus hippocastanum* (AhSL) com massa molecular equivalente a 68 e 124 KDa. Lectina das sementes de *Araucaria brasiliensis* (200 kDa) (DATTA et al., 1991).

Essas proteínas apresentam massa molecular amplamente variadas, como as lectinas de *Chenopodium álbum* (CaLec), *Collaea speciosa* (CsL), *Myracrodruon urundeuva*, *Crataeva tapia* e *Sebastiania jacobinensis* com 35 e 19, 25, 14, 40 e 52 kDa, respectivamente (JAVED et al., 2022; OLIVEIRA et al., 2021; SÁ et al., 2009; VAZ et al., 2010; ARAÚJO et al., 2012). Desta forma é importante salientar que o alto peso molecular de GaBL pode oferecer a esta lectina características estruturais únicas e funções diferentes.

4.2.4. Concentração de fenóis totais

Os resultados referentes a concentração de fenóis totais sugerem que, o alto rendimento obtido no procedimento de purificação de GaBL provavelmente reflete a eliminação total de fenóis presentes no extrato bruto e na fração F1, após a etapa cromatográfica, como mostrados Tabela 6.

Tabela 6- Concentração de fenóis totais da casca de Genipa americana.

Amostras	Concentração de fenóis
	Ácido Fólico mM
Casca	6.590 mMol
F1- 20%	14.850 mMol
Lectina – GaBL	-----

Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

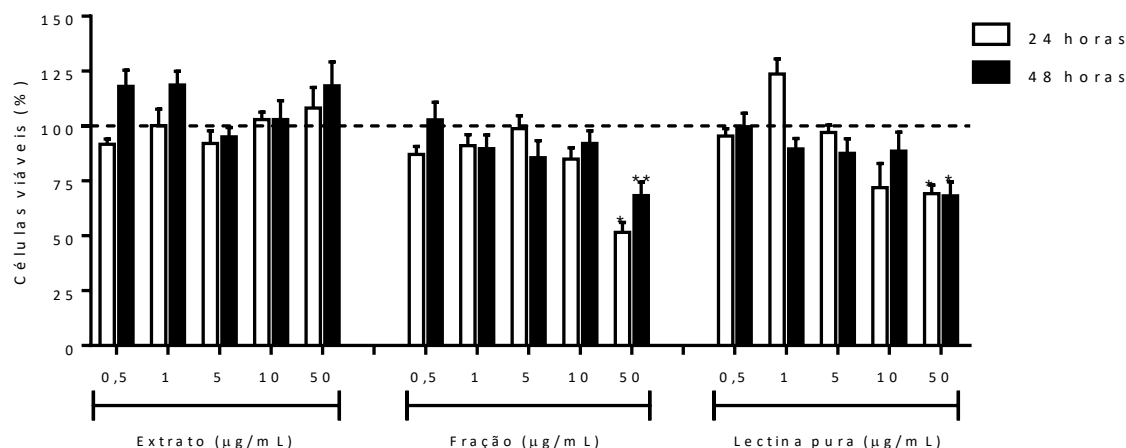
Jakobek (2015) descreve que a presença de lipídios e/ou polifenóis, como os taninos, em tecidos vegetais podem levar a formação de complexos com as proteínas, interferindo assim na sua atividade biológica (JAKOBEK, 2015). Em um estudo realizado por De Araújo et al., (2012) foi verificado que os compostos fenólicos, presentes no extrato bruto, foram eliminados durante o processo de purificação da proteína. Desta forma, é importante que seja realizado testes de inibição com glicídios, a fim de se confirmar a real atividade hemaglutinante.

4.2.5. Atividades biológicas

4.2.5.1. Teste de Citotóxico e Viabilidade Celular

O nível de citotoxicidade e a viabilidade celular foi para o extrato bruto, fração F1 e a lectina pura (GaBL) para as células de fibroblastos 3T3, por MTT Como apresentado na Figura 26.

Figura 26- Efeito da lectina pura, do extrato bruto da casca de Genipa americana e da fração sobre a viabilidade de fibroblastos 3T3 em 24 e 48 horas. As barras representam a média $\pm$ EPM. A linha tracejada representa o grupo controle (tratado com meio de cultivo DMEM). ANOVA one-way seguido do pós-teste de Newman-Keuls, *p < 0,05 e **p < 0,001 (Controle vs. tratamento).



Fonte: Elaborado pelo autor (2018).

Ao analisar os dados contidos da Figura 26, fica perceptível que o tratamento realizado durante os tempos de 24 e 48 horas, com o extrato bruto da casca de *G. americana*, em todas as concentrações testadas, não alterou significativamente a viabilidade celular. Porém, observa-se que, F1, na concentração de 50 µg/mL, houve uma redução na viabilidade de cerca de 48,4% ($p < 0,001$) e 31,7% ($p < 0,05$) nos tempos de 24 e 48h, respectivamente. Nas demais concentrações, a fração não ocasionou alterações na viabilidade celular.

Quando as células foram expostas a lectina pura, observou-se um perfil semelhante sobre a viabilidade quando comparado ao tratamento com a fração. O tratamento por 24 h com a lectina pura nas concentrações de 0,5, 1 e 5 µg/mL não alterou a viabilidade dos fibroblastos. Entretanto, as células tratadas com 50 µg/mL da lectina apresentaram uma redução de 31% ($p < 0,05$) na viabilidade celular. Um efeito semelhante sobre a viabilidade foi observado no tratamento por 48 h com a lectina (32%, $p < 0,05$). Esses dados estimulam a avaliação do potencial citotóxico desta lectina contra células cancerosas em concentrações abaixo de 50 µg/mL.

Ao estudar a citotoxicidade da lectina extraída da polpa madura da banana (*Musa paradisiaca*) (BanLec) contra as linhagens celulares Vero, HepG2 e THP-1, observou-se que em concentrações de 244,38 µg/mL e 504,83 µg/mL, BanLec mostrou efeito citotóxico contra as células de leucemina THP-1 e hepatocarcinoma humano, HepG2, respectivamente. Casul, ao ser avaliada quanto a viabilidade das células K562 e T47D em quantidades menores que 100ug/ml, não apresentou efeito citotóxico. Dessa forma se faz necessário destacar que o grau de citotoxicidade das lectinas é geralmente variável e seu potencial para uso efetivo como agente antitumoral é dependente de sua especificidade com as células de câncer em comparação com as células normais (PROCÓPIO, et al., 2017).

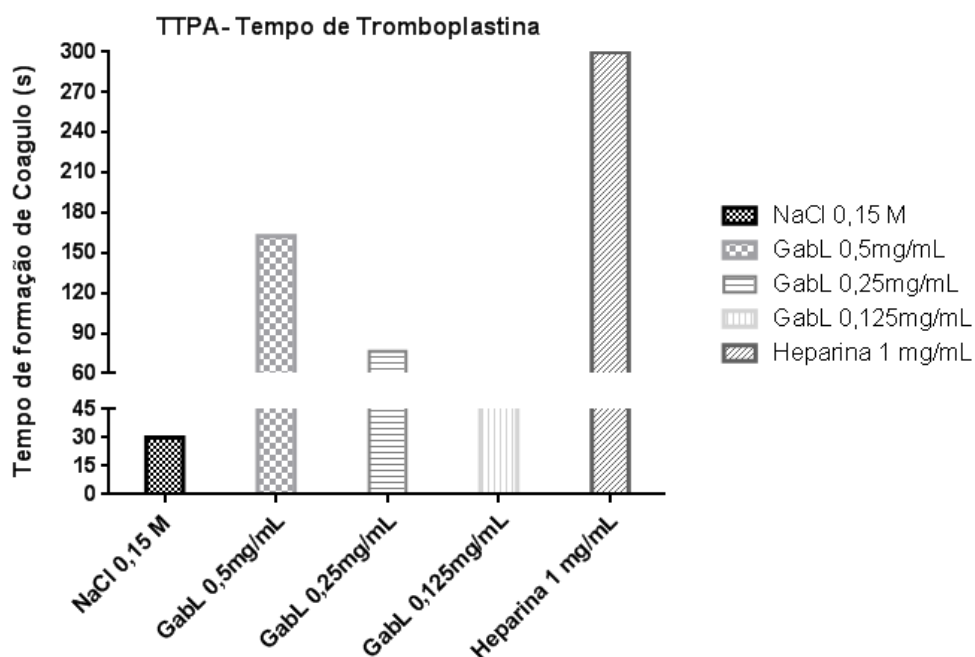
Diante dos dados mostrados é perceptível o elevado potencial de GaBL, quando comparado com outras lectinas. GaBL se mostra como uma interessante molécula a ser estudada, contra novas linhagens celulares, principalmente em linhagens carcinogênicas.

4.2.5.2. Ensaio do Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado (TTPA) e da atividade da Protrombina.

A influência de GaBL na coagulação sanguínea foi determinada pelo tempo de tromboplastina parcial ativada (PTTA) e tempo de protrombina (PT), como mostrado nas Figuras 27 e 28.

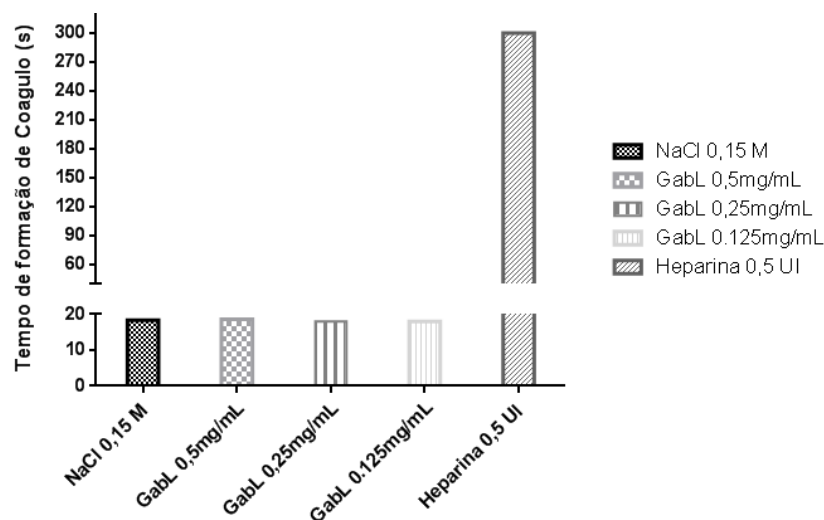
O ensaio de TTPA foi avaliado pela interferência das proteínas em estudo GaBL no tempo de coagulação do plasma de camundongo. Os resultados apresentados na (Figura 27) demonstra que GaBL apresenta uma significativa capacidade em alterar o tempo normal de coagulação, nas concentrações testadas (0,125; 0,25 e 0,5 mg/ mL). Vale ressaltar que, na concentração de 0,5 mg/ mL, GaBL apresentou valores semelhantes a Heparina, prolongando o tempo de coagulação circunstancialmente. Entretanto, quando avaliado tempo de protrombina (TP) (Figura 28), não observadas mudanças com significância estatística, o TP permaneceu dentro dos limites normais, o que demonstra apenas uma ação de GaBL, apenas na via intrínseca.

Figura 27- Avaliação da interferência das proteínas em estudo GaBL no tempo de coagulação do plasma de camundongo.



Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Figura 28- Avaliação do tempo de TP pela interferência das proteínas em estudo (GabL).



Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Nos ensaios laboratoriais *in vitro*, a cascata de coagulação corresponde a ativação dos diversos fatores de coagulação que proporciona a conversão final do fibrinogênio em fibrina através da ação da trombina. Desta forma as lectinas atuam nessas vias, pois têm a capacidade de se ligar a esses domínios de fatores e bloquear efetivamente as interações dependentes de carboidratos, afetando a amplificação da cascata de coagulação (MORITA, 2005).

É importante descrever sobre a importância das pesquisas que visam descobrir possíveis inibidores naturais do fator Xa, que compõem a classe de fármacos classificados como anticoagulantes orais diretos (DOACs), altamente utilizados para substituir os antagonistas de vitamina K (AVK), que atualmente é a principal escolha para o tratamento de distúrbios trombóticos. Porém é sabido que os AVK apresentam muitos efeitos colaterais, como sangramentos espontâneos, exigindo monitoramento laboratorial de rotina em pacientes que fazem seu uso. Além disso, são um dos medicamentos que apresentam maior incidência de risco de vida relacionada a medicamentos. Além de possuírem estreito índice terapêutico, possuem alta predisposição a interações com alimentos e outros medicamentos, aumentando as chances de super ou subanticoagulação, o que aumenta os riscos de eventos hemorrágicos ou trombóticos (DI MINNO et al., 2017). Ao contrário do que se observa com os DOACs, que demonstram segurança e eficácia frente aos antagonistas da vitamina K. (GROSS; WEITZ, 2008; SAMUELSON et al., 2017).

Silva e colaboradores (2012) conseguiram purificar uma lectina oriunda das sementes de *Bauhinia forficata*, a partir da utilização métodos cromatográficos, com propriedades anticoagulantes e antiplaquetárias. Em outro estudo foi determinado a atividade coagulante da lectina extraída das folhas de *Phthirusa pyrifolia*, para tanto foi analisado o tempo de tromboplastina parcial ativado (APTT) e tempo de trombina (TT) via extrínseca (Costa et al., 2017). A lectina da planta *Moringa oleifera*, cMoL, apresentou elevada atividade anticoagulante através do prolongamento do TTPa e do TP, nas concentrações testadas (DE ANDRANDE LUZ et al., 2014).

A seguir serão descritos os resultados da metodologia anticancerígena de Lectina purificada da casca de *G. americana* L. Estes resultados foram patenteados, como consta no anexo 2, desta tese.

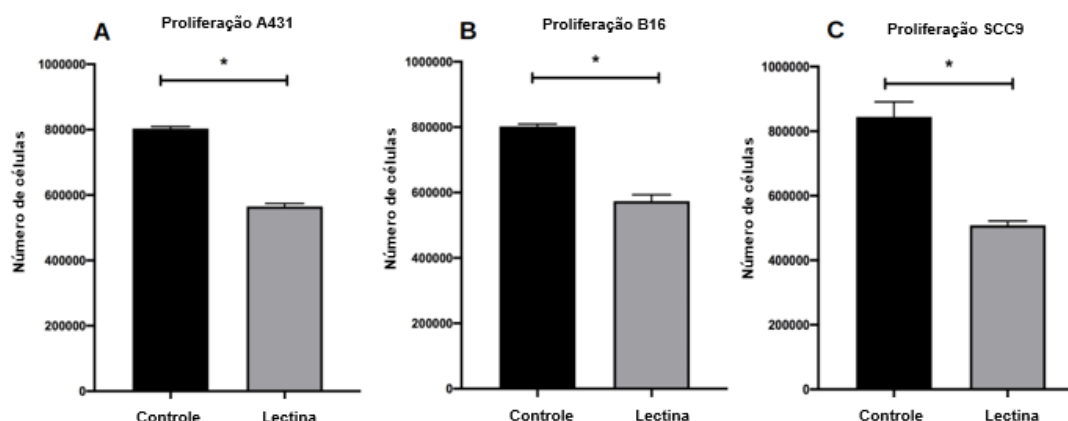
4.2.5.3. Atividade Anticancerígena da Lectina (GaBL): redução da proliferação celular

Para elucidar se a lectina contribui para a inibição do ciclo celular foi realizado o ensaio de proliferação nas células A431, B16 e SCC9 tratadas com 10 µg/ ml de lectina por 24h. A lectina diminuiu significativamente a porcentagem de células tratadas. Após o tratamento com lectina por 24 h, a proliferação diminuiu drasticamente em A431, B16 e SCC9 em concentrações de 10 µg/ ml (Figura 29). Estes resultados indicam que a lectina induz um efeito antiproliferativo nas células cancerosas.

Estes resultados corroboram com outros autores que demonstraram a ação antiproliferativa das lectinas, como os listados por Arfin e colaboradores (2022) que demonstraram que a lectina TCLs, purificada dos frutos de tomate (*Solanum lycopersicum*) mostrou moderadas atividades antiproliferativas contra células de câncer de ascite de Ehrlich, além de também induzir a apoptose, uma vez que a lectina se mostrou capaz de alterar a morfologia celular. Hiremath e colaboradores (2020) isolaram uma lectina (LCL) de *Lantana câmara*, com atividades antiproliferativas para câncer de cólon humano metastático primário. Wu e colaboradores (2016) demonstraram que a lectina purificada das sementes de *Phaseolus lunatus* (Lunatin), apresentou efeito antiproliferativo frente as linhagens de células tumorais HepG2 e

HeLa e para K562 células de leucemia em diferentes graus. Em outro estudo, a lectina extraída do látex do avelós, ou *Euphorbia tirucalli* (*eutirucallina*) atuou frente as linhagens celulares, HeLa, PC-3 (câncer de próstata), MDA-MB-231 (câncer de mama) e MCF-7 (adenocarcinoma de mama), apresentando atividade antiproliferativa nessas células tumorais (PALHARINI et al.,2017).

Figura 29- Efeito da lectina (GaBL) no número de células cancerosas A431, B16 e SCC9. *Significado estatístico.



Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

4.2.5.4. Lectina (GaBL) reduz a migração e invasão de células cancerosas

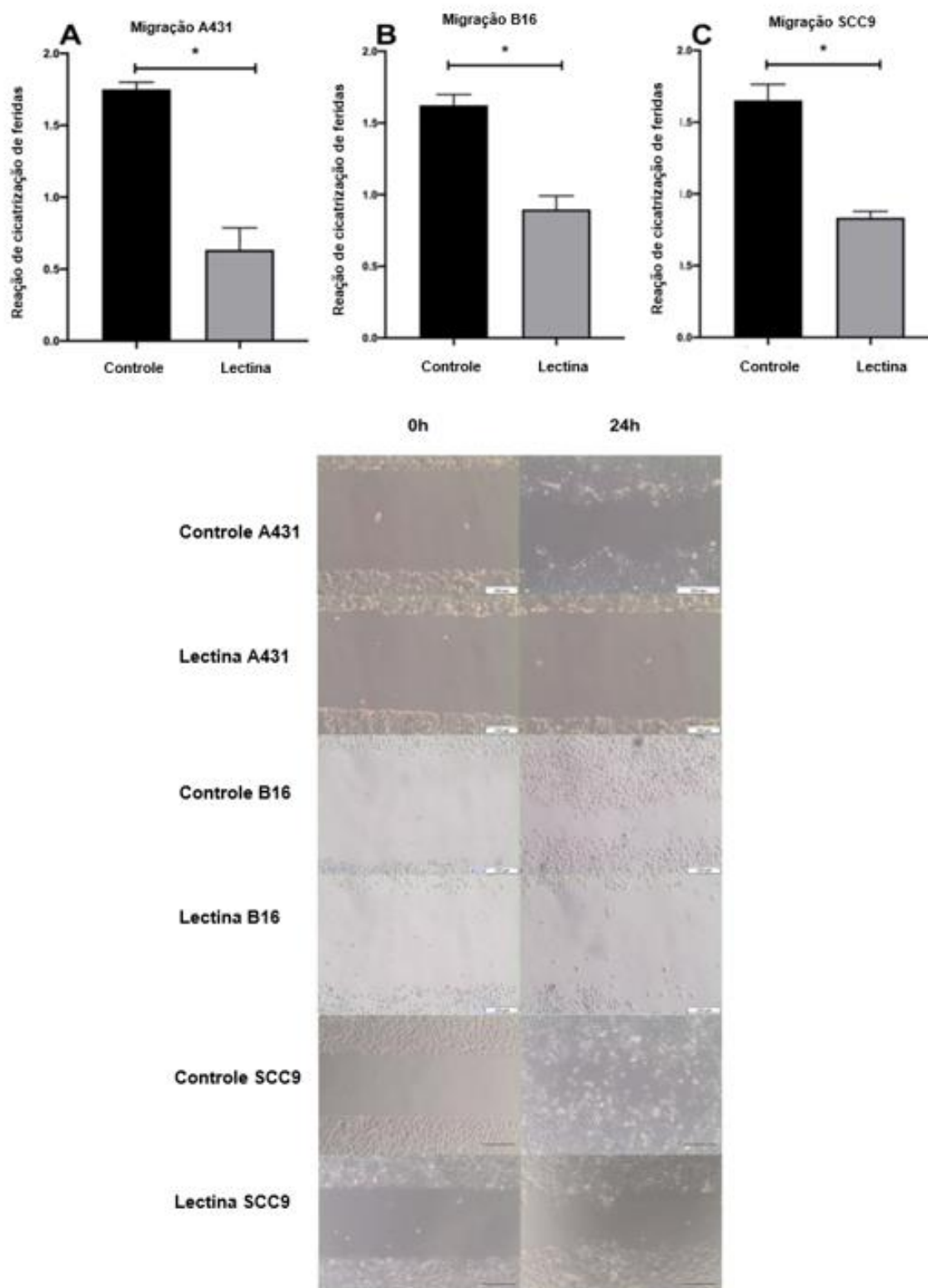
O ensaio de arranhão de feridas foi realizado nas células cancerosas. Os ensaios de migração celular foram realizados com monocamadas confluentes de células humanas A431, B16 e SCC9 tratadas com GaBL, que foram mecanicamente arranhadas e subsequentemente permitidas para repovoar as áreas livres de células feridas. A aplicação de lectina resultou em uma diminuição significativa do fechamento da área de arranhão, consistente com a diminuição da migração celular contra todas as células tumorais avaliadas (Figura 30).

A capacidade de invasão é uma característica importante das células cancerosas e um alvo para o desenvolvimento de agentes anticâncer. De acordo com o ensaio de invasão matrigel, a lectina reduziu significativamente a capacidade de invasão em células cancerosas tratadas com SCC9 (Figura 31).

Estes achados vão ao encontro de outros resultados anteriormente descritos na literatura. Por meio do ensaio de cicatrização de feridas, observou que a lectina de ligação de N-glicano de alta manose de *Remusatia vivipara* (RVL), reduziu significativamente a taxa de migração das células de câncer de mama (MDA-MB-468

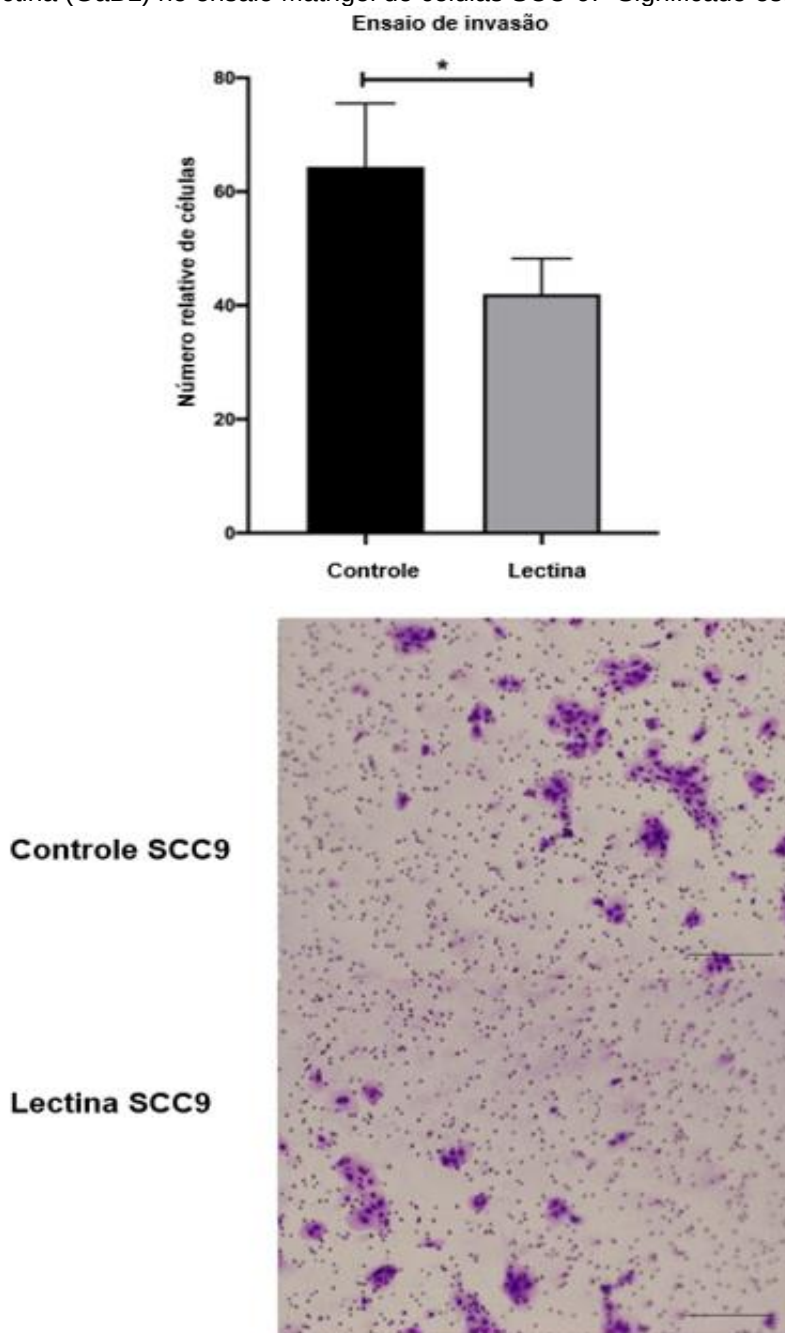
e MCF) em direção à ferida de arranhão quando comparada com a de células de controle não tratadas, sendo também observado que a das células tratadas com RVL (8 µg/ml) apresentaram redução na invasão e transmigração. (SINDHURA et al., 2017). Yang et al. (2018) relataram que, por meio dos resultados do teste de cicatrização de feridas, a lectina galectina (AAL) purificada da espécie *Agrocybe aegerita*, apresentou uma inibição significativa da migração de células tumorais de câncer de mama 4T1, dependente do tempo e da dose após o tratamento com AAL. Wang et al. (2016) utilizando receptor 2, tipo lectina tipo C, mostrou um aumento na motilidade nas células NCI-N87 e AGS depletadas de CLEC2, com consequente inibição da migração e invasão de células de câncer gástrico *in vivo*.

Figura 30- Efeito da lectina (GaBL) na migração e invasão de células cancerosas. Efeito do ensaio de raspagem de feridas de lectina (GaBL) de células A431, células B16 e células SCC9. *Significado estatístico.



Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Figura 31- Efeito da lectina (GaBL) no ensaio Matrigel de células SCC-9. *Significado estatístico.

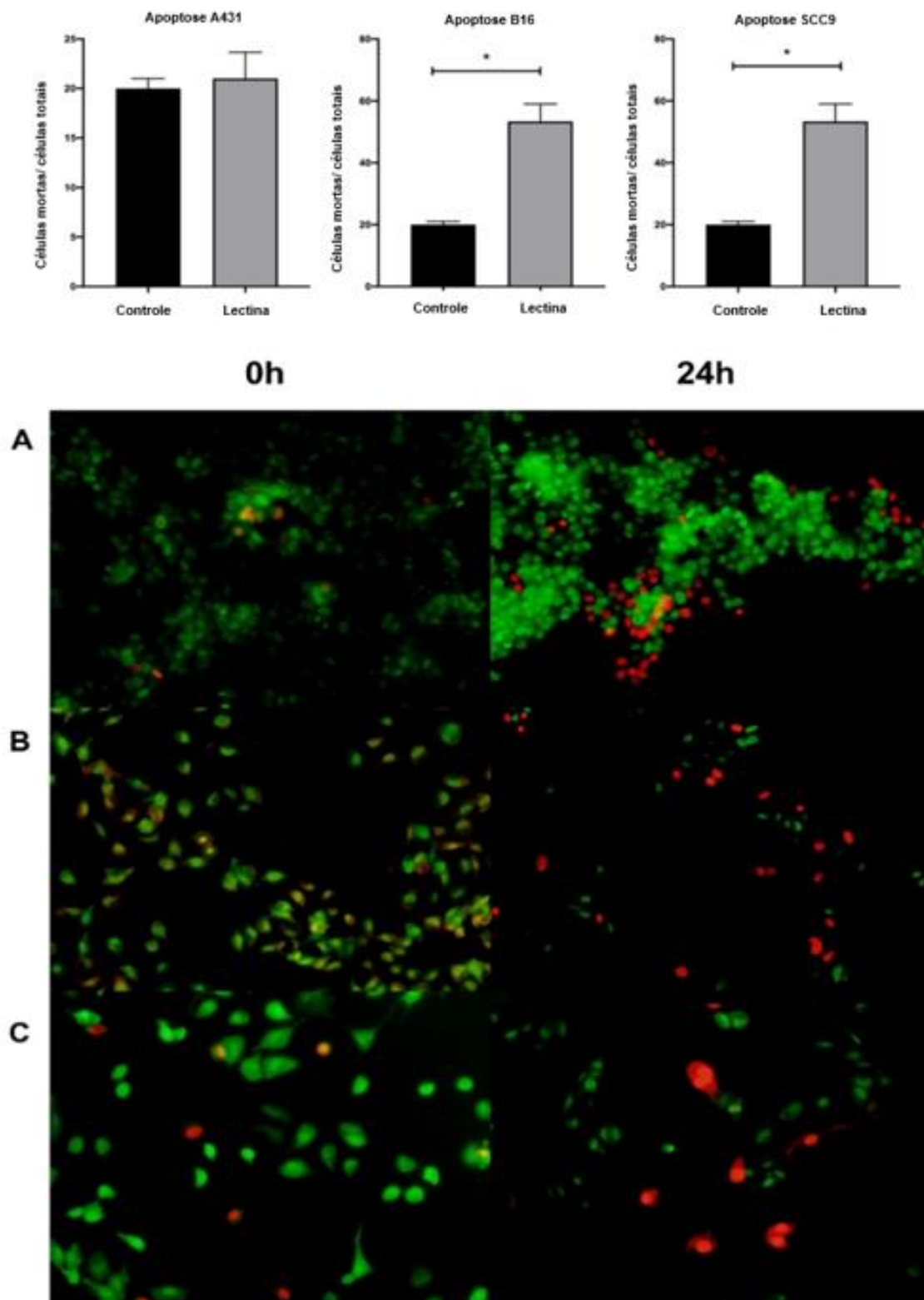


Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

4.2.5.5. Efeito da lectina (*GaBL*) na expressão de apoptose, caspase-3, e-caderina e Col1A1

O ensaio de morte celular de laranja de acridina/ brometo de etídio revela que a lectina aumentou significativamente o número de células apoptóticas quando comparada ao controle apenas em células cancerosas B16 e SCC9 (Figura 32).

Figura 32- Efeito da lectina (GaBL) na morte celular. Embora os números representativos de AO / EB e a quantificação não mostrem alteração da morte celular em A431 (A), foi observado um aumento na morte celular como consequência do tratamento com lectina nas células B16 (B) e SCC9 (C). * Significado estatístico.



Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

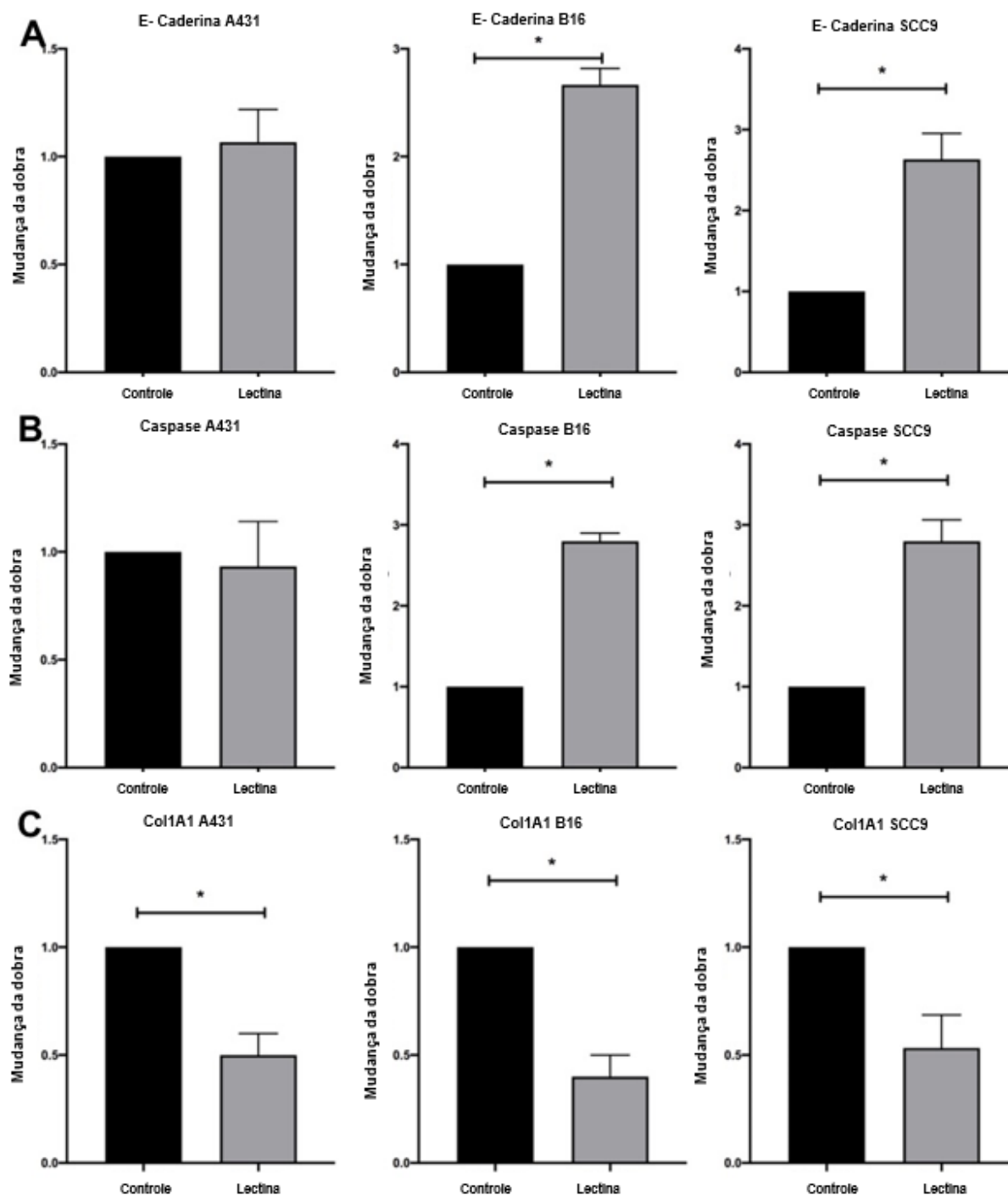
A visualização morfológica de células com compostos fluorescentes como laranja de acridina (AO)/EtBr fornece importantes informações a respeito da viabilidade celular, uma vez que o laranja de acridina (AO) é um corante catiônico fluorescente capaz de penetrar em células vivas e mortas e se intercala no DNA da célula e cora o núcleo de verde, enquanto o brometo de etídio (EtBr) intercala-se no DNA de células que perderam sua integridade de membrana e cora o núcleo laranja/vermelho (DUTTA et al., 2019).

Um estudo realizado por Musthafa et al. (2021) relatou que, linhagens celulares de glioblastoma U87MG, quando tratadas com a lectina isolada de *Abelmoschus esculentus* (AEL), em comparação com o controle (células tratadas com temozolamida- TMZ) absorveram AO e EtBr e foram coradas em verde e vermelho, respectivamente, característica de dano ao DNA. Esses danos no DNA, juntamente com mudanças na morfologia nuclear são características de morte celular apoptótica induzida por danos no DNA.

Naik; Naik (2020), ao realizar um estudo microscópico de fluorescência com linhagem de células de câncer de pulmão humano (A-549) e linhagem de células de câncer de colo de útero humano (HeLa) tratadas com a lectina Entadin de ligação à lactose de sementes de *Entada rheedii*, observou a formação de corpos apoptóticos. A lectina purificada das sementes de *Pisum fulvum* também foi capaz de induzir a apoptose em todos os estágios (precose e tardio) das células tumorais de adenocarcinoma colorretal (Caco-2), carcinoma hepatocelular (HepG2), células de câncer de mama (MCF7) e carcinoma de laringe (células Hep-2), possibilitando a conversão da aparência do núcleo, formando células multinucleadas, nucleadas condensadas e fragmentadas de cromatina (YASSIN et al., 2019).

Para verificar se a apoptose poderia ser ativada como consequência do tratamento com lectina, realizamos PCR de transcrição reversa para caspase-3. A lectina aumenta a transcrição da caspase-3 quando comparada com as células B16 e SCC9 não tratadas. Em células A431, a lectina não alterou os níveis de mRNA da caspase3. Também usamos PCR quantitativo em tempo real para avaliar os níveis de expressão de mRNA de proteínas relacionadas com a transição epitelial-mesenquimal (E-caderina, Col1A1). A lectina induziu a regulação positiva da caderina-E e a supressão de Col1A1 em ambas as células A431, B16 e SCC9 (Figura 33).

Figura 33- Efeito da lectina (GaBL) nos níveis de mRNA da caderina-E (A), caspase- 3 (B) e Col1A1 (C) em células A431, B16 e SCC9. *Significado estatístico.



Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

A E-caderina é um marcador epitelial, importante para manter as interações célula-célula extremamente necessárias para a integridade do tecido e controle das transições epitelial-mesenquimal (EMT) durante o desenvolvimento normal (MURALI et al., 2020). Já o colágeno tipo I α 1 (COL1A1) classifica-se como o principal

componente do colágeno tipo I, e pesquisas relatam que ele é superexpresso em diversos tecidos e células tumorais.

Resultados semelhantes foram observados por Musthafa et al. (2021), ao averiguar o possível mecanismo de apoptose em células U87 tratadas com AEL, através dos níveis de expressão de mRNA de caspase- 3 e 7, utilizando RT-PCR, onde foi detectado que um aumento significativo na expressão da caspase- 3 nas células tratadas com AEL (IC 50) com aumento de cinco vezes ($p < 0,01$) e a caspase 7 exibiu um aumento de quatro vezes ($p < 0,01$) quando comparado ao grupo controle não tratado. A lectina da seiva do pseudocaule de *Musa acuminata* (MAL) induziu a apoptose por meio da alteração da expressão de proteínas apoptóticas/nível de mRNA (Bax e Bcl-2) via caspase 8 ou 9 e 3, via dependente em ambos em *in vitro* e *in vivo*, de modo que o tratamento com MAL diminuiu significativamente o nível de expressão de Bcl-2 e aumentou o acúmulo de células HeLa e EAC, na fase apoptótica G2/M de maneira dose-dependente em células HeLa (*in-vitro*) e EAC (*in-vivo*) (SRINIVA et al., 2021).

CAPÍTULO III

Genipa americana L.- Sementes

Metodologias e Resultados

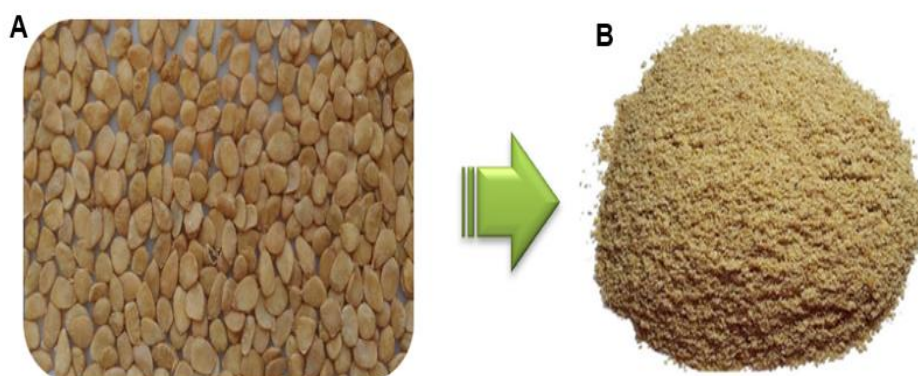
5.1. MATERIAIS E MÉTODOS

Semente de *Genipa americana*.

5.1.1. Obtenção do Material e preparo do extrato bruto

As sementes do fruto de *G. americana* foi coletada em Coruripe, região sul do litoral de Alagoas, BR. O material vegetal foi armazenado, em embalagem plástica e encaminhado para o Laboratório de Metabolismo e Proteômica - LAMP, da Universidade Federal de Alagoas. As sementes foram separadas da polpa do fruto, cortadas e trituradas em liquidificador até a condição de pó, e então colocado para secagem, em bandejas plásticas esterilizadas, e após foram levadas a estufa a 35°C e permaneceram por 7 dias até estarem totalmente secas (Figura 34), o pó foi acondicionado no freezer a -4 °C. Para utilização nos ensaios, o pó da Casca de *Genipa americana* foi retirado do freezer e mantido em temperatura ambiente por 30 minutos, em seguida foi pesado 10 g do mesmo, em uma balança analítica (Marte AY220), transferido para um Béquer de 50 mL e adicionados 40,0 mL de solução tampão de extração (Tris- HCl 50 mM pH 8,0). Para a extração dos compostos, a amostra foi mantida sobre agitação magnética durante 8 h (Agitador magnético, IKA IKAMAG C-MAG HS7), a 4 °C. Decorrido o tempo, a solução foi transferida para um tubo falcon de 50,0 mL e centrifugada (HERMLE- Z236K), durante 5,0 minutos a 15.000 xg, sob temperatura de 4 °C. O sobrenadante foi transferido para um novo recipiente e definido como extrato bruto.

Figura 34- Semente e pó da *G. americana*.



Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

5.1.2. Estratégias de Purificação de Proteínas

5.1.2.1. Precipitação com sulfato de amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)

Após a indicação indireta da presença de lectina no extrato proteico obtido a partir das sementes da *G. americana*, através da atividade hemaglutinante, realizou-se o processo de purificação da molécula estudada, iniciado pela precipitação salina com sulfato de amônio, como forma de eliminar demais proteínas contaminantes e, concentrar a atividade enzimática numa amostra de maior resolução. O material usado para essa análise foi obtido conforme mostrado no item 5.1.1.

O fracionamento utilizado é mostrado na Tabela 7. As etapas de precipitação foram realizadas a 15.000 xg a 4 °C por 10 min, utilizando centrífuga refrigerada (HERMLE- Z236K).

Tabela 7- Precipitação Salina

Fração (%)	Massa de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g)
0- 20	0,106 g/ml
20- 40	0,113 g/ml
40- 60	0,120 g/ml
60- 80	0,129 g/ml
80- 100	_____

Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

5.1.2.2. Precipitação de proteínas com solventes orgânicos (acetona e etanol)

Além da precipitação com sulfato de amônio, realizou-se também um método comparativo de precipitação de proteínas com diferentes solventes orgânicos (acetona e etanol). Após a homogeneização de cada uma das proporções dos solventes, 0 a 80% (v/v), os materiais foram mantidos na geladeira por 15min (4°C) e, posteriormente, centrifugado a 1500xg 4°C por 15min. Os precipitados obtidos foram ressuspensos em tampão Tris-HCl 50mM pH8,0, para posterior ensaio enzimático.

5.1.2.3. Cromatografia Líquida

A fração que apresentou maior atividade oriunda do fracionamento salino (Precipitado - 20%) foi aplicado em uma coluna cromatográfica de exclusão molecular Sephacril S-100 (60 mL), automatizada ao FPLC (ÄKTA Pure M1, GE Healthcare Life Science). Para tanto utilizou-se como tampão de equilíbrio e eluição, Tris-HCl pH 8,0 50 mM (A), a um fluxo de 0,1mL/ min em 2 volumes de coluna, sendo coletadas

frações de 2 mL, a 25 °C. O equipamento foi monitorado a 280 nm e ao final, as frações foram avaliadas quanto a atividade hemaglutinante (AH).

Ao término desse processo cromatográfico, foi tomado o material da semente de *G. americana* com maior atividade hemaglutinante obtida a partir do processo cromatográfico com coluna de exclusão molecular. A amostra foi reunida e aplicada em uma coluna cromatográfica DEAE-Sepharose (30 mL), trocadora de ânions, onde o tampão de equilíbrio foi 50 mM Tris-HCl pH 8,0 (A) e, para eluição, 50 mM Tris-HCl pH 8,0 + 0,5 M de NaCl (B), aplicando um gradiente de 0-100 % do mesmo, a um fluxo de 0,5mL/min em 40 volumes de coluna.

5.1.3. Ensaio de atividade Hemaglutinante

O ensaio de atividade hemaglutinante (AH) foi realizado em placas de microtitulação (Figura 22), de acordo com a metodologia descrita por Paiva e Coelho (1992). Alíquota (50 µL) da amostra foi diluída serialmente 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. AH específica (AHE) foi definida pela razão entre o título e a concentração proteica (mg/mL).

5.1.4. SDS-PAGE, Eletroforese Nativa

As eletroforeses foram executadas a voltagem constante, utilizando gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio, nas condições redutoras e nativas, com géis de 10 e 12 %; 5 % e 15 % (m/v) para os géis de empilhamento e separação respectivamente (LAEMMLI, 1970). Foi utilizado como tampão de amostra Tris-HCl pH 6.8 0.5 M; 2 % SDS; 10 % Glicerol; 5 % 2-Mercaptoetanol; 0,001 % de azul de Bromofenol. As amostras foram aquecidas por 5 min a 100 °C. A massa aproximada da enzima foi estimada com marcador de peso molecular (AmershamTTMFull-Range RainbowTTM (12000-225000 Da). Quanto a eletroforese nativa, seguimos o mesmo protocolo, sendo que nestas as amostras não foram submetidas a aquecimento, nem foram reduzidas com 2-mercaptoetanol.

Os géis foram corados com azul de coomassie dissolvido em ácido acético a 10 % (v/v), por 4hs e em seguida revelado com solução descorante (10 % ácido acético, 40 % de metanol e 5 0% água destilada).

5.1.5. Determinação da Concentração de Proteína

A concentração da proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976), usando albumina de soro Bovino como padrão (250-0,009 µg/mL). Para isso 10 µL das amostras diluídas (1:10), adicionados 790 µL de Água e 200 µL de reagente de Bradford. Posteriormente as amostras foram incubadas por 5 min, e medido a absorbância a 595 nm. As unidades correspondentes são (mg/mL) de proteína.

5.1.6. Ensaio de Inibição e Especificidade de Carboidratos e Glicoproteínas

A inibição da atividade hemaglutinante (HA) foi avaliada utilizando carboidratos e glicoproteínas como descrito por Carvalho et al., (2015). Para tanto, alíquotas de 50 µL da amostra foram submetidas à incubação 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. Para o controle positivo foi utilizada uma alíquota de 50 µL 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.

Foram utilizadas soluções inibidoras nas concentrações de 0,2 M e 0,1 M, 0,5 M e 0,25 M para carboidratos D – Galactose, D – Glicose, Maltose, Fucose, Ribose, Raminose, Glicopirranose, Piranose, D – Frutose, D - Arabinose, D - Lactose, Manose, N-acetil-monosamina, N-acetil-glicosamina, N-acetil-galactose e 500 µg, 250 µg e 125 µg para glicoproteína (fetuína). A inibição é quantificada em razão da redução da AHE quando comparado com o controle positivo.

5.1.7. Ensaio da Avaliação de temperatura, Estabilidade térmica e efeito do pH mediante a atividade Hemaglutinante.

O ensaio para avaliar a estabilidade da lectina isolada da semente de *Genipa americana* L. (GaSL) em diferentes valores de pH foi feito com alíquotas de 200µL que foram colocadas em membranas semipermeáveis (poros de 12 kDa e diâmetro de 2,5 cm) para diálisar por 6 h, com trocas a cada 2 h, contra vários tampões com pH variando de 3 a 12: Tampão Citrato-fosfato 100 mM (pH 3,0 – 4,0), Acetato de sódio 100 mM (pH 5,0 - 6,0) Fosfato de sódio 100 mM (pH 7,0), Tris-HCl 100 mM (pH 8,0) e Glicina-NaOH 100 mM (pH 9,0– 12,0). Em seguida todas as amostras foram

submetidas aos testes de atividade hemaglutinante com suspensão (2,5 % v/v) de eritrócitos de coelhos, para verificação da melhor atividade hemaglutinante.

O teste de temperatura e estabilidade térmica foi avaliado mantendo alíquotas de 200 µL (GaSL) em tubos de 1,5 mL, a temperaturas que variaram gradativamente entre 20-120°C, em banho maria com óleo, devido ao seu maior ponto de ebulição, durante 30 e 60 min., respectivamente. Após esse período, as amostras foram centrifugadas (15.000 rpm, 5 min, 25 °C) para remover precipitados, caso fosse formado, e em seguida foi realizada a atividade hemaglutinante do sobrenadante e quantificado em razão do título. Todos os ensaios foram feitos em triplicata.

5.1.8. Efeito do EDTA e de Cátions divalentes sobre a Atividade Hemaglutinante

A dependência de cátions divalentes (Ca^{2+} e Mn^{2+}) para a atividade hemaglutinante da GaSL foi determinada pelo método de dupla diluição seriada usando EDTA como agente quelante, conforme PAJIC et al. (2002). Para tanto, alíquotas de 200 µL foram colocadas em membranas semipermeável com poros de 12 kDa, apresentando diâmetro de 2,5 cm, em dialises por 6 horas, com troca a cada 2 horas, frente ao EDTA e as soluções de Ca^{2+} e Mn^{2+} , e avaliados frente ao teste de atividade hemaglutinante.

5.1.9. Atividade Biológica

5.1.9.1. Ensaio de Atividade Antifúngica

As linhagens fúngicas foram cultivadas em Meio YPD (Yeastextract – Peptone - Dextrose) por incubação a 35 °C. Em seguida, as concentrações das culturas foram ajustadas turbidometricamente a 530 nm para $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônia (UFC) por mL (0,5 na escala de McFarland). Para determinação da concentração mínima inibitória (CMI), amostras (50 µL) foram adicionadas a 50 µL de Meio RPMI; em seguida, seis diluições (até 1:128) foram realizadas.

Todos os poços foram inoculados com 50 µL da cultura de fungos e as microplacas foram incubadas a 35 °C por 24 h. Os ensaios foram feitos em duplicata. No controle positivo, 50 µL da cultura de fungos foram inoculados em um poço contendo somente Meio RPMI. No controle negativo (último poço de diluição da amostra) são colocados em 50 µL de Meio RPMI mais 50 µL de solução fisiológica 0,9%. Após incubação, a densidade ótica a 530 nm (DO530) foi medida utilizando

espectrofotômetro para microplacas. A CMI foi determinada como a menor concentração na qual ocorreu a diminuição maior ou igual a 99% em relação à DO530 no controle negativo (NCCLS, 2003)

5.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.2.1. Preparo do extrato bruto e e precipitação da semente de *Genipa americana*.

Após prévia coleta dos frutos do tipo baga de *G. americana*, as sementes foram extraídas para obtenção do extrato bruto. O extrato bruto foi minuciosamente realizado, sempre primando pelo excepcional cuidado e atenção as interferências externas, seguindo o protocolo de extração descrito no 5.1.1.

Após a obtenção do extrato da semente, uma fração do sobrenadante foi submetida aos testes hemaglutinante para verificação da atividade lectínica, observada através da interação da lectina e os glicocalix presentes na superfície dos eritrócitos, como destacado na Figura 7. É importante salientar que esta ligação ocorre de forma específica e reversível, sendo então quantificado em razão do título. Para tanto, o extrato bruto apresentou atividade hemaglutinante específica igual a 216. A partir da constatação da proteína de interesse, o extrato foi quantificado pelo método de Bradford onde obtivemos os resultados 0,592 mg/mL de proteínas totais.

Seguido a avaliação hemaglutinante com os eritrócitos de coelho, o extrato foi submetido a uma série de três métodos de precipitações proteica distintos, sendo eles: Etanol, acetona e sulfato de amônio. Contudo, foi observado que estes apresentaram diferentes distribuições fracionárias da proteína de interesse, como mostrado na tabela 8.

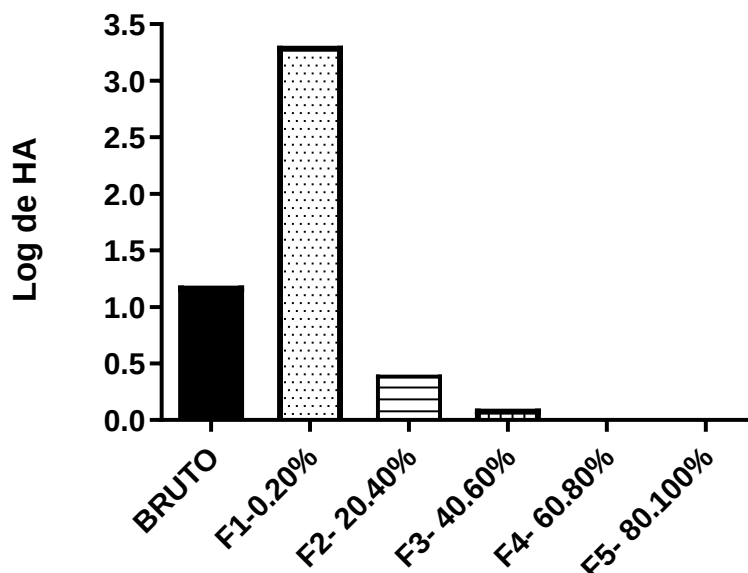
Tabela 8- Resultados dos Fracionamentos. (Sulfato de amônio, Etanol e Acetona).

Agentes precipitantes	Quantificação de Proteínas Bradford	Atividade Hemaglutinante-AH	Atividade Hemaglutinante Específica AHE
Extrato Bruto	0,592 (25 mL)	128	216
Sulfato de amônio			
F1- 0-20% (Precipitado)	1.328 (3,0 mL/ 25 mL)	2048	1,542
F2- 20-40% (Precipitado)	0,733 (2,5 mL/ 24 mL)	64	0,08
Etanol			
F1- 0-20% (Precipitado)	0,890 (2,0 mL/ 25 mL)	1024	1,150
F2- 20-40% (Precipitado)	0,722 (2,0 mL/ 24 mL)	512	0,654
F3- 40-60% (Precipitado)	0,564 (1,0 mL/ 23 mL)	256	0,453
Acetona			
F1- 0-20% (Precipitado)	1.111 (2,0 mL/ 22 mL)	1024	0,921
F2- 20-40% (Precipitado)	0,894 (2,0 mL/ 24 mL)	512	0,572
F3- 40-60% (Precipitado)	0,521 (1,0 mL/ 23 mL)	256	0,491
F4- 60-80% (Precipitado)	0,349 (0,5 mL/ 22 mL)	64	0,08

Fonte: elaborado pelo autor (2022).

Diante dos dados exposto na tabela 8, e observando os múltiplos métodos de precipitação, ficou evidente a eficácia ao isolar a amostra em frações, principalmente com sulfato de amônia e etanol. O sulfato de amônia se mostrou muito eficaz no isolamento da lectina, uma vez que concentrou a amostra em uma fração com altíssima atividade (Figura 35), isso é primordial para prosseguir o processo de purificação por cromatografia líquida, tendo em vista a condição do menor números de contaminantes para a matriz cromatográfica, devido ao seu alto custo e sensibilidade.

Figura 35- HA – Precipitação com sulfato de amônio.



Fonte: elaborado pelo autor (2022).

Estes dados corroboram com resultados apresentados por outros autores que também utilizaram o sulfato de amônio como agente precipitante em lectinas extraídas de sementes. KAMEI (2022) isolou e purificou uma lectina das sementes de uma planta leguminosa *Meizotropis buteiformis* utilizando fracionamento com sulfato de amônia (50-80%). Dados semelhantes foram observados no isolamento da lectina presente nas sementes de *Aesculus hippocastanum* (AhSL) a partir do extrato salino com sulfato de amônio (DE SIQUEIRA PATRIOTA et al., 2022).

5.2.2. Purificação da Lectina GaSL

Subsequente ao fracionamento por sulfato de amônio, a fração F1 (1.328 mg/mL) com maior atividade hemaglutinante específica (AHE: 1.542) foi submetida a cromatografia para o isolamento da proteína de interesse.

A lectina foi purificada através de dois processos cromatográficos, sendo uma cromatografia de exclusão molecular, também denominada de gel filtração e uma outra matriz de troca iônica respectivamente. Inicialmente a fração (F1) foi submetida à cromatografia líquida de exclusão molecular sem a obrigatoriedade de uma dialise da fração, evitando a perda da concentração de proteínas e diminuição da sua atividade.

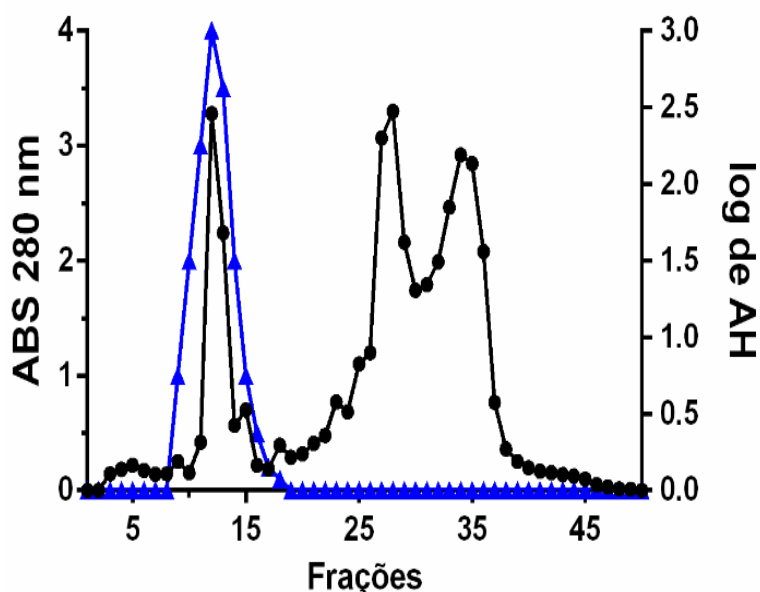
A cromatografia em coluna Sephacryl S-100 foi equilibrada com a solução tampão Tris-HCl 0,05 M pH 8,0 e com NaCl 0,15 mM, semelhantemente aos dados descritos por Costa, et al., (2018), e a amostra foi adicionada manualmente através da abertura superior da coluna, a amostra foi monitorada ao entrar de forma total na matriz e após sua entrada, foi adicionado a solução tampão e então a coluna foi fechada, dando início a eluição.

Após todo o processo de eluição, o cromatograma mostrou três picos bem definidos, contudo apenas um pico com atividade hemaglutinante foi observado entre as frações 12 e 14 como mostrado na Figura 36, com atividade hemaglutinante específica (HAE: 106,66), e com concentração de proteína total equivalente a 0,075 mg/mL.

Vale ressaltar que mesmo a gel filtração não sendo uma técnica adsortiva, como a de afinidade, onde a proteína de interesse se liga a fase estacionária, a depender da complexidade das moléculas, assim como a presença de algum agente contaminante, pode haver uma associação entre estas moléculas e a matriz de fase estacionária, sendo necessário, muitas vezes, o uso de uma solução eluente com uma concentração diferente de sal, a fim de ser obter uma eluição com maior confiabilidade devido a força iônica exercida sobre a fase estacionária. Todo o processo cromatográfico foi monitorado automaticamente a 280 nm.

O uso de cromatografia por exclusão molecular também foi observado por Nube et al., (2021), ao fazer uso da mesma técnica na purificação de uma lectina oriunda da semente de *Moringa oleífera*.

Figura 36- Cromatograma S-100 Sephacryl, pós Fracionamento com Sulfato de amônio (F1): Cromatograma (S100 Sephacryl): (A280) perfil de eluição de proteínas (linha preta). Atividade hemaglutinante em Log de HA (linha azul).



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Os picos advindos da cromatografia de exclusão molecular foram analisados frente ao teste hemaglutinante, e as frações 12,13 e 14, demonstraram atividade específica para a proteína de interesse. Desta forma, foram reunidas, e então aplicadas em um gel de eletroforese para avaliação do grau de pureza das amostras. Ao analisar o gel de eletroforese foi perceptível a presença de proteínas de massa molecular muito próximas, sendo necessário um novo método cromatográfico, onde nessa segunda etapa optamos por uma cromatografia de troca iônica DEAE-Sephacryl, como observado na Figura 36.

As amostras que apresentaram maior atividade específica da cromatografia de Gel filtração, foram dialisadas em uma solução de NaCl de 0,15 M, para retirada do excesso de sal advindo do processo anterior, tendo em vista que o excesso de sais nesse método cromatográfico é de grande interferência para o sucesso da obtenção da amostra de interesse.

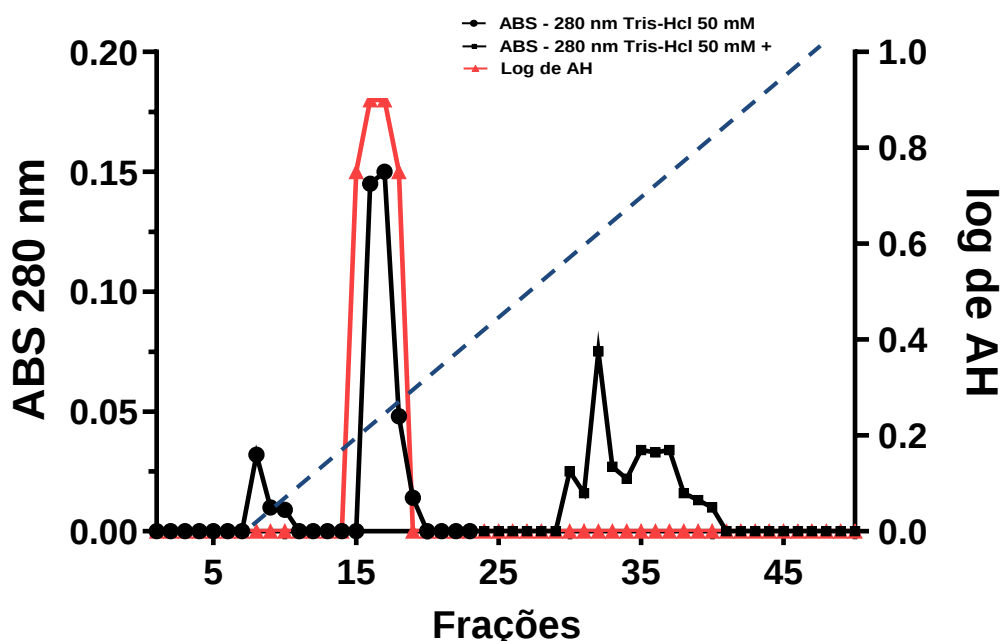
Após serem dialisadas as frações foram liofilizadas e então ressuspensas em 2 mL de NaCl 0,15 M, e quantificadas pelo método de Bradford, mostrando 0,075 mg/mL de proteínas totais.

Diferentemente do processo de aplicação de amostra na coluna de exclusão molecular, na coluna de troca iônica, os procedimentos são mecanizados de forma integral, sendo que 2,0 mL de amostra foram aplicadas na coluna através de injeção

em loop de igual volume, sendo todo o processo cromatográfico monitorado em tempo real a 280nm.

O método e procedimento cromatográfico seguiu as mesmas especificações proposta por Santos et al., (2020). A cromatografia foi mantida em gradiente crescente de força salina e as proteínas separadas de acordo com as suas cargas iônicas, como mostrado na Figura 37.

Figura 37- Cromatograma DEAE-Sepharose. A linha preta mostra o perfil de proteínas eluídas, enquanto a linha vermelha mostra-se a atividade inibitória específica, e a linha azul tracejada destaca-se o gradiente do tampão de eluição.



Fonte: elaborado pelo autor (2022).

Logo após a eluição de todos os tubos, e finalizado o processo cromatográfico, as amostras foram então testadas em relação à atividade hemaglutinante, onde percebemos que o segundo pico de proteínas mostrou atividade hemaglutinante. Após ser testados os tubos de interesse foram então dialisados em solução de NaCl 0,15 M, por período de 6 horas em NaCl 0,15 M.

Após a dialise dos tubos que referenciam o pico proteico de atividade, foram então liofilizados para concentração da amostra, tendo em vista que na técnica cromatográfica por troca iônica naturalmente dilui as amostras, esse procedimento é de suma importância para que possamos ver a real atividade e concentração de proteínas. A amostra foi então ressuspensas em volume igual a 0,5 mL de NaCl 0,15 M, mostrando assim uma concentração proteica de (0,030 mg/mL), e quando testado

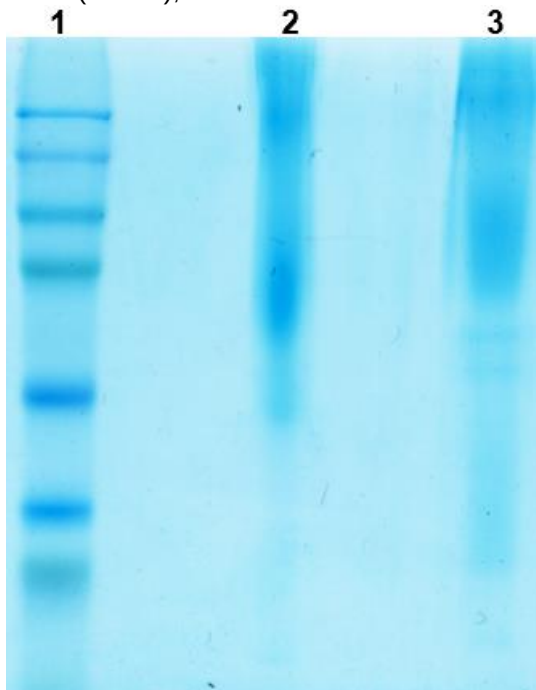
na atividade hemaglutinante mostrou atividade hemaglutinante específica (AHE: 1,066).

Resultados semelhantes oriundo de mesma técnica de purificação em coluna DEAE-celulose trocadora de ânion, foram também visualizados por Rathnasamy et al., (2021), ao purificar uma lectina oriunda da planta *Aloe vera*, avaliando seu potencial contra o COVID-19. Dados similares foram vistos por Javed et al., (2022), ao obter êxito na purificação de uma lectina com atividade antitumoral, oriunda da semente de *Chenopodium álbum* (CaLec), usando mesma técnica. De siqueira e Patriota et al., (2022), também purificaram uma lectina oriunda de *Aesculus hippocastanum* (AhSL), com atividade imunomoduladora usando também trocadora de ânions DEAE-Sephadex.

5.2.3. Eletroforese Nativa e SDS-PAGE

Após as etapas de purificação, a amostra foi submetida a eletroforese para constatação do grau de pureza, como observado na Figura 38. O gel de eletroforese (10 %) foi realizado sob condições redutoras e não redutoras, buscando avaliar a possível presença de subunidades na conformação nativa da lectina, visto que GaBL, lectina purificada das cascas da mesma espécie vegetal apresentou tais características (COSTA et al., 2018). Para tanto, foi observado que, em condições desnaturantes e não redutoras, o gel apresentou uma única banda proteica, de elevada massa molecular e, ao utilizar um agente redutor, esta banda foi fragmentada em bandas com peso molecular reduzidos, podendo constatar que se trata de uma lectina constituída de subunidades.

Figura 38- Eletroforese com gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (10%) da lectina purificada a partir da PVA. Canaleta 1: Padrão de massa; Canaleta 3: Lectina em condições desnaturante e não redutora; Canaleta 5: Lectina em condição desnaturante e redutora com β - mercaptol. A eletroforese foi processada a voltagem constante (90 mV), e as bandas foram coradas com Coomassie.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

5.2.4. Teste de Inibição com Carboidratos e Glicoproteínas por GaSL

O teste de caracterização e inibição de GaSL quanto à especificidade a carboidratos se deu da seguinte forma, a AH da lectina foi avaliada na presença de carboidratos e glicoproteína livres. Foram testadas no total 19 glicídios sendo, 15 carboidratos e 4 glicoproteínas, como mostrado na tabela 8. Dos carboidratos testados raminose apresentou altíssima afinidade a lectina, seguida de N-acetil-D-glicosamina, N-actil-D-galctosamina, galactose, glicose e frutose também mostraram capacidade de reduzir a AH de GaSL.

Tabela 9- Teste de inibição da Atividade Hemaglutinante Específica - AHE de GaSL por carboidratos e glicoproteína.

CARBOIDRATOS	HÁ
Controle	256
Ramnose	16
N- Acetilglicosamina	32
N- Acetilgalactosamina	32
Sacarose	32
Glicose	64
Galactose	64
Ribose	64
Frutose	64
Maltose	128
Lactose	128
Manose	258
Arabinose	258
Fucose	258
Glicopirranose	258
N- Acetilmanosamina	258
GLICOPROTEÍNAS	AH
Fetuína	8
BSA	32
Caseína	128
Azocasína	256

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

A lectina GaSL mostrou ser fortemente inibida pela fetuína e albumina de soro bovino, glicoproteínas constituídas por galactose, manose, glicosamina, galactosamina e ácidos siálicos. Frutose, ribose, glicose e arabinose também mostraram capacidade de reduzir a AH de GaSL.

O processo de 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 da membrana plasmática dos eritrócitos, levando a uma redução significativa da atividade dessas macromoléculas (Costa et al., 2018).

Outras lectinas apresentam semelhante característica quanto à especificidade, Oliveira et al., (2021) purificou CsL, extraída da semente da planta *Collaea speciosa*, que apresentou alta especificidade para N-acetil-D-alactosamina, quando tratada com baixas concentrações. Esses dados são extremamente importantes pois comparando a lectina isolada da casca de *Genipa americana* por Costa et al.

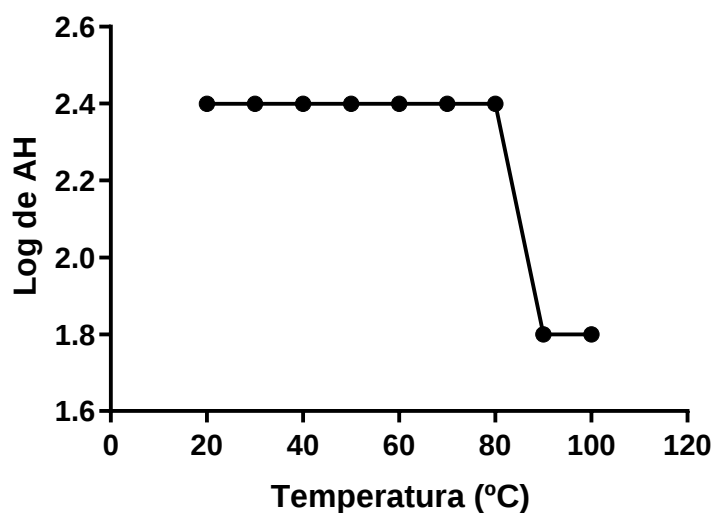
(2018) GaSL demonstra maior afinidade para carboidratos simples e glicoproteínas, o que a torna além de versátil uma excepcional ferramenta biotecnológica.

5.2.5. Teste de Temperatura e Termoestabilidade

Muitos fatores influenciam a estabilidade e manutenção de uma proteína, dentre estes podemos destacar a temperatura, que é um componente físico determinante para estrutura nativa de proteínas, uma vez que é sabido que cada proteína apresenta melhor desenvolvimento em sua faixa de temperatura ótima (NELSON; COX, 2014).

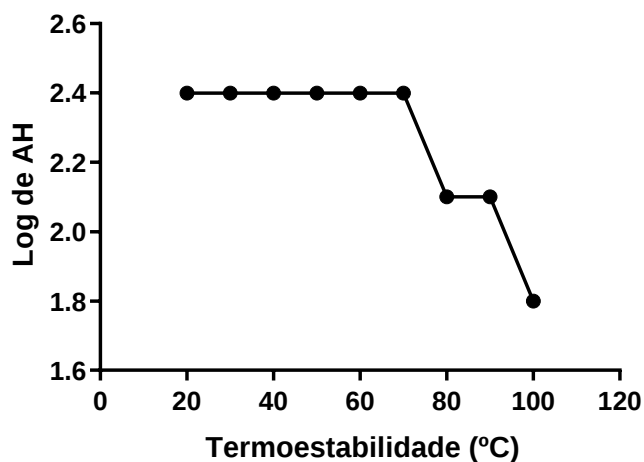
A lectina em estudo teve sua atividade avaliada em diferentes temperaturas, que variaram de 20 a 100 °C, durante 30 minutos e sua estabilidade por 1h, pois é importante avaliar a temperatura ótima e estabilidade nas diferentes temperaturas e por período de tempo distintos. A determinação da temperatura ótima e estabilidade foram efetuadas utilizando-se o teste hemaglutinante como mostra as Figuras 39 e 40.

Figura 39- Teste de Temperatura ótima. As amostras foram incubadas por 30 minutos.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Figura 40- Teste de Termoestabilidade. As amostras foram incubadas por 1Hs.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Ao compararmos os gráficos expressos nas Figuras 39 e 40, temperatura e termoestabilidade de GaSL, respectivamente, percebemos um padrão muito similar de atividade. Dessa forma, GaSL se mostrou muito estável em temperaturas até 80 °C, por 60 min, um intervalo de tempo, notável para uma proteína. Contudo quando comparada com GaBL, lectina extraída da casca de *Genipa americana* houve uma redução tanto na temperatura quanto na termoestabilidade, haja visto GaBL apresentava uma das maiores estabilidades já vista em lectinas (COSTA et al., 2018). Vale ressaltar que, devido aos aspectos fisiológicos proteínas de casca e caules apresentam maior resistência a temperatura, característica que evolutivamente deu a esses órgãos vegetais maior resistência aos inúmeros fatores bióticos e abióticos no ecossistema.

A termoestabilidade de proteínas tais como lectinas pode estar relacionada com a natureza das múltiplas interações que mantém na sua estrutura tridimensional, bem como no meio onde se encontram. Lectinas de plantas, na sua grande maioria, apresentam maior proporção de estruturas secundárias do tipo β -folha em sua organização tridimensional, conectadas por alças, o que lhes confere maior estabilidade frente à temperatura (COSTA et al., 2018).

As lectinas de *Phaseolus coccineus* se mativeram estáveis e apresentaram termoestabilidade na faixa de temperatura de 25 e 70 °C, já as lectinas de *Punica granatum L.* (PgTeL), e e *Collaea speciosa* (CsL), diminuíram suas atividades e/ou sofreram desnaturação a 80°C e 90 °C, respectivamente (GONZÁLEZ-CRUZ et al., 2022; ARARIPE et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2021).

Biomoléculas como proteínas, apresentam variações conforme sua estabilidade, seja por pH, temperatura ou por outros fatores. Ao aumentar a temperatura do meio, ocorrerá diversas variações no estado cinético de seus átomos, desencadeando vibrações que influenciam diretamente as ligações não covalentes e promovendo rotações desproporcionais ao longo dessas ligações e, em decorrência, possibilitando o afastamento de átomos ou mesmo a aproximação indesejada. É observado que em ambos os casos, a molécula tende a perder a sua conformação nativa, atingindo níveis energeticamente desfavoráveis, e como consequência ocorre a redução ou perda da atividade. (STRYER; JEREMY, 2003; NELSON; COX, 2014).

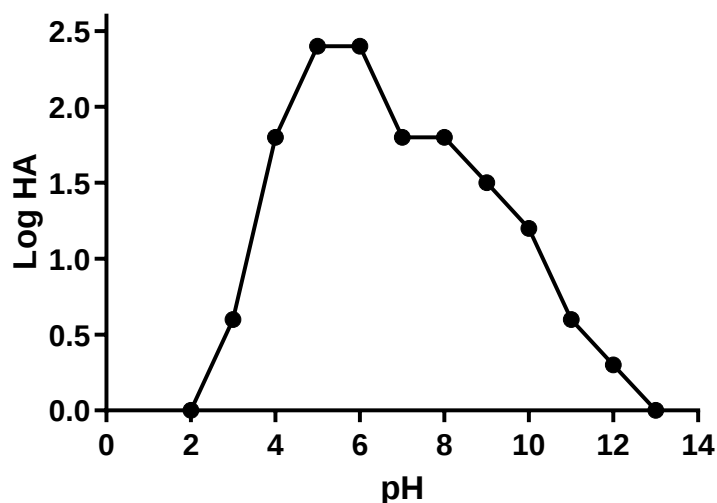
A GaSL mostrou uma estabilidade notável em sua atividade de hemaglutinação em amplos intervalos de temperatura, que não foi abolida até 90 °C, intervalo superior a maior parte de proteínas.

5.2.6. Teste de pH ótimo e Estabilidade

Os testes de pH ótimo e estabilidade a diferentes valores de pH, representado nas Figuras 41 e 42 demonstraram uma notável estabilidade da lectina da semente de *G. americana*, GaSL. A AH de GaSL foi maior em pH 5,0 e 6,0 (AH:1024), reduzindo para 512 entre pH 7,0 e 8,0; diminuindo gradativamente sua atividade em pHs mais alcalinos. Em valores de pH inferiores a 5,0, houve redução na AH para 512 e só perdendo totalmente a atividade em pH 12,0.

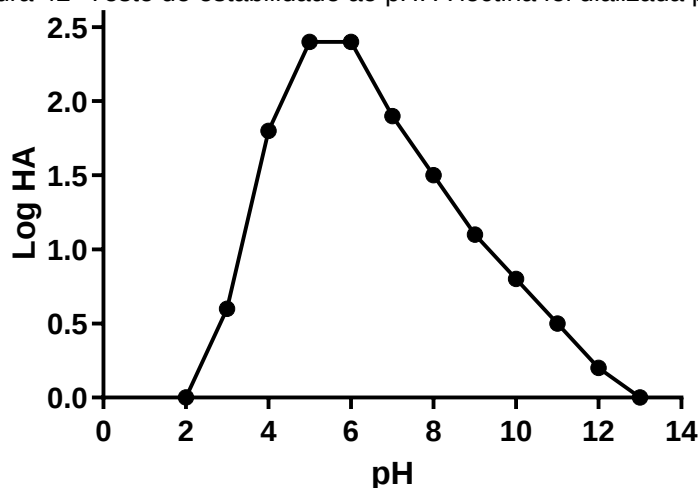
Esse ensaio de verificação de estabilidade ao pH, dializando a lectina ao tampão por maior tempo, permite que a molécula possa realmente ter total interação com o meio a qual foi submetido, tendo em vista que esse tempo de incubação irá permitir as possíveis modificações e variações na estrutura da proteína. A adição de ions H^+ na solução reacional tende a favorecer a protonação de alguns grupos ionizáveis presentes na cadeia primária (amino-terminal, carboxi-terminal e cadeias alquilas laterais) das proteínas podendo provocar possíveis variações na estrutura e função das mesmas, assim como pode melhorar ou dificultar a atividade exercida pelas proteínas. (NELSON; COX, 2014).

Figura 41- Teste de pH ótimo. A lectina foi dializada por 2 horas em todos os pHs.



Fonte: Elaborado pelo Autor (2022).

Figura 42- Teste de estabilidade ao pH. A lectina foi dializada por 6 horas em todos os pHs.



Fonte: Elaborado pelo Autor (2022).

KAMEI (2022) isolou e purificou uma lectina das sementes de uma planta leguminosa *Meizotropis buteiformis* que apresentou estabilidade durante uma faixa de pH relativamente amplo, variando de 6,0 a 8,0 que se compara bem com o pH ótimo de outros na presente investigação, a lectina foi completamente estável de pH 6,5 a 7,5, o que está em conformidade com aquelas lectinas oriundas de plantas.

OLIVEIRA et al. (2021) observou a estabilidade da lectina de sementes de *Collaea speciosa* (CsL), que se mostrou estável em pH 7 e 8. De siqueira patriota et al. (2022) purificaram uma lectina presente nas sementes de *Aesculus hippocastanum* (AhSL) que se mostrou estável em pH 4,0 a 8,0.

A lectina purificada a partir das sementes de *Clathrotropis nítida* – CNA, que por sua vez apresentou estabilidade durante toda a faixa de pH de 4 a 10 (ALVES et al., 2015). Outro estudo com uma lectina extraída da planta *hyacinth* (jacinto indiano) demonstrou maior estabilidade na faixa de pH variante entre 6 e 8 (NAIK et al., 2017).

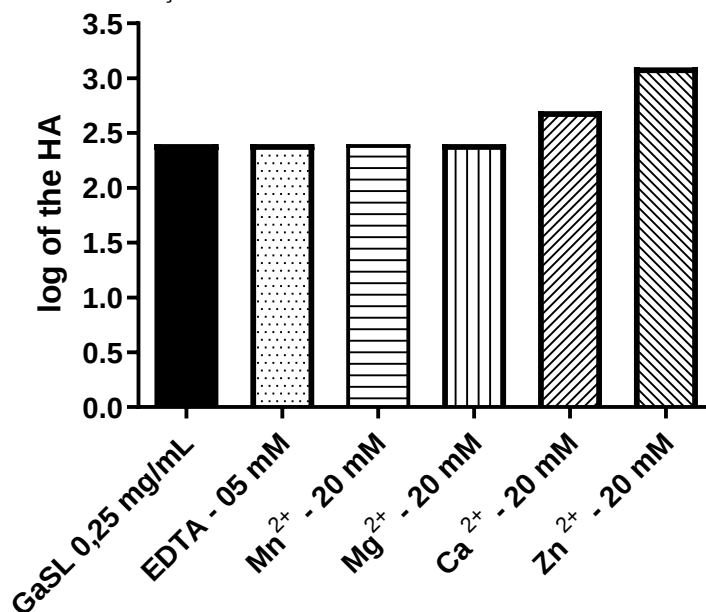
A estabilidade de GaSL a diferentes pH e temperaturas é uma característica fisicoquímica significativa e favorável para sua utilização no tratamento de doenças infecciosas humanas e estimula futuros testes *in vivo* e *in vitro*, tendo em vista que tais características dariam maior estabilidade a proteína frente as possíveis variações nos testes (COSTA et al., 2018).

5.2.7. Efeito de Íons em GaSL

Algumas proteínas apresentam em sua estrutura a presença de moléculas de carácter não proteico, sendo estas denominadas coenzimas ou cofatores, que por sua vez alteram e modificam a estrutura proteica, sendo muitas vezes essenciais para que proteínas possam executar suas atividades e funções, contudo nem todas as proteínas necessitam de um cofator ou coenzima.

Algumas lectinas apresentam sua atividade regulada e influenciada por grupos prostéticos como cátions (Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+}). A literatura retrata que lectinas oriundas dos mais diversos organismos podem apresentar a dependência desses íons ativadores de suas funções e atividades. Essa interferência não ocorreu com GaSL, já que Mg^{2+} e Mn^{2+} não afetaram sua atividade, entretando quando os íons Ca^{2+} e Zn^{2+} foram encubados sobre mesmos parâmetros foram capazes de elevar a atividade de GaSL, como mostra a Figura 43. GaSL se mostrou resistente ao quelante de metais EDTA, quando tratada exaustivamente em diálise por 24 hs, assim como os demais íons quando tratada sobre mesmo período de tempo.

Figura 43- Avaliação do efeito de íons na AH.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Em um trabalho recente foi retratado que MgCl_2 e HgCl_2 inibiram a atividade de hemaglutinação da lectina obtida dos bulbos de *Cyclamen mirabile* (KOCAZORBAZ, et. al., 2021). No entanto os íons Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} e Mn^{2+} não inibiram a atividade, sendo LSL uma lectina não dependente a íons (WANG et al., 2018). A lectina foi isolada e purificada das sementes de uma leguminosa *Meizotropis buteiformis*, também não verificou interferência oriunda dos íons testados (KAMEI et al., 2022). Araripe et al. (2017) destacaram que a lectina de sementes de *Platypodium elegans* (PELa) requer cátions bivalentes como Ca^{2+} e Mn^{2+} . A lectina de *Pleurotus flabellatus* (PFL-L) melhorou a HA com o uso de diferentes íons metálicos, como Mg^{2+} , Ca^{2+} e Fe^{2+} (MURUGESAN et al., 2021). Esses achados corroboram com GaSL, que demonstrou um aumento expressivo na sua atividade quando na presença dos íons Ca^{2+} e Zn^{2+} . A lectina em estudo mais uma vez se mostra com características diferentes de GaBL, tendo em vista sua otimização nas atividades hemaglutinantes após o tratamento com íons, o que não foi verificado anteriormente com GaBL.

6.1.1. Atividade Biológica

6.1.1.1. Atividade antimicrobiana de PVAL frente a fungos e bactérias patogênicos

É notória a imensidão das características funcionais das lectinas, pois há décadas tem sido relatado sua magnífica ação antimicrobiana, resultado do bloqueio de invasão e infecção, inibição de crescimento e germinação, regulação de adesão e

migração de células microbianas, e indução da morte da célula microbiana. A morte de microrganismos frente a lectinas tem estado prioritariamente ligada com a forte interação da mesma aos glicocálix de membrana plasmática assim como pela formação de poros e também as interações com os componentes da parede celular, tais como a quitina causando assim alterações na permeabilidade celular (COELHO et al., 2018; EL-ARABY et al., 2020).

Os fungos e as bactérias têm sido amplamente estudados e categorizados em diversos gêneros, sendo mais estudados os organismos patogênicos. Em bactérias o gênero *Staphylococcus* está entre o grupo com maior potencial de patogenicidade sendo este o causador de foliculites, pneumonias, endocardites, osteomielites até septicemia, afetando principalmente indivíduos imunossuprimidos (CARNEIRO et al., 2021). Fungos patogênicos *Candida*, *Cryptococcus* e *Trichosporon*, devido a sua grande importância na medicina. Tendo em vista serem agentes causadores de diversos tipos de infecções, especialmente na boca, olhos e mucosa genital, bem como infecções sistêmicas em indivíduos imunocomprometidos como pacientes com HIV, Lupus e/ou câncer (LIMA, 2008).

Devido ao crescente números de fungos resistentes aos fármacos utilizados no mercado, a ciência anseia pela busca de novas substâncias que possam agir como agentes antifúngicos, e as lectinas têm mostrado uma potente atividade antimicrobiana contra esses organismos, através da interação com peptidoglicanos, polissacarídeos, lipopolissacarídeos, ácidos teicoicos na parede celular bacteriana e fúngica (IORDACHE et al., 2015).

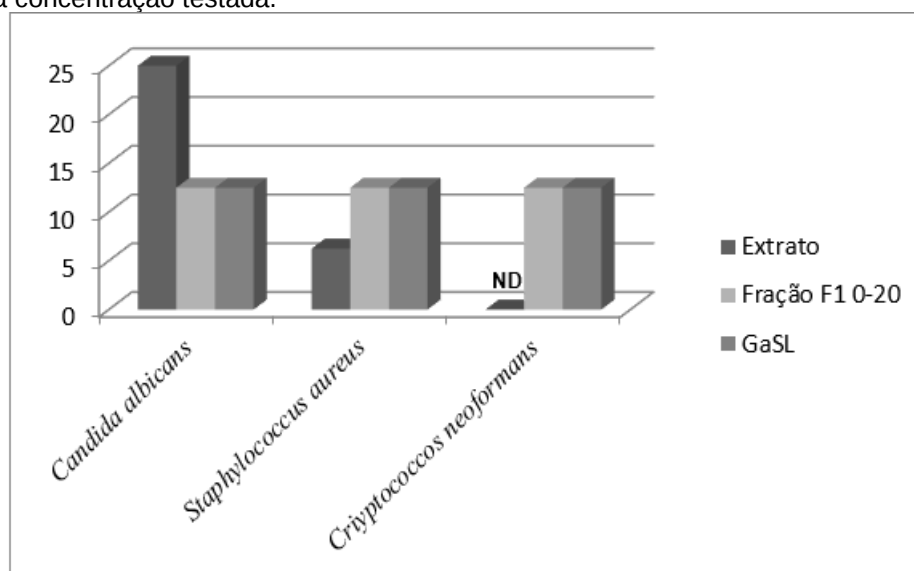
Os testes antimicrobianos direcionados a atividade antifúngica nos mostram que houve uma expressiva atividade inibitória da lectina da semente de *Genipa americana* GaSL, assim como de sua fração F1 e Extrato bruto, como mostrado no (Tabela 10 e Figura 44).

Tabela 10- Atividade antimicrobiana de GaSL frente a bactéria e fungos patogênicos

Microorganismos	Amostra	MIC ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Candida albicans</i>	Extrato	25
	F1 0-20	12,5
	GaSL	12,5
<i>Staphylococcus aureus</i>	Extrato	6,25
	F1 0-20	12,5
	GaSL	12,5
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Extrato	ND
	F1 0-20	12,5
	GaSL	12,5

Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Figura 44- Atividade antimicrobiana de GaSL frente a bactéria e fungos patogênicos. ND: Não detectada atividade na concentração testada.



Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

O ensaio inibitório teve como objeto de estudo duas cepas fúngicas de interesse médico, tais como: *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*, e uma cepa bacteriana *Staphylococcus aureus* que se mostraram sensíveis as Frações testadas, extrato, Fração F1 e GaSL. O extrato bruto mostrou resultados distintos para *C. albicans*, *S. aureus* e *C. neoformans* em relação as concentrações testadas, para *C. albicans* o valor inibitório foi de 25 $\mu\text{g/mL}$, diferentemente do observado para *S. aureus* que foi de 6,25 $\mu\text{g/mL}$, contudo para *C. neoformans* não houve inibição da sua atividade nas concentrações testadas de 3, 6, 25, 12,5, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$.

Esses dados nos mostram que devido as diferenças estruturais das células fúngicas e bacterianas, assim como seu mecanismo funcional divergente, por se tratar de três gêneros distintos, houveram essas variações na capacidade inibitória.

A fração 0-20 % denominada F1, teve uma surpreendente atividade inibitória para as cepas fúngicas e bacteriana, sendo 12,5 µg/ mL capaz de inibir *C. albicans*, *S. aureus* e *C. neoformans*, esse dado pode ser explicado tendo em vista uma maior concentração da lectina na fração, o que sugere que de forma mais isolada a lectina mostra-se mais ativa, não abandonando a hipótese de que no extrato deve haver algum inibidor do centro ativo das lectinas, o que impediria sua atividade funcional.

Quando testamos a lectina purificada denominada GaSL, os dados se mostraram muito promissores, tendo em vista que na concentração de 12,5 µg/ mL a lectina foi capaz de inibir todas cepas fúngicas e bacterianas, o que demonstra sua efetiva atividade e importância como uma possível ferramenta biotecnológica, entretanto a variação nos valores de extrato bruto, fração e lectina purificada, nos mostra que pode haver algum tipo de sinergismo entre a lectina e algum composto presente no extrato e/ou fração.

Quando comparamos os dados vistos por COSTA et al. (2018), quando avaliou a atividade antifúngica da lectina casca de *Genipa americana* (GaBL), com CMI nas concentrações de 12,5 e 25 µg/mL, frente *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans* respectivamente, observamos que a lectina da semente GaSL se mostrou mais promissora, tendo em vista sua eficiência em dosagens inferiores para todas as amostras estudadas.

Silva et al. (2018) relataram dados semelhantes, onde a lectina da sarcotesta de *Punica granatum* (PgTeL) apresentou efeito inibitório sobre o crescimento de *C. albicans* e *C. krusei*, com CMI de 25 e 12,5 µg/mL, respectivamente. Uma lectina oriunda de folíolos de *Calliandra surinamensis*, denominada CasuL, foi avaliada contra *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*. Essa lectina foi ativa apenas contra *C. krusei*, apresentando valores de CMI e CMF de 125 e 250 µg/ mL, respectivamente, valores muito superiores aos encontrados neste trabalho.

CAPÍTULO IV

***Rhizophora mangle* - Sementes do propágulo**

Metodologias e Resultados

6.2. MATERIAIS E MÉTODOS

6.2.1. Obtenção do Material e preparo do extrato bruto

A amostra vegetal foi cedida pelo laboratório de Biomaterias e Espectroscopia, da Universidade Estadual de São Paulo- USP. Para tanto, o material vegetal foi armazenado, em embalagem plástica e encaminhado para o Laboratório de Metabolismo e Proteômica - LAMP, da Universidade Federal de Alagoas. Em seguida este foi limpo, separado, cortado e triturado em liquidificador até a condição de pó, e então colocado para secagem, em bandejas plásticas esterilizadas, e após foram levadas a estufa a 35°C e permaneceram até estarem totalmente secas (Figura 45) o pó foi acondicionado no freezer a - 20 °C.

Figura 45- Representação esquemática do Propágulo de *Rizophora mangle*. **A:** Talo, **B:** Semente.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Para utilização nos testes, o pó das sementes do propágulo de *Rhizophora mangle* foi pesado 10 g do pó, transferido para um Béquer de 50 mL e adicionados 40,0 mL de solução de solução salina NaCl 0,15M. Para a extração dos compostos, a amostra foi mantida sobre agitação magnética durante 16h (Agitador magnético, IKA IKAMAG C-MAG HS7), a 4 °C. Decorrido o tempo, a solução foi transferida para um tubo falcon de 50,0 mL e centrifugada (HERMLE- Z236K), durante 5,0 min. a 15.000 xg, sob temperatura de 4 °C. O sobrenadante foi transferido para um novo recipiente e definido como extrato bruto.

6.2.2. Estratégias de Purificação de Proteínas

6.2.2.1. Precipitação salina com sulfato de amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)

Após a indicação indireta da presença de lectina no extrato proteico obtido a partir das sementes do propágulo de *Rhizophora mangle*, através da atividade hemaglutinante, realizou-se o processo de purificação da molécula estudada, pela precipitação salina com sulfato de amônio, como forma de eliminar demais proteínas contaminantes e, concentrar a atividade enzimática numa amostra de maior resolução. O material usado para essa análise foi obtido conforme mostrado no item 6.1.1.

O fracionamento utilizado é mostrado na Tabela 11. As etapas de precipitação foram realizadas a 15.000 xg a 4 °C por 10 min, utilizando centrífuga refrigerada (HERMLE- Z236K).

Tabela 11- Precipitação Salina

Fração (%)	Massa de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g)
0- 40	0,113 g/ml
40- 80	0,129 g/ml
80- 100	_____

Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

6.2.2.2. Precipitação de proteínas com solventes orgânicos (acetona e etanol)

Além da precipitação com sulfato de amônio, realizou-se também um método comparativo de precipitação de proteínas com diferentes solventes orgânicos (acetona e etanol). Após a homogeneização de cada uma das proporções dos solventes, 0 a 80% (v/v), os materiais foram mantidos na geladeira por 15min (4 °C) e, posteriormente, centrifugado a 1500xg 4 °C por 15 min. Os precipitados obtidos foram ressuspensos em tampão Tris-HCl 50mM pH 8,0, para posterior ensaio enzimático.

6.2.2.3. Cromatografia Líquida

A fração que apresentou maior atividade oriunda do fracionamento salino (F 40- 80%) foi aplicado em uma coluna cromatográfica de afinidade com matriz de N-acetilglucosamina/ quitina de 10 cm de comprimento. A coluna foi equilibrada com solução de NaCl 0,15 M com 30% de etanol. Para a eluição da amostra foi utilizado solução salina de NaCl 1M, seguido solução de ácido acético 1 M, para desligamento da lectina na coluna, a um fluxo de 0,5mL/ min, sendo coletadas frações de 2 mL, a

25 °C. As frações coletadas foram monitoradas a 280nm e avaliadas quanto a atividade hemaglutinante (AH).

6.2.3. Ensaio de atividade Hemaglutinante

O ensaio de atividade hemaglutinante (AH) foi realizado em placas de microtitulação (Figura 13), de acordo com a metodologia descrita por Paiva e Coelho (1992). Para análise da atividade lectínica, a amostra oriunda da cromatografia de afinidade passou por diálise, para a remoção do ácido presente. Em seguida, alíquota (50 µL) da amostra foi diluída serialmente 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. AH específica (AHE) foi definida pela razão entre o título e a concentração proteica (mg/mL).

6.2.4. SDS-PAGE, Eletroforese Nativa

As frações que apresentaram maiores atividades hemaglutinantes foram reunidas e liofilizadas. Logo após foram ressuspensas em um volume de 200 µL em solução de NaCl 0,15 M, para serem utilizadas no processo de eletroforese.

As eletroforeses foram executadas em voltagem constante, utilizando gel de poliácridamida com dodecil-sulfato de sódio, nas condições redutoras e nativas, com géis de 5 % e 10 % (m/v) para os géis de empilhamento e separação respectivamente (LAEMMLI, 1970). Foi utilizado como tampão de amostra Tris-HCl pH 6.8 0.5 M; 2 % SDS; 10 % Glicerol; 5 % 2-Mercaptoetanol; 0,001 % de azul de Bromofenol. As amostras foram aquecidas por 5 min a 100 °C. A massa aproximada da enzima foi estimada com marcador de peso molecular (AmershamTMFull-Range RainbowTM (12000-225000 Da). Quanto a eletroforese nativa, seguimos o mesmo protocolo, sendo que nestas as amostras não foram submetidas a aquecimento, nem foram reduzidas com 2-mercaptoetanol.

Os géis foram corados com azul de coomassie dissolvido em ácido acético a 10 % (v/v), por 4hs e em seguida revelado com solução descorante (10 % ácido acético, 40 % de metanol e 50 % água destilada).

6.2.5. Determinação da Concentração de Proteína

A concentração da proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976), usando albumina de soro Bovino como padrão (250-0,009 µg/mL). Para isso 10 µL das amostras diluídas (1:10), adicionados 790 µL de Água e 200 µL de reagente de Bradford. Posteriormente as amostras foram incubadas por 5 min, e medido a absorbância a 595 nm. As unidades correspondentes são (mg/mL) de proteína.

6.2.6. Ensaio de Inibição e Especificidade de Carboidratos e Glicoproteínas

A inibição da atividade hemaglutinante (HA) foi avaliada utilizando carboidratos e glicoproteínas como descrito por Carvalho et al. (2015). Para tanto, alíquotas de 50 µL da amostra foram submetidas à incubação 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. Para o controle positivo foi utilizada uma alíquota de 50 µL 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.

Foram utilizadas soluções inibidoras nas concentrações de 0,2 M e 0,1 M, 0,5 M e 0,25 M para carboidratos D – Galactose, D – Glicose, Maltose, Fucose, Ribose, Raminose, Glicopirranose, Piranose, D – Frutose, D - Arabinose, D - Lactose, Manose, N-acetil-monosamina, N-acetil-glicosamina, N-acetil-galactose e 500 µg, 250 µg e 125 µg para glicoproteína (fetuína). A inibição é quantificada em razão da redução da AHE quando comparado com o controle positivo.

6.2.7. Ensaio da Avaliação de temperatura, Estabilidade térmica e efeito do pH mediante a atividade Hemaglutinante.

O ensaio para avaliar a estabilidade da lectina isolada da semente de *R. mangle* (RmSL) em diferentes valores de pH foi feito com alíquotas de 200µL que foram colocadas em membranas semipermeáveis (poros de 12 kDa e diâmetro de 2,5 cm) para diálise por 6 h, com trocas a cada 2 h, contra vários tampões com pH variando de 3 a 12: Tampão Citrato-fosfato 100 mM (pH 3,0 – 4,0), Acetato de sódio 100 mM (pH 5,0 - 6,0) Fosfato de sódio 100 mM (pH 7,0), Tris-HCl 100 mM (pH 8,0) e Glicina-NaOH 100 mM (pH 9,0– 12,0). Em seguida todas as amostras foram submetidas aos

testes de atividade hemaglutinante com suspensão (2,5 % v/v) de eritrócitos de coelhos, para verificação da melhor atividade hemaglutinante.

O teste de temperatura e estabilidade térmica foi avaliado mantendo alíquotas de 200 μ L (RmSL) em tubos de 1,5 mL, a temperaturas que variaram gradativamente entre 20-120°C, em banho maria com óleo, devido ao seu maior ponto de ebulição, durante 30 e 60 min., respectivamente. Após esse período, as amostras foram centrifugadas (15.000 rpm, 5 min, 25 °C) para remover precipitados, caso fosse formado, e em seguida foi realizada a atividade hemaglutinante do sobrenadante e quantificado em razão do título. Todos os ensaios foram feitos em triplicata.

6.2.8. Efeito do EDTA e de Cátions divalentes sobre a Atividade Hemaglutinante

A dependência de cátions divalentes (Ca^{2+} e Mn^{2+}) para a atividade hemaglutinante da RmSL foi determinada pelo método de dupla diluição seriada usando EDTA como agente quelante, conforme PAJIC et al. (2002). Para tanto, alíquotas de 200 μ L foram colocadas em membranas semipermeável com poros de 12 kDa, apresentando diâmetro de 2,5 cm, em dialises por 6 horas, com troca a cada 2 horas, frente ao EDTA e as soluções de Ca^{2+} e Mn^{2+} , e avaliados frente ao teste de atividade hemaglutinante.

6.3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.3.1. Preparo do extrato bruto e precipitação salina

O extrato salino de sementes (EB) de *R. mangle* apresentou uma concentração proteica de 0,676 mg/mL e atividade hemaglutinante específica (AHE) de 378,69 (Tabela 12). A fim de concentrar a proteína de interesse e consequentemente reduzir o quantitativo de contaminantes presentes no EB foi submetido a metodologias de precipitação com diferentes agentes precipitantes, tais como: sulfato de amônio (precipitação salina), etanol e acetona (precipitação orgânica), visando obter o melhor resultado nesta etapa de pré-purificação.

Tabela 12- Precipitação proteica com diferentes agentes precipitantes.

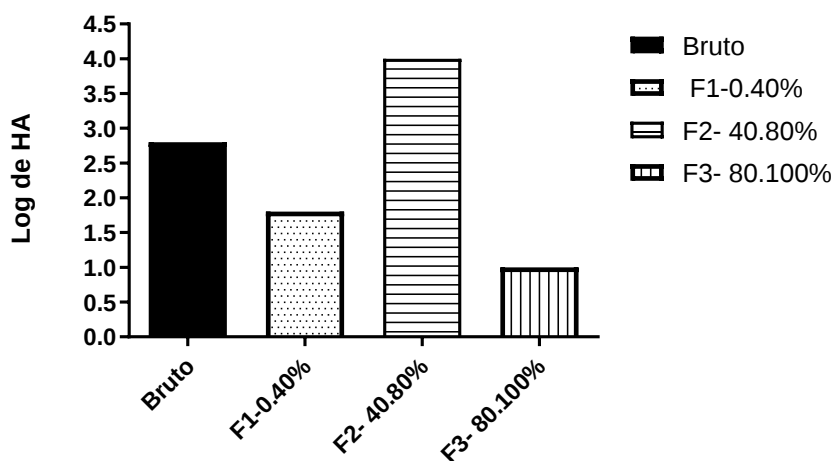
Agentes precipitantes	Quantificação de Proteínas Bradford	Atividade Hemaglutinante AH	Atividade Hemaglutinante Específica AHE
Extrato Bruto	0,676 (25 mL)	256	378,69
Sulfato de amônio			
F1- 0-40% (Precipitado)	1.113 (3,0 mL/ 25 mL)	128	115,0
F2- 40-80% (Precipitado)	0,733 (2,5 mL/ 24 mL)	1024	1.396
F3- 80-100%(Sobrenadante)	0.312 (23 mL)	64	205,1
Etanol			
F1- 0-20% (Precipitado)	0,754 (2,0 mL/ 25 mL)	1024	1,358
F2- 20-40% (Precipitado)	0,695 (2,0 mL/ 24 mL)	512	0,736
F3- 40-60% (Precipitado)	0,217 (1,0 mL/ 23 mL)	128	0,589
F4- 60-80% (Precipitado)	0,112 (1,0 mL/ 22mL)	32	0,285
F5- 80-100% (Sobrenadante)	0,085 (21 mL)	0	0
Acetona			
F1- 0-20% (Precipitado)	0,856 (2,0 mL/ 22 mL)	1024	1,189
F2-20-40%(Precipitado)	0,694 (2,0 mL/ 24 mL)	512	0,737
F3- 40-60%(Precipitado)	0,342 (1,0 mL/ 23 mL)	256	0,748
F4- 60-80%(Precipitado)	0,115 (0,5 mL/ 22 mL)	64	0,556
F5 – 80-100% (Sobrenadante)	0,085 (21 mL)	0	0

Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Ao analisar a Tabela 12, percebe-se que ambos os agentes mostraram resultados significativos de AHE, porém, ao serem submetidos a processo de diálise, necessário para a eliminação do solvente orgânico da amostra, para posterior utilização no método cromatográfico, percebeu-se uma perda exponencial da

atividade lectínica. Entretanto o sulfato de amônio mostrou ser mais estável e menos agressivo a essas proteínas (lectinas). Devido a isso, optou-se em prosseguir com a precipitação salina, visto que a fração com a atividade hemaglutinante pode ser aplicada sequencialmente a cromatografia, sem a necessidade de dialise. Dentre as frações da precipitação, foi observado que a fração 40- 80% (F2- sulfato de amônio) foi responsável pela maior atividade hemaglutinante específica (1.396) (Tabela 12, Figura 46).

Figura 46- Fracionamento com Sulfato de Amônio, frações com que apresentaram atividade hemaglutinante.



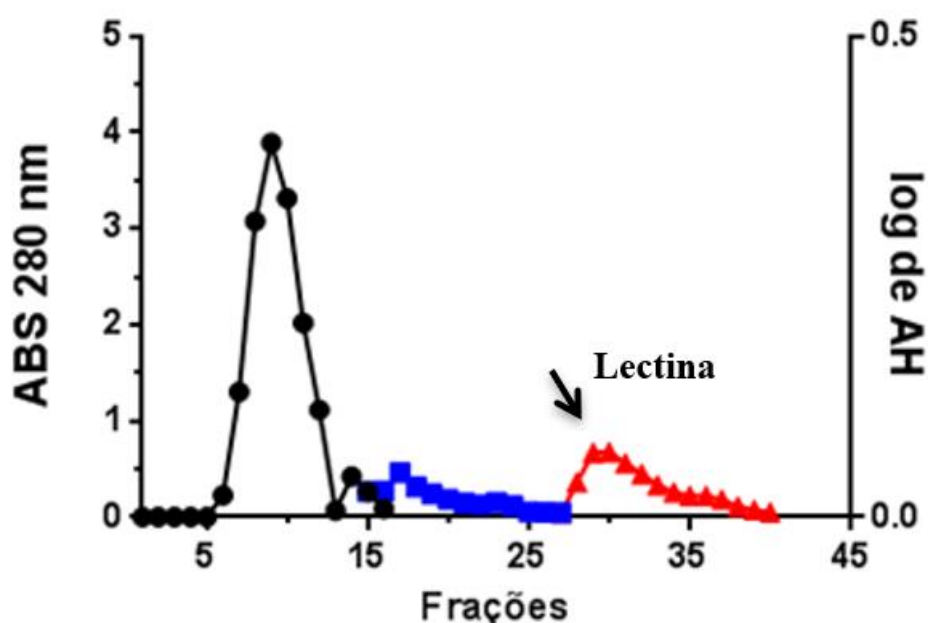
Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

É importante salientar que a precipitação salina é um método que se baseia na solubilidade, portanto o quantitativo de sal empregado na técnica é variável, a depender das características das proteínas presentes na amostra analisada. Sendo assim, Santos (2020) verificou a importância do uso de sulfato de amônio (20 % de saturação) na purificação da lectina das folhas de *Jatropha multifida* L., já El-Araby e colaboradores (2020) utilizaram saturações de 30 %, 70 % e 90% de sulfato de amônio para precipitar lectinas de três espécies de leguminosas (*Vicia faba*, *Lens culinaris* e *Pisum sativum*), respectivamente. Enquanto Da Silva (2019) também utilizou sulfato de amônio para precipitar as proteínas de *Scenedesmus* sp., usando saturação de 60- 80 % e Kamei (2022) utilizou sulfato de amônio equivalente a saturação de 50- 80% (m/v) para precipitar lectinas de *Meizotropis buteiformis*.

6.3.2. Purificação da lectina

Após o processo de precipitação salina, a fração F2, correspondente a que apresentou maior atividade hemaglutinante foi submetida a cromatografia de afinidade, constituída de matriz de N-acetilglucosamina/ quitina, de 10 cm de comprimento. Como é sabido, esta metodologia tem como princípio a adsorção de proteínas com a fase estacionária. Desta maneira, ao serem eluídas, as proteínas interagiram com N-acetilglucosamina/ quitina se uniram a mesma, sendo desligadas após a eluição de ácido acético 1M, como respresentada na figura 47.

Figura 47- Representação esquemática do Cromatograma de *Rizophora mangle*



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Ao analisar o cromatograma observa-se que o método teve boa reprodução, marcado por poucos picos não adsorvidos (3 picos), e depois um adsorvido, descatado em vermelho (Figura 47), os quais foram dialisados, para remoção do ácido acético e avaliados quanto à AH e concentração de proteínas. Apenas o pico adsorvido promoveu hemaglutinação.

A cromatografia de afinidade situa-se dentre as mais utilizadas no processo de purificação de lectinas. Semelhante aos resultados obtidos neste trabalho, Dara et al., (2021) isolaram uma lectina (ANTL) dos tubérculos de *Aponogeton natans* usando cromatografia de afinidade de quitina em coluna de quitina. BGL24 foi purificado a

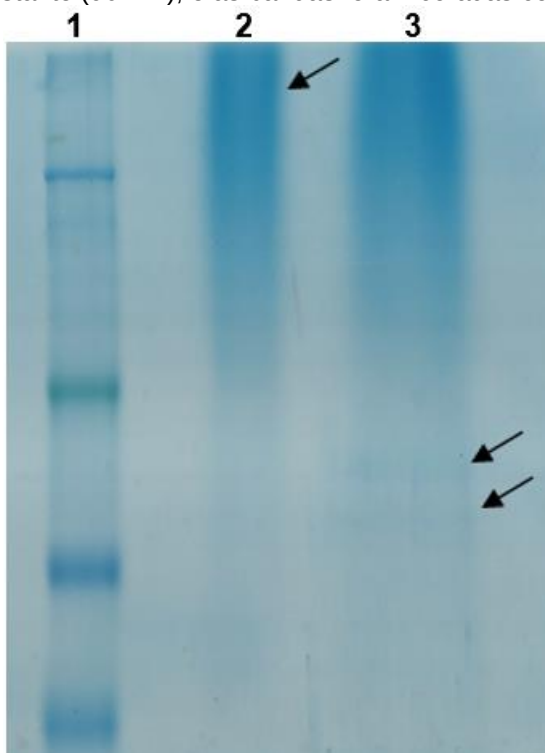
partir do exsudato de floema de cabaça (*Lagenaria siceraria*) por cromatografia de afinidade em α -quitina (MONDAL; SWAMY, 2020).

6.3.3. Eletroforese SDS-PAGE

Constatada a atividade hemaglutinante nas frações oriundas da cromatografia, após serem dialisadas, estas foram liofilizadas e ressuspendidas em 200 μ L de solução de NaCl 0,15 M para serem submetidas a eletroforese, a fim de determinar o grau de pureza da lectina e sua possível massa molecular aparente.

Ao analisar o gel de eletroforese (10 %) representado na Figura 48, é perceptível que, quando submetida a condições desnaturantes e não redutoras, a amostra apresentou uma única banda proteica, representante da lectina pura, onde esta aparenta ser possuidora de alta massa molecular. Todavia, ao ser submetida ao agente redutor, foi observado a presença de um dímero proteico, com massas moleculares baixas, sugerindo que a lectina purificada é um homodímero em que as duas subunidades estão ligadas através de ligações dissulfureto.

Figura 48- Eletroforese com gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (10%) da lectina purificada a partir da PVA. Canaleta 1: Padrão de massa; Canaleta 3: Lectina em condições desnaturante e não redutora; Canaleta 5: Lectina em condição desnaturante e redutora com β - mercaptol. A eletroforese foi processada a voltagem constante (90 mV), e as bandas foram coradas com Coomassie



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Outras lectinas apresentaram características semelhantes a lectina purificada neste trabalho como a BGL24, lectina purificada exsudato de floema do tipo PP2 de cabaça (*Lagenaria siceraria*), através de cromatografia de ligação com quitina, que apresentou um único pico, na ausência de redutor e ao ser submetida a condições desnaturantes e redutoras revelou duas bandas (MONDAL; SWAMY, 2020). Bem como a lectina isolada da própolis, como retratada neste estudo.

6.3.4. Teste de Inibição com Carboidratos e Glicoproteínas

A fim de investigar a especificidade de carboidratos da lectina purificada, ensaios de hemaglutinação foram realizados na presença de vários monos, di e oligossacarídeos (Tabela 13). Com exceção da ramnose, todos os carboidratos testados inibiram a atividade hemaglutinante da lectina em estudo, sendo observado que dentre estes a maior inibição foi promovida por D-arabinose. Ao observar a inibição frente as glicoproteínas testadas, verifica-se também que todas apresentaram inibição, sendo que a caseína interferiu fortemente na sua HA, seguida da demais (BSA, fetuína e azocaseína).

Estes resultados corroboram com os achados por Alves et al. (2022), que observaram que lectina da folha de *Myracrodruon urundeuva*, também mostrou considerável inibição frente a D- arabinose e com Santos (2020) que descreveu sobre a inibição da lectina pela glicoproteína caseína. Vale salientar que uma das lectinas, descrita neste trabalho, purificadas da própolis também foi inibida pela caseína.

Tais resultados sugerem que os locais de ligação, presentes na lectina purificada, apresentem capacidade de ligar-se as moléculas de glicídios de diferentes tamanhos. Podendo ainda prever que esta lectina apresente, assim como a lectina da própolis, sítio de ligação estendido, que favoreça a interação com as moléculas de caseínas.

Tabela 13- Teste de inibição da Atividade Hemaglutinante Específica - AHE de RmLS por carboidratos e glicoproteína.

CARBOIDRATOS	AHE- GaSL
Controle Negativo	512
D-Fructose	128
D-Ribose	64
D-Glicose	64
D-Arabinose	16*
D-Fucose	128
D-Galactose	64
D-Manose	64
Raminose	512
Sacarose	64
Glicopirranose	32
N-acetilglicosamina	32
N-acetilmonosamina	256
N-acetilgalactosamina	64
D-Maltose	64
D-Lactose	128
Glicoproteína	HA
Fetuína	32
Caseína	16*
BSA	32
Azocaseína	64

*** Maior inibição**

Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

6.3.5. Teste de Temperatura ótima e Termoestabilidade

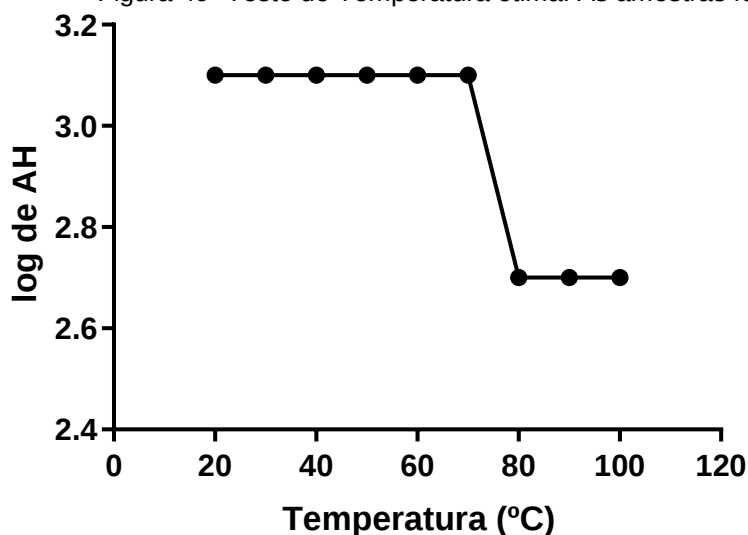
A lectina purificada teve sua atividade hemaglutinante avaliada frente a diferentes temperaturas, que variaram de 20 a 100 °C, por 30 minutos e 1h para mensurar sua estabilidade diante desse fator físico. O teste foi realizado em banho-maria contendo óleo mineral.

Ao analisar os gráficos das Figuras 49 e 50, verifica-se que a maior atividade da lectina foi totalmente mantida quando incubada nas temperaturas de 20 a 70°C. Após essa temperatura observou-se uma redução da atividade da lectina, porém ainda assim permaneceu ativa. O decaimento observado pode ser resultado da

conformação das lectinas, que podem ser formadas majoritariamente por beta-folha (COSTA et al., 2018).

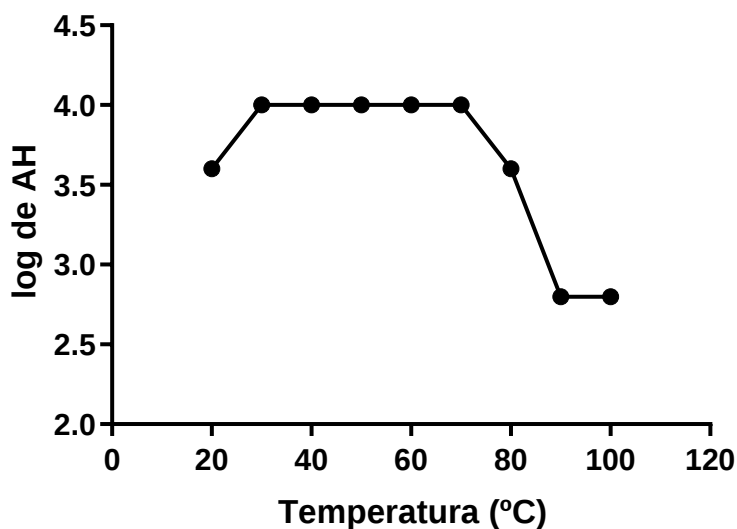
Assim como a temperatura, também é importante analisar a estabilidade térmica das proteínas, visto que cada possível aplicação proteica ocorre em uma temperatura distinta, em um determinado intervalo de tempo. Procópio et al. (2017) descreve que a termoestabilidade das proteínas pode variar de acordo com o grau de dependência da estrutura da proteína em ligações de hidrogênio, presença de glicosilação e como de sua estrutura terciária (PROCÓPIO et al., 2017).

Figura 49- Teste de Temperatura ótima. As amostras foram incubadas por 30 minutos.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Figura 50- Teste de Termoestabilidade. As amostras foram incubadas por 1Hs.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

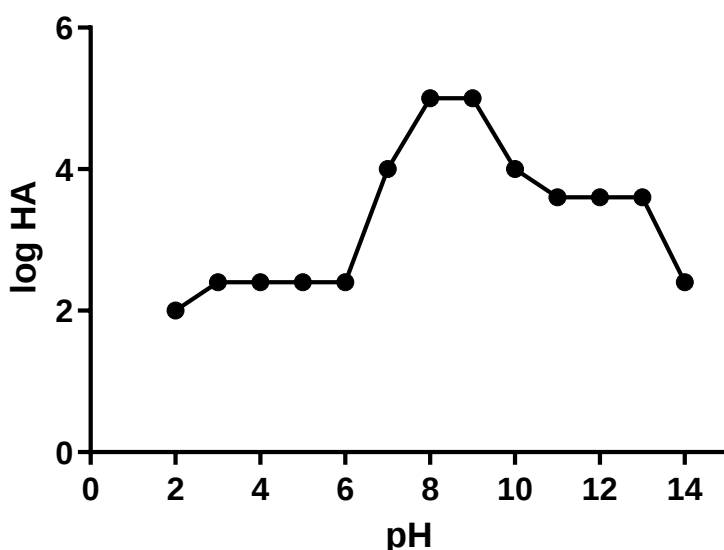
Observando os dados descritos nas Figuras 49 e 50, é perceptível que a temperatura ótima e estabilidade mostraram uma alta semelhança no que se refere a atividade hemaglutinante. Estes dados sugerem que a proteína purificada é caracterizada como termoestável. Resultados semelhantes foram encontrados por Jiang et al. (2019), ao caracterizar a lectina das sementes do feijão Zihua (*Phaseolus vulgaris*) e perceber que a atividade se manteve inalterada quando a temperatura não foi superior a 70 °C. Kamei (2022), descreveu que a lectina das sementes de *Meizotropis buteiformis* manteve a atividade completa da lectina entre as temperaturas do ensaio de 30 °C a 50 °C. Oliveira e colaboradores (2021) relataram que a atividade da lectina extraída de sementes de *Collaea speciosa* (CsL) se manteve ativa até 90 °C. Portanto, pode-se afirmar que a lectina das sementes de *R. mangle* apresenta características, de temperatura, semelhantes a lectinas de sementes, anteriormente purificadas de outras espécies vegetais.

6.3.6. Teste de pH ótimo e estabilidade

Sabe-se que variação de pH pode ser listado como um dos fatores desnaturantes das proteínas visto que ele pode alterar a estrutura proteica por meio da clivagem das ligações de hidrogênios entre os resíduos de aminoácidos, ou alteração das pontes salinas entre as cadeias laterais formadas por aminoácidos que apresentam cargas (MONDAL; SWAMY, 2020).

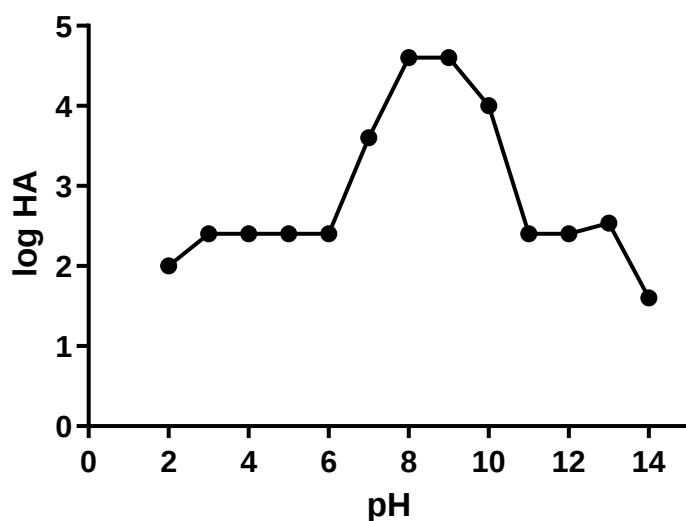
Através da análise dos gráficos (Figuras 51 e 52) é possível perceber que a lectina em estudo apresenta maior atividade entre os pHs 8 e 9, mantendo-se totalmente estável durante o intervalo de tempo de 1h. Entre os pHs 2 a 6 observou-se que a atividade da lectina foi severamente afetada, assim como nos pHs entre 11 a 13, nos pHs 7 e 10, apresentou uma menor, porém ainda considerável atividade. Sua estabilidade foi severamente afetada em pH 14, onde a atividade é praticamente anulada.

Figura 51- Teste de pH ótimo. A lectina foi dializada por 2 horas em todos os pHs.



Fonte: Elaborado pelo Autor (2020).

Figura 52- Teste de estabilidade ao pH. A lectina foi dializada por 6 horas em todos os pHs.



Fonte: Elaborado pelo Autor (2020).

Resultados semelhantes a estes achados são descritos na literatura. González-Cruz e colaboradores (2022) ao purificarem parcialmente as lectinas de duas variedades de *Phaseolus coccineus* (feijão ayocote preto e roxo) observaram alta estabilidade de pH, entre 3 e 10. Viana (2021) purificou uma lectina de *Aplysina cauliformis* (ACL), que apresentou atividade hemaglutinante em um amplo intervalo de pH, tendo seu ápice de atividade em pH básico de 9 e 10. As lectinas isoladas das sementes de *Aesculus hippocastanum* (AhSL) e outra das sementes de castanha-da-índia (*Aesculus hippocastanum* L.) mantiveram sua atividade entre a variação de pH 4- 8.

6.3.7. Efeito do EDTA e de Íons divalentes na atividade hemaglutinante da lectina

Sabendo que algumas proteínas são formadas por uma parte não proteica, em sua molécula, que se caracterizam como coenzimas ou cofatores, importantes moléculas que podem atuar no favorecimento da completa execução das funções das proteínas, viu-se a necessidade de investigar se a lectina purificada necessita de tais moléculas ou se é capaz de atuar na sua ausência.

O EDTA, ácido etilenodiaminotetracético, classifica-se como um íon quelante que auxilia na estabilização e ligação proteica, de modo a inibir a atividade de proteases e outras proteínas dependente de íons, além de remover os cátions divalentes interferentes (SANTOS, 2020). Para tanto, a especificidade de ligação de vários íons metálicos foi investigada frente a atividade de hemaglutinação. A influência de diferentes concentrações de íons metálicos na atividade de hemaglutinação da lectina é apresentada na Figura 53.

Analisando o gráfico retratado na figura 53, fica evidente que a atividade de hemaglutinação da lectina purificada não é perturbada pelo EDTA, corroborando com outros resultados descritos na literatura. A atividade hemaglutinante de lectinas de *Aesculus hippocastanum*, *Lagenaria siceraria*, *Machaerium acutifolium* e *Euphorbia antiquorum* permaneceram inalteradas pelo EDTA (DE SIQUEIRA PATRIOTA et al., 2022; MONDAL; SWAMY, 2020; SANTOS et al., 2019; SIRITAPETAWEET et al., 2018).

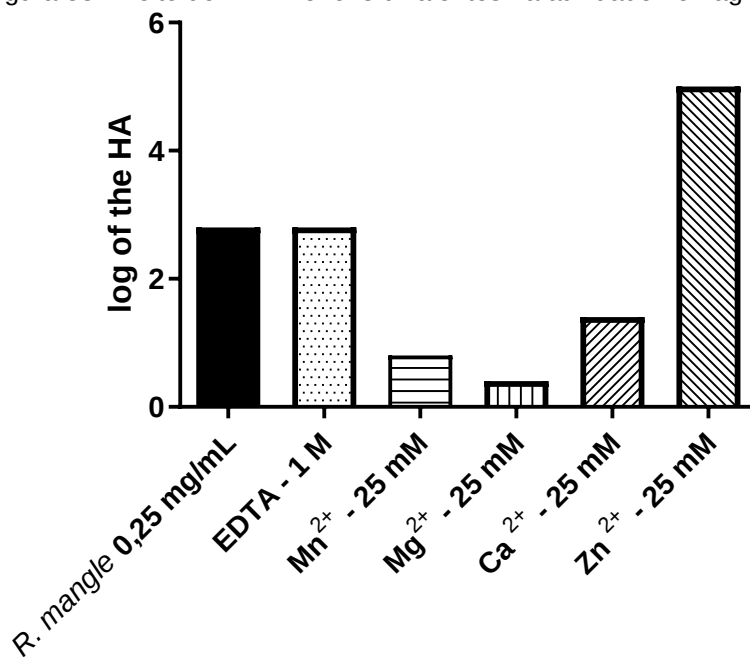
Considerando que muitas lectinas são dependentes de íons divalentes, considerou-se avaliar a AH da lectina na presença de Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} e Zn^{2+} , uma vez que, quando associados às lectinas, os íons metálicos desempenham um papel significativo na atividade de hemaglutinação, pois são os responsáveis por estabilizar a ligação ao domínio de reconhecimento de carboidrato (CRD) e fixar as posições dos resíduos de aminoácidos que interagem com o carboidrato ligante (MURUGESAN; GUNASAGARAN, 2021).

Neste trabalho a AH foi fortemente inibida pelos íons Mg^{2+} , e em menor percentual pelos íons Mn^{2+} , Ca^{2+} . Em contrapartida, a presença de Zn^{2+} aumentou a eficácia da lectina, visto que a atividade hemaglutinante duplicou, quando comparada com o controle. De acordo com Silva (2017), algumas lectinas, para exercerem sua função biológica, necessitam de íons divalentes, como os cátions magnésio, cálcio,

manganês e zinco. Segundo Oliveira (2018) essas proteínas são denominadas metaloproteínas e os sítios de ligação desses metais são adjacentes ao domínio de reconhecimento a carboidratos.

Várias lectinas são caracterizadas como dependentes de íons, como relatada por Murugesan; Gunasagaran (2021), que observou a dependência da lectina PFL-L, purificada de *Pleurotus flabellatus*, pelos íons metálicos Mg^{2+} , Ca^{2+} e Fe^{2+} . Semelhante a lectina EMtL6 que se mostrou dependente de Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} e Zn^{2+} (OSMAN et al., 2016). A lectina isolada das sementes de *Collaea speciosa* se mostrou altamente dependente de íons divalentes, visto que esta foi completamente inibida por EDTA, bem como por Ca^{2+} , Mn^{2+} , parcialmente (OLIVEIRA et al., 2021).

Figura 53- Efeito do EDTA e íons divalentes na atividade hemaglutinante



Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

A presença de íons metálicos desempenha um papel vital na estabilidade estrutural e nas especificidades do açúcar das lectinas. Desta forma, os íons metálicos auxiliam na manutenção da estabilidade das subunidades de lectina, bem como reforçam a posição dos resíduos de aminoácidos para a ligação de carboidratos. Embora os açúcares não interajam diretamente com os íons metálicos, a remoção desse grupamento (lectina-íon) pode influenciar a capacidade de ligação dessas proteínas aos carboidratos (SINGH et al., 2020).

Estes resultados, em consonância com a alta estabilidade térmica e a pH demonstrada pela lectina purificada permite sugerir que esta pode desenvolver atividades em diferentes condições do meio, favorecendo um elevado potencial biotecnológico.

7. CAPÍTULO V

PROPÓLIS VERMELHA DE ALAGOAS

Metodologias e Resultados

7.1. MATERIAIS E MÉTODOS

7.1.1. Obtenção do Material e preparo do extrato bruto

A própolis vermelha de Alagoas (PVA) foi obtida da Fazenda Boa Vista, zona rural de Coruripe, Alagoas, BR. O material vegetal foi armazenado, em embalagem plástica e encaminhado para o Laboratório de Metabolismo e Proteômica - LAMP, da Universidade Federal de Alagoas e acondicionado no freezer a - 4°C.

Para utilização, a própolis foi triturada, ainda congelada e em seguida foi pesado 10 g da amostra e transferido para um Béquer de 50 mL e adicionados 40,0 mL de solução salina de NaCl 0,15 M com 30 % de etanol. Para a extração dos compostos, a amostra foi mantida sobre agitação magnética durante 16 h (Agitador magnético, IKA IKAMAG C-MAG HS7), a 4 °C. Decorrido o tempo, a solução foi filtrada utilizando peneira comercial e o filtrado foi transferido para um novo recipiente e definido como extrato bruto.

7.1.2. Estratégia de Purificação

7.1.2.1. Precipitação com sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄)

Após a indicação indireta da presença de lectina no extrato proteico obtido a partir das própolis vermelha de Alagoas, através da atividade hemaglutinante, realizou-se o processo de purificação da molécula estudada, iniciado pela precipitação salina com sulfato de amônio, como forma de eliminar demais proteínas contaminantes e, concentrar a atividade enzimática numa amostra de maior resolução. O material usado para essa análise foi obtido conforme mostrado no item 7.1.1.

O fracionamento utilizado é mostrado na Tabela 15. As etapas de precipitação foram realizadas a 15.000 xg a 4 °C por 10 min, utilizando centrífuga refrigerada (HERMLE- Z236K).

Tabela 14- Precipitação Salina	
Fração (%)	Massa de (NH ₄) ₂ SO ₄ (g)
0- 20	0,106 g/ml
20- 40	0,113 g/ml
40- 60	0,120 g/ml
60- 80	0,129 g/ml
80- 100	_____

Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

7.1.2.2. Precipitação de proteínas com solventes orgânicos (acetona e etanol)

Além da precipitação com sulfato de amônio, realizou-se também um método comparativo de precipitação de proteínas com diferentes solventes orgânicos (acetona e etanol). Após a homogeneização de cada uma das proporções dos solventes, 0 a 80 % (v/v), os materiais foram mantidos na geladeira por 15 min (4 °C) e, posteriormente, centrifugado a 1500 xg 4 °C por 15 min. Os precipitados obtidos foram ressuspensos em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0, para posterior ensaio enzimático.

7.1.2.3. Cromatografia Líquida

A fração que apresentou maior atividade oriunda do fracionamento salino (Precipitado – 20 %) foi aplicado em uma coluna cromatográfica de afinidade com matriz de N-acetilglucosamina/ quitina (Figura 54), de 10 cm de comprimento. A coluna foi equilibrada com solução de NaCl 0,15 M com 30 % de etanol. Para a eluição da amostra foi utilizado solução salina de NaCl 1M, seguido solução de ácido acético 1 M, para desligamento da lectina na coluna, a um fluxo de 0,5mL/ min, sendo coletadas frações de 2 mL, a 25 °C. As frações coletadas foram monitoradas a 280nm e avaliadas quanto a atividade hemaglutinante (AH).

Figura 54- cromatográfica de afinidade com matriz de N-acetilglucosamina/ quitina.



Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

7.1.3. Ensaio de atividade Hemaglutinante

O ensaio de atividade hemaglutinante (AH) foi realizado em placas de microtitulação, de acordo com a metodologia descrita por Paiva e Coelho (1992). Para análise da atividade lectínica, a amostra oriunda da cromatografia de afinidade passou por diálise, para a remoção do ácido presente. Em seguida, alíquota (50 µL) da amostra foi diluída serialmente 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. AH específica (AHE) foi definida pela razão entre o título e a concentração proteica (mg/mL).

7.1.4. SDS-PAGE, Eletroforese Nativa

As frações que apresentaram maiores atividades hemaglutinantes foram reunidas e liofilizadas. Logo após foram ressuspensas em um volume de 200µL em solução de NaCl 0,15 M, para serem utilizadas no processo de eletroforese.

As eletroforeses foram executadas em voltagem constante, utilizando gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio, nas condições redutoras e nativas, com géis de 5 % e 10 % (m/v) para os géis de empilhamento e separação respectivamente (LAEMMLI, 1970). Foi utilizado como tampão de amostra Tris-HCl pH 6.8 0.5 M; 2 % SDS; 10 % Glicerol; 5 % 2-Mercaptoetanol; 0,001 % de azul de Bromofenol. As amostras foram aquecidas por 5 min a 100 °C. A massa aproximada da enzima foi estimada com marcador de peso molecular (AmershamT^MFull-Range RainbowTM (12000-225000 Da). Quanto a eletroforese nativa, seguimos o mesmo protocolo, sendo que nestas as amostras não foram submetidas a aquecimento, nem foram reduzidas com 2-mercaptoetanol.

Os géis foram corados com azul de coomassie dissolvido em ácido acético a 10 % (v/v), por 4hs e em seguida revelado com solução descorante (10 % ácido acético, 40 % de metanol e 5 0% água destilada).

7.1.5. Determinação da Concentração de Proteína

A concentração da proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976), usando albumina de soro Bovino como padrão (250-0,009 µg/mL). Para isso 10 µL das amostras diluídas (1:10), adicionados 790 µL de Água e 200 µL de reagente de

Bradford. Posteriormente as amostras foram incubadas por 5 min, e medido a absorbância a 595 nm. As unidades correspondentes são (mg/mL) de proteína.

7.1.6. Ensaio de Inibição e Especificidade de Carboidratos e Glicoproteínas

A inibição da atividade hemaglutinante (HA) foi avaliada utilizando carboidratos e glicoproteínas como descrito por Carvalho et al. (2015). Para tanto, alíquotas de 50 µL da amostra foram submetidas à incubação 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. Para o controle positivo foi utilizada uma alíquota de 50 µL 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.

Foram utilizadas soluções inibidoras nas concentrações de 0,2 M e 0,1 M, 0,5 M e 0,25 M para carboidratos D – Galactose, D – Glicose, Maltose, Fucose, Ribose, Raminose, Glicopiranose, Piranose, D – Frutose, D - Arabinose, D - Lactose, Manose, N-acetil-monosamina, N-acetil-glicosamina, N-acetil-galactose e 500 µg, 250 µg e 125 µg para glicoproteína (fetuína). A inibição é quantificada em razão da redução da AHE quando comparado com o controle positivo.

7.1.7. Ensaio da Avaliação de temperatura, Estabilidade térmica e efeito do pH mediante a atividade Hemaglutinante.

O ensaio para avaliar a estabilidade da lectina isolada da própolis vermelha de Alagoas (PVAL) em diferentes valores de pH foi feito com alíquotas de 200µL que foram colocadas em membranas semipermeáveis (poros de 12 kDa e diâmetro de 2,5 cm) para diálisar por 6 h, com trocas a cada 2 h, contra vários tampões com pH variando de 3 a 12: Tampão Citrato-fosfato 100 mM (pH 3,0 – 4,0), Acetato de sódio 100 mM (pH 5,0 - 6,0) Fosfato de sódio 100 mM (pH 7,0), Tris-HCl 100 mM (pH 8,0) e Glicina-NaOH 100 mM (pH 9,0– 12,0). Em seguida todas as amostras foram submetidas aos testes de atividade hemaglutinante com suspensão (2,5 % v/v) de eritrócitos de coelhos, para verificação da melhor atividade hemaglutinante.

O teste de temperatura e estabilidade térmica foi avaliado mantendo alíquotas de 200 µL (PVAL) em tubos de 1,5 mL, a temperaturas que variaram gradativamente entre 20-120°C, em banho maria com óleo, devido ao seu maior ponto de ebulição,

durante 30 e 60 min, respectivamente. Após esse período, as amostras foram centrifugadas (15.000 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.

7.1.8. Efeito do EDTA e de Cátions divalentes sobre a Atividade Hemaglutinante

A dependência de cátions divalentes (Ca^{2+} e Mn^{2+}) para a atividade hemaglutinante da PVAL foi determinada pelo método de dupla diluição seriada usando EDTA como agente quelante, conforme PAJIC et al. (2002). Para tanto, alíquotas de 200 μL foram colocadas em membranas semipermeável com poros de 12 kDa, apresentando diâmetro de 2,5 cm, em dialises por 6 horas, com troca a cada 2 horas, frente ao EDTA e as soluções de Ca^{2+} e Mn^{2+} , e avaliados frente ao teste de atividade hemaglutinante.

7.1.9. Atividade Biológica

7.1.9.1. Ensaio de Atividade Antifúngica

As linhagens fúngicas foram cultivadas em Meio YPD (Yeastextract – Peptone - Dextrose) por incubação a 35 °C. Em seguida, as concentrações das culturas foram ajustadas turbidometricamente a 530 nm para $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônia (UFC) por mL (0,5 na escala de McFarland). Para determinação da concentração mínima inibitória (CMI), amostras (50 μL) foram adicionadas a 50 μL de Meio RPMI; em seguida, seis diluições (até 1:128) foram realizadas.

Todos os poços foram inoculados com 50 μL da cultura de fungos e as microplacas foram incubadas a 35 °C por 24 h. Os ensaios foram feitos em duplicata. No controle positivo, 50 μL da cultura de fungos foram inoculados em um poço contendo somente Meio RPMI. No controle negativo (último poço de diluição da amostra) são colocados em 50 μL de Meio RPMI mais 50 μL de solução fisiológica 0,9%. Após incubação, a densidade ótica a 530 nm (DO_{530}) foi medida utilizando espectrofotômetro para microplacas. A CMI foi determinada como a menor concentração na qual ocorreu a diminuição maior ou igual a 99% em relação à DO_{530} no controle negativo (NCCLS, 2003).

7.1.9.2. *Ensaio do Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado (TTPA)*

O ensaio de TTPA foi avaliado pela interferência das proteínas em estudo, no tempo de coagulação do plasma de camundongo, que foi adquirido no biotério da escola paulista de medicina (UNIFESP), segundo a metodologia descrita por De Andrade Luz et al. (2013). Nos ensaios foi usado plasma de camundongo sexo masculino em boas condições de saúde, segundo o Comitê de Ética da Universidade Federal de São Paulo, número CEP 1793/11, de acordo com a legislação federal brasileira. O plasma coletado por punção venosa não-traumática, foi transferido imediatamente para o tubo contendo anticoagulante citrato de sódio 100 mM, ocorrendo a separação imediata do plasma do concentrado de hemácias por centrifugação a 3000 x rpm por 5 minutos.

Os testes foram realizados com PVAL, em concentrações crescentes em mg/mL (0,056, 0,11, 0,14, 0,22, 0,26, 0,36, 0,55 e 1,1), tendo como controle negativo uma solução salina (NaCl 0,15 M), e como controle positivo Heparina (12,5 U) (liquemine® – Roche). Os resultados foram expressos pelo tempo para formação do coágulo, em segundos.

7.1.9.3. *Ensaio do Tempo de Protrombina (PT)*

Coleta, materiais, soluções tampões utilizados são idênticos aos utilizados na avaliação do APTT. 50 µL das alíquotas foram adicionados à 50 µL de plasma, separadamente. A solução foi mantida por 300 segundos a 37°C. Decorrido o tempo adicionou-se 100 µL de tromboplastina cálcica previamente incubada a 37°C. Então o cronômetro foi acionado e a contagem encerrada imediatamente após a formação do coágulo. Controles negativos foram feitos contendo apenas uma solução salina (NaCl 0,15 M), e como controle positivo Heparina (12,5 U) (liquemine® – Roche). Os resultados foram expressos pelo tempo para formação do coágulo, em segundos (DE ANDRADE LUZ et al., 2013).

7.2. RESULTADOS E DISCUSSÕES

7.2.1. Preparo do extrato bruto e precipitação proteica

Buscando identificar a presença de lectinas própolis vermelha de foi avaliada a atividade leticínica da preparação do extrato bruto frente a algumas soluções e verificou-se que a maior atuação da lectina se deu no extrato bruto preparado com solução salina NaCl 0,15M, visto que este uma contração proteica de 0,656 mg/mL e AHE igual a 390. Outras lectinas também utilizaram solução salina, no processo de extração, como a GuazuL, isolada das folhas de *Guazuma ulmifolia* LAM (SANTOS, 2021) e EgviL, extraída dos capítulos florais de *Egletes viscosa* (GOMES, 2020).

Na tentativa de obter maior concentração da proteína de interesse, e consequentes melhores valores de atividade hemaglutinante foram testadas diferentes metodologias de precipitação, tais como precipitação orgânica (etanol e acetona) e salina (sulfato de amônio). Ao analisar a Tabela 16, percebe-se que ambos os agentes mostraram resultados significativos de atividade hemaglutinante, no entanto após o processo de diálise realizado para eliminar os solventes orgânicos da amostra que seria utilizada posteriormente no método cromatográfico, percebeu-se uma perda exponencial da atividade lectinica. Dentre estes, o sulfato de amônio mostrou ser mais estável e menos agressivo a essas proteínas (lectinas). Devido a isso, optou-se em prosseguir com a precipitação salina, visto que a fração com a atividade hemaglutinante pode ser aplicada sequencialmente a cromatografia, sem a necessidade de diálise. Dentre as frações da precipitação, foi observado que a fração 0-20 % foi o que apresentou maior atividade leticínica (HAE: 652,55).

Tabela 15- Precipitação proteica com diferentes agentes precipitantes.

Agentes precipitantes	Quantificação de Proteínas Bradford mg/mL	Atividade Hemaglutinante AH	Atividade Hemaglutinante Específica AHE
Extrato Bruto	31,56 (15 mL)	16	0,5
Sulfato de amônio			
F1- 0-20% (Precipitado)	0,049 (1,5 mL/ 14 mL)	32	652,55
F2- 20-40% (Precipitado)	0.049 (1,5)		
F3- 40-60% (Precipitado)	1.43 (12 mL)		
F5- 40-80% (Precipitado)	0,733 (2,5 mL/ 24 mL)		
F5- 80-100%(Sobrenadante)	0.312 (23 mL)		
Etanol			
F1- 0-20% (Precipitado)	0,754 (2,0 mL/ 25 mL)	1024	1,358
F2- 20-40% (Precipitado)	0,695 (2,0 mL/ 24 mL)	512	0,736
F3- 40-60% (Precipitado)	0,217 (1,0 mL/ 23 mL)	128	0,589
F4- 60-80% (Precipitado)	0,112 (1,0 mL/ 22mL)	32	0,285
F5- 80-100% (Sobrenadante)	0,085 (21 mL)	0	0
Acetona			
F1- 0-20% (Precipitado)	0,856 (2,0 mL/ 22 mL)	1024	1,189
F2-20-40%(Precipitado)	0,694 (2,0 mL/ 24 mL)	512	0,737
F3- 40-60%(Precipitado)	0,342 (1,0 mL/ 23 mL)	256	0,748
F4- 60-80%(Precipitado)	0,115 (0,5 mL/ 22 mL)	64	0,556
F5 – 80-100% (Sobrenadante)	0,085 (21 mL)	0	0

Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

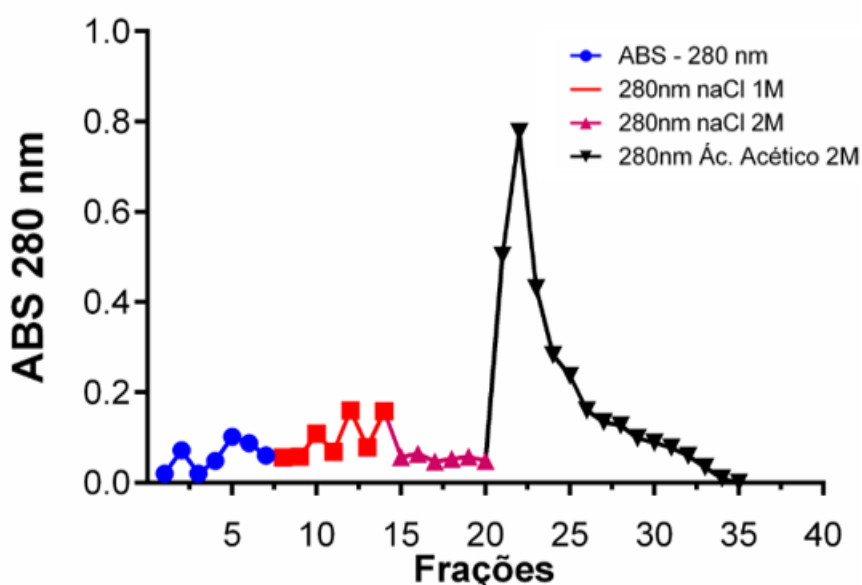
O método de precipitação de proteínas é caracterizado como uma etapa fundamental no processo de purificação proteica, visto que, este tende a concentrar a amostra em um número mínimo de frações, sendo ideal que se concentre em apenas uma fração, além de eliminar boa parte dos contaminantes presentes na amostra. Para a eficácia do método, fatores como temperatura e agitação devem ser observados (WARNER, 2017).

Diversos trabalhos relatam a utilização desse método como antecessor dos processos cromatográficos. Santos (2020) verificou a importância do uso de sulfato de amônio (20 % de saturação) na purificação da lectina das folhas de *Jatropha multifida* L., Kamei (2022) em seu trabalho destinado a purificação de lectinas de sementes de *Meizotropis buteiformis*, utilizou sulfato de amônio equivalente a saturação de 50- 80% (m/v), EL-ARABY et al., (2020) purificaram lectinas de três sementes de cultivares egípcias de *Vicia faba*, *Lens culinaris* e *Pisum sativum* L., com 90 % de saturação.

7.2.2. Purificação da lectina

Após precipitação salina com sulfato de amônio, a fração com maior atividade específica (F0-20 %) foi submetida a cromatografia de afinidade com matriz de N-acetilglucosamina/ quitina de 10 cm de comprimento, onde todas as proteínas foram eluidas e aquelas que apresentaram interação com a matriz, como é o caso da lectina, foi desligada utilizando ácido acético 1M (Figura 55).

Figura 55- Cromatografia de afinidade- Própolis Vermelha de Alagoas.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

De acordo com os resultados mostrados no cromatograma, vemos que a cromatografia separou as proteínas com significativa resolução, uma vez que o método cromatográfico apresentou alguns picos, onde estes se mostraram pouco expressivos, corresponderam a proteínas não adsorvidas, que não apresentaram atividade hemaglutinante, enquanto o último pico de proteínas, bem acentuado, correspondendo as adsorvidas eluidas com ácido acético. As frações obtidas da cromatografia foram monitoradas quanto a presença de proteínas, por meio da leitura espectrofotômetra a 280 nm e avaliada a atividade hemaglutinante.

Outras lectinas de origem vegetal foram isoladas usando apenas um passo cromatográfico, por cromatografia de afinidade com matriz de quitina, a exemplos das lectinas: TCLs, isolada dos frutos de tomate (*Solanum lycopersicum*), PeLL, isolada das folhas de *Portulaca elatior*, PeRoL, isolada da raiz de *Portulaca elatior*, PgTeL, extraída da sarcotesta das sementes de *Punica granatum* e SteLL, isolada de folhas

de *Schinus terebinthifolius* (ARFIN et al., 2022; DA SILVA et al., 2021; EL-ARABY et al., 2020; SILVA et al., 2019; GOMES et al., 2013).

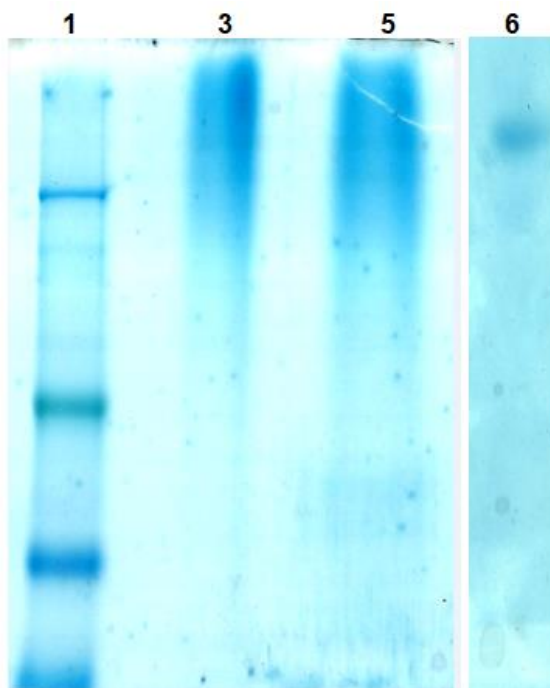
Vale ressaltar que lectinas ligadoras a matrizes de quitina são amplamente estudadas quanto aos efeitos antifúngicos, por serem capazes de se ligarem aos resíduos de N- acetilglicosamina, presentes na parede celular dos microrganismos de origem fúngica. Podendo ainda ser uma valiosa ferramenta para o controle de artrópodes, com ênfase, nos insetos, devido a estes serem possuidores de um exoesqueleto de quitina.

Lectinas de ligação à quitina são associadas às propriedades bacteriostáticas e antifúngicas devido a sua capacidade de se ligar a resíduos de N-acetilglicosamina, uma vez que uma grande quantidade de peptidoglicano na parede celular das bactérias e a quitina presente na parede celular dos fungos fornece múltiplos alvos para interações. Como foi relatado por Lima et al., (2019) a ligação de SteLL a esses resíduos de açúcares presente na parede celular de *S. aureus* perturbaram o processo de divisão celular e levaram a ação bactericida.

7.2.3. Eletroforese SDS-PAGE

As frações que apresentaram atividade hemaglutinante foram reunidas e dialisadas para remoção do ácido acético da amostra. Em virtude da baixa concentração proteica, a amostra foi liofilizada para, em seguida ser utilizada no processo de eletroforese, necessário para avaliar o perfil de proteínas existente nas frações que apresentaram HA (Figura 56).

Figura 56- Eletroforese com gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (10%) da lectina purificada a partir da PVA. Canaleta 1: Padrão de massa; Canaleta 3: Lectina em condições desnaturante e não redutora; Canaleta 5: Lectina em condição desnaturante e redutora com β - mercaptoI; Canaleta 6: Lectina pura em condições desnaturante e não redutora. A eletroforese foi processada a voltagem constante (90 mV), e as bandas foram coradas com Coomassie.



Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Ao analisar o gel de eletroforese, pode-se verificar que, ao ser submetida a desnaturação na ausência de um agente redutor, a amostra oriunda da cromatografia de afinidade apresentou apenas uma banda proteica, de elevado peso molecular (caneleta 3), comparando com o marcador molecular (canaleta 1) e ao ser adicionado um agente redutor foi fragmentada em duas bandas (canaleta 5), inferindo que se trata de uma proteína constituída por dímeros. Estes resultados demonstram efetividade no processo de purificação de uma nova lectina extraída da própolis vermelha de Alagoas.

É importante salientar que algumas lectinas são proteínas que apresentam além de aminoácidos, glicídios associados a suas moléculas, ou seja, essa porção glicocarbohidratada pode fazer parte da arquitetura carbônica da proteína purificada, podendo favorecer o aumento do peso molecular, assim como a estabilidade da mesma, quando submetida a situações, como elevação térmica (SANTOS, 2020). Essa característica estrutural como observada em trabalhos como os de Arfin et al. (2022), de Siqueira Patriota et al. (2022), Costa et al. (2018).

7.2.4. Teste de Inibição com Carboidratos e Glicoproteínas

Buscando caracterizar a lectina purificada da própolis vermelha de Alagoas, quanto a especificidade, sua atividade hemaglutinante foi avaliada frente alguns carboidratos e glicoproteína (Tabela 17). Este ensaio determina também o grau de especificidade da lectina a carboidratos, sendo o carboidrato mais específico aquele que resulta na maior inibição da hemaglutinação (PAIVA et al., 2012).

Tabela 16-Teste de inibição da atividade hemaglutinante da Lectina de PVA por carboidratos

CARBODRATOS	HA	AHE	Log HA
Controle	1024	12.800	3.01
N-acetilgalactosamina	1024	12.800	3.01
Maltose	1024	12.800	3.01
Fucose	1024	12.000	3.01
Raminose	512	12.800	3.01
Glicopiranosídeo	256	6.400	2.7
Glicose	128	3.200	2.4
N-acetilglicosamina	128	1.600	2.1
N-acetilmonosamina	128	1.600	2.1
Galactose	64	800	1.8
Ribose	64	800	1.8
Frutose	64	800	1.8
Lactose	64	800	1.8
Sacarose	32	400	1.5
Manose	32	400	1.5
Arabinose	32	400	1.5
GLICOPROTEÍNAS	HA	AHE	Log HA
Fetúina	256	3.200	2.4
Azocaseína	16	200	1.2
Bsa	16	200	1.2
Caseína	8	100	0.9

Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Dentre os carboidratos testados, observa-se que HA não foi alterada por N-acetilgalactosamina, maltose e fucose. Em contrapartida, um grande número de glicídeos foram capazes de inibir a atividade hemaglutinante, como mostrado na Tabela 16. Dentre estes a sacarose, manose e arabinose mostraram grande especificidade com a lectina estudada, sendo responsáveis pela maior inibição detectada entre os monos, di e oligossacarídeos. Observa-se ainda que a HA foi inibida, em maior percentual, quando a lectina foi incubada com glicoproteínas, dentre estas a caseína foi capaz de inibir, quase que completamente, a atividade da lectina. Essa característica sugere que a lectina apresente sítios de ligações capazes de

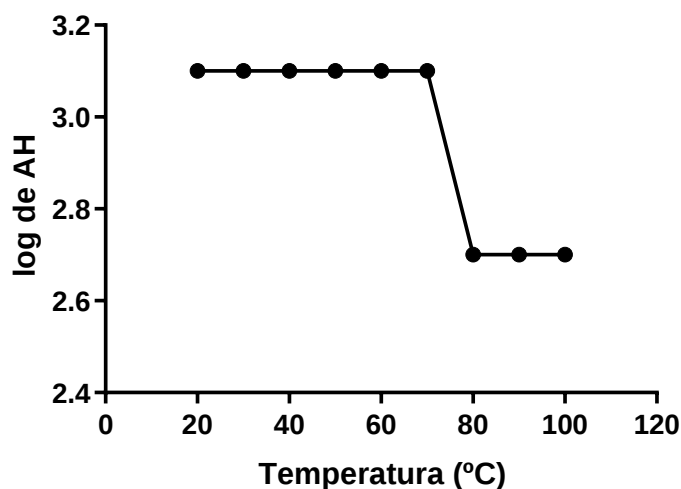
interagir com diferentes grupos de carboidratos, como os mono, dissarídeos e oligossacarídeos das glicoproteínas.

Algumas lectinas podem apresentarem sítios de ligações a carboidratos de um tamanho estendido, favorecendo maior interação com as glicoproteínas, de modo que as porções de açúcar dos glicoconjugados se organizem em uma geometria mais favorável para interação lectina-açúcar, quando comparado com carboidratos mais simples, como mono e dissacarídeos (SILVA et al., 2016). Outros estudos obtiveram resultados semelhantes. A lectina de tubérculos *Aponogeton natans* (ANTL) foi fortemente inibida pelos oligômeros de N -acetilglucosamina (DARA et al., 2021). Farias (2020), ao purificar a lectina semente de castanha-da-índia (*Aesculus hippocastanum* L.) observou que sua AH reduzida em 75 %, quando em contato com os carboidratos arabinose, manose, maltose e lactose. A lectina JamuLL também foi inibida parcialmente pela caseína (SANTOS, 2020).

7.2.5. Teste de Temperatura ótima e Termoestabilidade

Os ensaios de AH, após incubação das preparações em diferentes temperaturas mostraram que a AHE de todas as frações proteicas foi detectada até os 100 °C, onde se observa que essa atividade foi mantida no até 70 °C, a partir dessa temperatura ocorreu uma redução significativa da AHE, porém ainda assim mostrou-se ativa, como mostrado no gráfico representado na Figura 57.

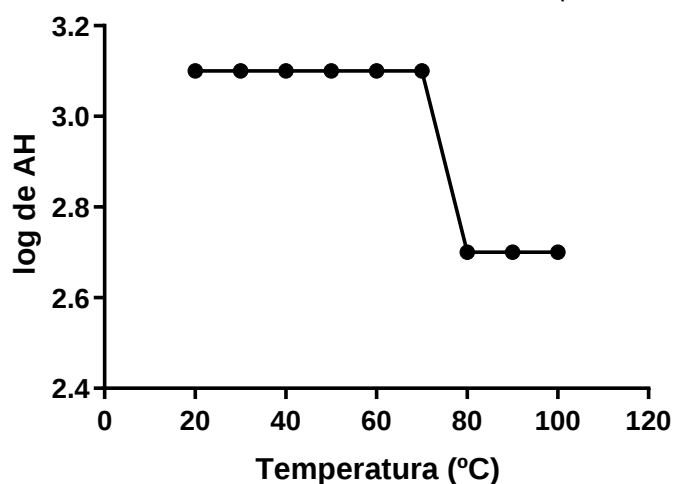
Figura 57- Teste de Temperatura ótima. As amostras foram incubadas por 30 minutos.



Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Para avaliar sua termoestabilidade, a lectina da PVA foi aquecida por 60 minutos em faixa de temperatura que variou de 20 a 100 °C. Ao observar o gráfico representado na Figura 58, se observa que a lectina de PVA apresentou AH até 100 °C, o que sugere alta estabilidade térmica. Em um estudo realizado por Da Silva e colaboradores (2019) foi sugerido que a estabilidade térmica da PeRoL (*Portulacacaelator root lectin*) ocorreu em virtude da presença de ligações dissulfeto associadas a termoestabilidade proteica, também detectadas nas proteínas presentes nas sementes de *Apuleia leiocarpa*, *Bauhinia forficata* e *Moringa oleifera* (DA SILVA, 2019). Portanto, a atividade hemaglutinante observada pela lectina da própolis pode ser oriunda da presença de ligações dissulfeto, já relatada no processo de eletroforese SDS-PAGE, que na presença de um agente redutor, observou-se um dímero na estrutura da lectina, que podem promover essa estabilidade. Duarte (2021) purificou a lectina das folhas de *Combretum leprosum* Mart., com características termoestáveis, semelhantes a encontradas neste estudo.

Figura 58- Teste de Termoestabilidade. As amostras foram incubadas por 1Hs.



Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

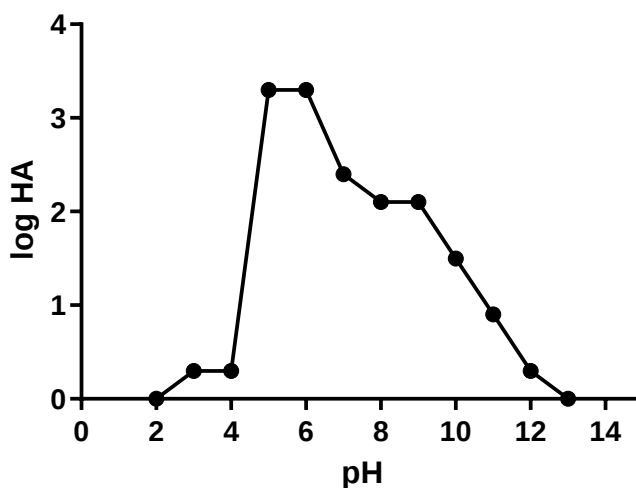
7.2.6. Teste de Estabilidade e Variação do PH

A lectina purificada exibiu maior atividade de hemaglutinação na faixa de pH 5 a 6, reduzindo sua HA entre os pH 7 e 9, sendo inativada apenas em pH 13, revelando a presença de uma lectina ácida (Figura 59 e 60). Quanto a estabilidade em pH, observa-se comportamento semelhante, com os determinados para atividade ótima, alta estabilidade em pH 5 e 6, e diminuição nos valores acima destes, sendo inativada em pH13. Estes resultados vão ao encontro dos já reportados para lectinas isolados

dos tubérculos *Aponogeton natans*, que apresentou maior HA em pH 6 (DARA et al., 2021). Outra lectina de natureza ácida é a Ddel que apresentou maior atividade na faixa de pH 5 e 6 e diminuindo consideravelmente em faixa de pH 9 – 10. (TORRES et al., 2019).

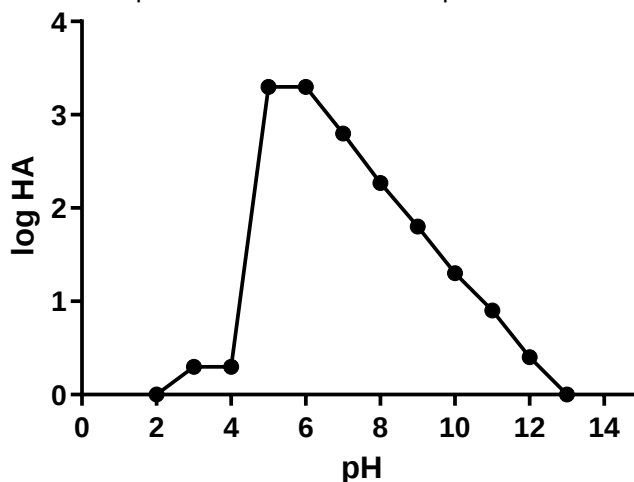
As mudanças que ocorrem no estado de ionização da lectina, quando afetada pelo pH determina as forças de ligação entre estas proteínas e a membrana dos eritrócitos, levando a uma perda de atividade, uma que extremos de pH podem alterar a estrutura nativa da lectina devido às mudanças no estado de ionização dos resíduos de aminoácidos, o que pode levar à desnaturação da lectina (SILVA et al., 2020).

Figura 59- Teste de pH ótimo. A lectina foi dializada por 2 horas em todos os pHs.



Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Figura 60- Teste de estabilidade ao pH. A lectina foi dializada por 6 horas em todos os pHs.



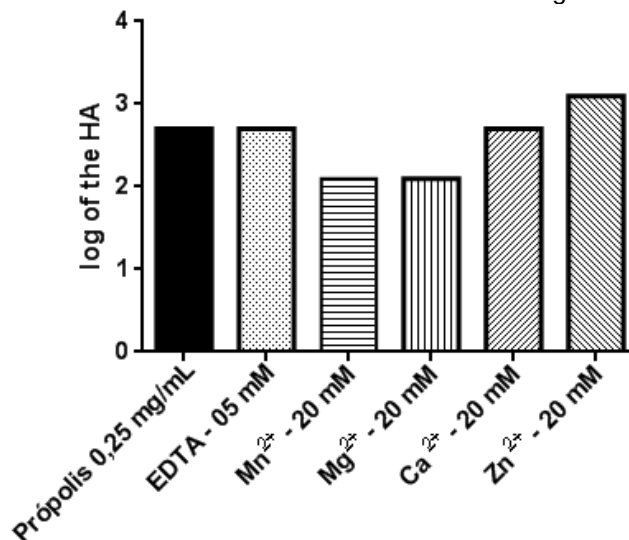
Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

7.2.7. Efeito do EDTA e de Cátions divalentes sobre a Atividade Hemaglutinante

A atividade de hemaglutinação da lectina em estudo não foi perturbada na presença de EDTA (Figura 61), sugerindo que esta não requer íons metálicos para sua atividade. Padrão semelhante foi observado no caso das lectinas da semente de *G. americana* e *R. mangle*, apresentadas neste estudo, que também não sofreram influência desse composto quelante. Ao observar sua atuação frente a íons divalentes, Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} e Zn^{2+} percebeu-se que a HA não foi influenciada na presença de cálcio, porém foi parcialmente inibida na presença dos íons manganês e magnésio e restaurada na presença de íons zinco (Figura 61). Alguns pesquisadores mostraram que a atividade aglutinante da lectina *Inocybe umbrinella*, apresentou resultados semelhantes ao encontrados neste trabalho, uma vez que foi inibida pelos íons Ca^{2+} , Mg^{2+} e Mn^{2+} (ZHAO; WANG, 2009). Além disso os íons Mn^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} também se mostraram capazes de inibir a atividade da lectina purificada das sementes de *Entada rheedii*.

Desta forma, pode-se concluir que os íons Mn^{2+} e Mg^{2+} são íons essenciais e desempenham um papel importante na manutenção de sua atividade biológica, assim como observado com os íons Zn^{2+} que influenciou no aumento da HA. Quando um íon metálico específico se recombina com uma lectina, esta tende a mudar sua conformação de ligação, portanto estes íons desempenham um papel fundamental na manutenção da estabilidade da estrutura da lectina e na manutenção de sua atividade biológica específica (JIANG et al., 2019).

Figura 61- Efeito do EDTA e íons divalentes na atividade hemaglutinante.



Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

7.2.8. Atividade Biológica

7.2.8.1. Atividade antimicrobiana de PVAL frente a bactéria e fungos patogênicos

De acordo com os resultados mostrados na Tabela 17 e Figura 62 é possível evidenciar a eficiência da lectina (PVAL). A atividade antifúngica foi avaliada frente ao extrato bruto, fração F1 e PVAL em diferentes concentrações. Nossa investigação teve respaldo graças a infinidade de relatos da literatura sobre as propriedades antimicrobianas da Própolis Vermelha de Alagoas. O ensaio avaliou as leveduras *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e a bactéria *Staphylococcus aureus*.

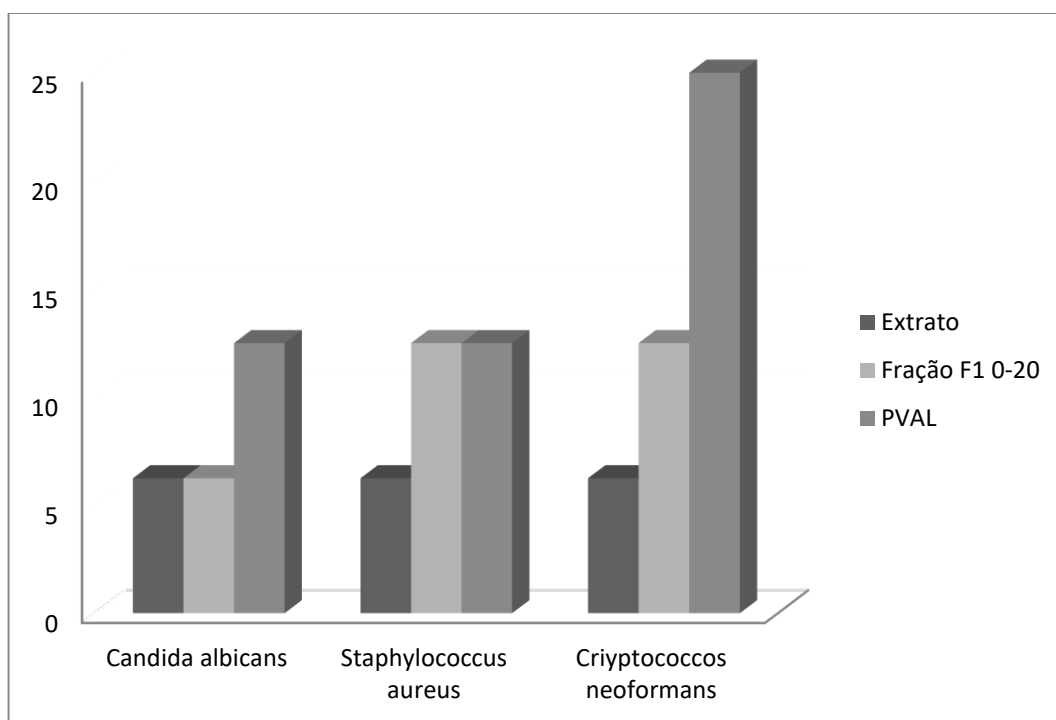
O Extrato hidroalcólico da própolis foi capaz de inibir o crescimento das três cepas de leveduras e bactéria testadas sobre uma concentração de 6,25 µg/ mL e a fração F1 teve uma atividade inibitória de 6,25, 12, 5 e 12,5 µg/ mL para *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* e *Cryptococcus neoformans*, respectivamente. Já a PVAL se mostrou extremamente eficiente sobre uma concentração 12,5 µg/ mL, para *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* e de 25 µg/ mL, para *Cryptococcus neoformans*.

Tabela 17- Atividade antimicrobiana de PVAL frente a bactéria fungos patogênicos.

Microorganismos	Amostra	MIC (µg/mL)
<i>Candida albicans</i>	Extrato	6,25
	F1 0-20	6,25
	PVAL	12,5
<i>Staphylococcus aureus</i>	Extrato	6,25
	F1 0-20	12,5
	PVAL	12,5
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Extrato	6,5
	F1 0-20	12,5
	PVAL	25

Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Figura 62- Atividade antimicrobiana de PVAL frente a bactéria e fungos patogênicos.



Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Os gêneros *C. albicans*, *C. neoformans* e *S. aureus* apresentam diferenças significativas semelhanças concernentes a sua estrutura celular e mecanismos de ação. Isso demonstra a versatilidade que PVAL apresentou em inibir organismos patogênicos distintos, o que pode caracterizar diferentes maneiras de bloqueio, inibição e possível morte celular. Devido a sua promissora atividade e versatilidade

inibitória podemos afirmar que PVAL é uma promissora ferramenta contra agentes patológicos, podendo ser uma forte candidata a testes clínicos contra as leveduras e bactéria testadas.

Dados semelhantes foram vistos por COSTA et al. (2018), quando avaliou a atividade antifúngica da lectina casca de *Genipa americana* (GaBL), com CMI nas concentrações de 12,5 e 25 µg/ mL frente *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*, respectivamente. Silva et al. (2018) relataram que a lectina da sarcotesta de *Punica granatum* (PgTeL) apresentou efeito inibitório sobre o crescimento de *C. albicans* e *C. krusei*, com CMI de 25 e 12,5 µg/mL, respectivamente. Uma lectina oriunda de folíolos de *Calliandra surinamensis*, denominada CasuL, foi avaliada contra *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*. Essa lectina foi ativa apenas contra *C. krusei*, apresentando valores de CMI e CMF de 125 e 250 µg/mL, respectivamente.

De acordo com Silva et al. (2019) foi isolada uma lectina de raízes de *Portulaca elatior* (PeRoL), que apresentou atividade antifúngica contra *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. tropicalis* com CMI de 16 µg/mL. Recentemente, Santos et al. (2021) descreveram os efeitos da lectina solúvel em água de sementes de *Moringa oleifera* (WSMoL) no crescimento e sobrevivência de espécies de *Candida*. WSMoL inibiu o crescimento de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* com CMI de 20 µg/mL. A ConBr apresentou atividade antifúngica contra oito isolados do gênero *Candida*, e *Trichosporon cutaneum* CMI entre 2 e 256 µg/mL (GOMES et al., 2012).

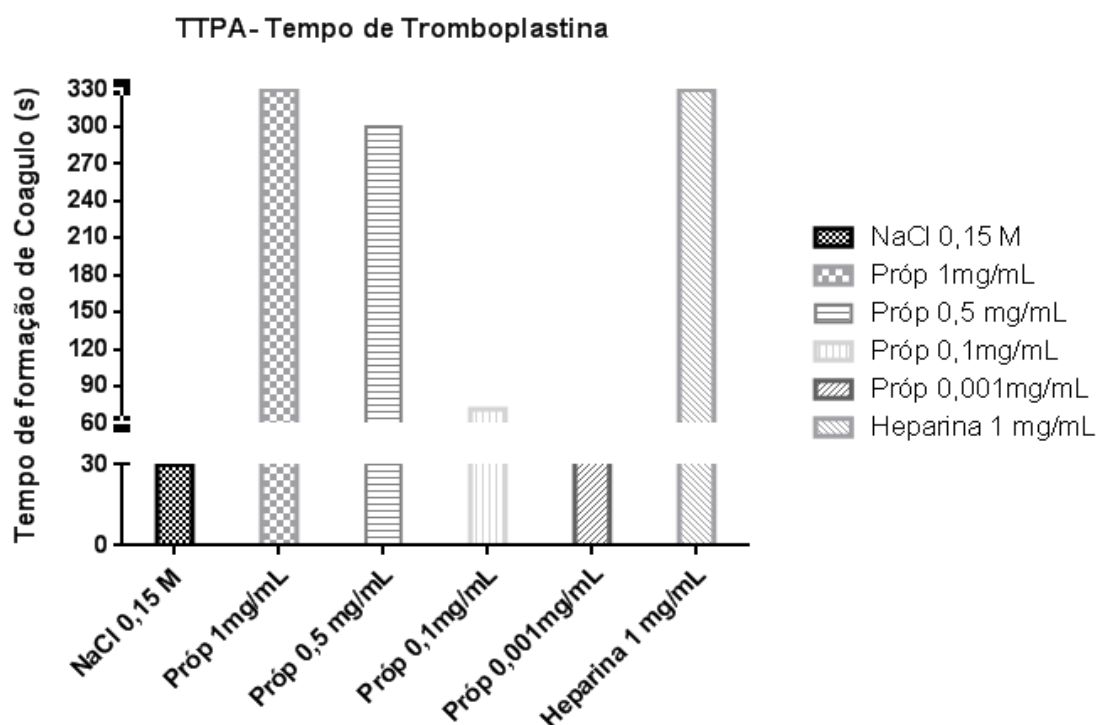
Com base nos dados representados e nos estudos descritos na literatura, é essencial que novas pesquisas possam ser realizadas com PVAL, frente a outros organismos patogênicos, pois a mesma apresentou dados muito promissores, não só para a compreensão do papel fisiológico de lectina, mas para futuras aplicações no combate de agentes patológicos que afetam a saúde humana e de outros organismos de interesse econômico. Nosso grupo vem tentando esclarecer por quais mecanismos de ação PVAL tem inibido o crescimento de espécies dos gêneros estudados nesse trabalho.

4.2.5.6. Ensaio do Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado (TTPA) e da atividade da Protrombina.

A influência de GaBL na coagulação sanguínea foi determinada pelo tempo de tromboplastina parcial ativada (PTTA) e tempo de protrombina (PT), como mostrado nas Figuras 63 e 64.

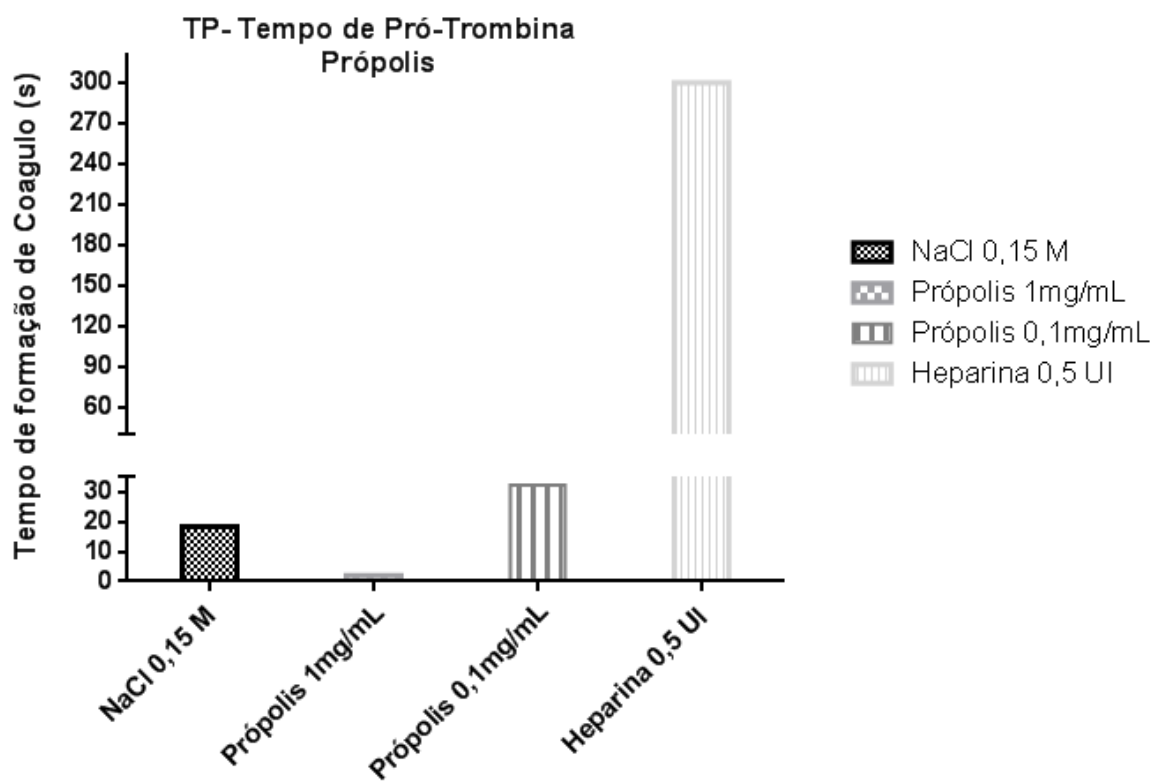
O ensaio de TTPA foi avaliado pela interferência das proteínas em estudo PVAL no tempo de coagulação do plasma de camundongo. Ao analisar os dados expressos na Figura 62 fica evidente que PVAL apresenta uma elevada capacidade na alteração do tempo normal de coagulação, nas concentrações de 0,1 a 1 mg/ mL. Vale ressaltar que, na concentração de 0,5 mg/ mL, PVAL apresentou valores muito semelhantes a Heparina, prolongando o tempo de coagulação circunstancialmente. Entretanto quando avaliado frente ao tempo de protrombina (TP), PVAL mostrou expressiva inibição desta via como mostrado na (Figura 64), o que sugere maiores estudos realacionados aos mecanismos de ação dessa lectina frente a esses mecanismos homeostáticos.

Figura 63- Avaliação da interferência das proteínas em estudo PVAL no tempo de coagulação do plasma de camundongo



Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Figura 64- Avaliação do tempo de TP pela interferência das proteínas em estudo (PVAL).



Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

O prolongamento do TTPa sugere inibição da via intrínseca e/ou coagulação sanguínea comum, enquanto o prolongamento do TP sugere inibição da via extrínseca. A determinação do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) é essencial no monitoriamento do efeito da heparina ou similares e na determinação de deficiências dos fatores de coagulação (VIII, IX, XI e XII) (DAVIE; FUJIKAWA; KISIEL, 1991). Nos últimos anos, uma diversidade de novos anticoagulantes tem sido desenvolvida e testada, a fim de inibir as etapas nas vias de coagulação (DE ANDRANDE LUZ et al., 2014). Enquanto que o tempo de protrombina (TP) demonstra a atividade do fator II (protrombina), V, VII e X, cuja deficiência é acompanhada por um prolongamento do tempo necessário para a formação do coágulo (DA SILVA, 2006).

Outras lectinas também prolongam significativamente os tempos de coagulação. cMoL, lectina purificada das sementes da *Moringa oleifera* prolongou significativamente o aPTT e PT, nas concentrações testadas (3,0, 15, 30, 37,5, 45 e 60 µg/mL) (DE ANDRANDE LUZ et al., 2014). Cramoll 1,4, lectina da semente de

Cratylia mollis promoveu, aproximadamente o dobro no aumento nos tempos de coagulação (SILVA et al., 2011)

8. CAPÍTULO VI

CONCLUSÕES

CONCLUSÃO

8.1 Lectina da casca de *Genipa americana* (GaBL).

- ✓ Foi obtido a espécie em estudo seguindo a metodologia de Costa et al. (2018).
- ✓ Obtivemos o extrato bruto e fração da casca de *Genipa americana*.
- ✓ Foi confirmada a atividade lectínica na atividade Hemaglutinante.
- ✓ Concluímos que os métodos de isolamento e caracterização proposto por Costa et al. (2018), são efetivos para obtenção da lectina pura e com alta atividade específica.
- ✓ Confirmamos a inibição por carboidratos, em especial por lactose e fetuína.
- ✓ A lectina GaBL não se mostrou tóxica para linhagens celulares de fibroblastos 3T3 em concentrações abaixo de 50 µg/mL.
- ✓ GaBL apresentou atividade anticoagulante frente ao teste de TTPA, entretanto quando avaliada frente a TP a mesma não promoveu alteração.
- ✓ Avaliamos as linhagens celulares de câncer de pele humano (A431), melanoma (B16) e carcinoma de células escamosas da língua (SCC9).
- ✓ GaBL diminuiu de forma expressiva a proliferação das linhagens em estudo nas concentrações de 10 µg/mL.
- ✓ Verificamos GaBL foi capaz de induzir pela via apoptótica, através da realização do PCR de transcrição reversa para caspase-3, as células B16 e SCC9 nas concentrações de 10 µg/mL.
- ✓ A regulação positiva de GaBL de E-caderina e supressão de Col1A1 em todas as cepas testadas indicou um menor desenvolvimento de câncer.
- ✓ Esse trabalho confirmou nossas hipóteses sobre o grande potencial anticancerígeno de GaBL, sendo esta uma promissora ferramenta biotecnológica, devido suas propriedades físico-químicas e especificidade a carboidratos.

8.2 Lectina da semente de *Genipa americana* (GaSL).

- ✓ O espécime em estudo foi catalogado e identificado como *Genipa americana* L.
- ✓ O extrato da semente de *Genipa americana* apresentou atividade hemaglutinante e de inibição para carboidratos simples e Glicoproteínas, tais como: Ramnose e Fetuína respectivamente.
- ✓ A partir do extrato foi possível a realização do fracionamento salino onde conseguimos isolar a proteína de interesse em uma única fração F1 (0-20%).

- ✓ A purificação se deu a partir de dois passos cromatográficos: Exclusão Molecular (sephacryl S-100) e Troca iônica (DEAE-Sepharose).
- ✓ A partir da eletroforese nativa e desnaturante conseguimos observar a pureza de GaSL, onde, ao ser tratada com agente desnaturante a mesma forma dímeros, contudo, se faz necessário a aferição exata de seu peso molecular.
- ✓ Para os testes com íons a lectina não se mostrou sensível para íons divalentes e EDTA.
- ✓ GaSL é classificada como uma lectina termoestável, uma vez que apresenta atividade em temperatura de até 80 ° C e na faixa de pH 5,0 a 6,0.
- ✓ A lectina teve invejável atividade antifúngica, sendo capaz de inibir os fungos *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* e *Cryptococcus neoformans* e uma concentração de 12,5 µg/mL.

8.3. Lectina da semente do propágulo de *Rhizophora mangle* (RmSL).

- ✓ O espécime em estudo foi cedido pelo laboratório de Biomateriais e Espctroscopia da Universidade Estadual de São Paulo – USP.
- ✓ O extrato da semente do propágulo de *Rhizophora mangle* apresentou atividade hemaglutinante e de inibição para carboidratos simples e Glicoproteínas, tais como: Arabinose e caseína respectivamente.
- ✓ A partir do extrato foi possível a realização do fracionamento salino onde conseguimos isolar a proteína de interesse em uma única fração F2 (40-80%).
- ✓ A purificação se deu a partir de um único passo cromatográfico em cromatografia de afinidade por quitina, onde constatamos apenas um pico com atividade hemaglutinante.
- ✓ A partir da eletroforese nativa e desnaturante conseguimos observar a pureza de RmSL, onde, ao ser tratada com agente desnaturante a mesma forma dímeros, contudo, se faz necessário a aferição exata de seu peso molecular.
- ✓ A lectina de sementes de *R. mangle* é também termoestável e teve melhor atividade em pH 8,0 e 9,0 e teve sua AH reduzida em presença de íons Mn^{2+} , Mg^{2+} e Ca^{2+} , não alterada por EDTA e estimulada em presença de Zn^{2+} .

8.4. Lectina da Própolis Vermelha de Alagoas (PVAL).

- ✓ A própolis vermelha de Alagoas foi obtida do apicuário da Fazenda Boa Vista, Zona Rural do Município de Coruripe - Alagoas, BR.
- ✓ O extrato da Própolis Vermelha apresentou atividade hemaglutinante e forte inibição por carboidratos simples e Glicoproteínas, tais como: Manose e Caseína respectivamente.
- ✓ A partir do extrato foi possível a realização do fracionamento salino onde conseguimos isolar a proteína de interesse em uma única fração F1 (0-20%).
- ✓ A purificação se deu a partir de um único passo cromatográfico em cromatografia de afinidade por quitina, onde constatamos apenas um pico com atividade hemaglutinante.
- ✓ A partir da eletroforese nativa e desnaturante conseguimos observar a pureza de PVAL, onde, ao ser tratada com agente desnaturante a mesma forma dímeros, contudo, se faz necessário a aferição exata de seu peso molecular.
- ✓ A lectina de Própolis Vermelha se mostrou termoestável e teve melhor atividade em pH 5,0 e 6,0 e teve sua AH reduzida em presença de íons Mn^{2+} , Mg^{2+} , levemente estimulada por Zn^{2+} e não afetada por EDTA e Ca^{2+} .
- ✓ PVAL mostrou notável atividade antifúngica, sendo capaz de inibir os fungos *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* a uma concentração de 12,5 µg/mL. e *Cryptococcus neoformans* e uma concentração de 25 µg/mL.
- ✓ A lectina apresentou atividade anticoagulante frente ao teste de TTPA, entretanto quando avaliada frente a TP a mesma promoveu inibição.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRA, M. F et al. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 18: 472-508. 2008.

AGUIAR, Évelyn Silva de. Purificação e caracterização físico-química de uma lectina ligante à manose das sementes de *Parkia pendula* (WILLD.) Benth. ex Walp. 2021.

AGUIAR, Gisele Rocha. Estudo químico e avaliação biológica da própolis vermelha de Alagoas. 2015.

AHMED, Md Nasir et al. Plant lectins as prospective antiviral biomolecules in the search for COVID-19 eradication strategies. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 146, p. 112507, 2022.

AKEV, Nuriye; CANDOKEN, Eda; KURUCA, Serap Erdem. Comparative study on the anticancer drug potential of a lectin purified from aloe vera and aloe-emodin. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP**, v. 21, n. 1, p. 99, 2020.

ALARCON-AGUILERA, F. J. et al. Study of the anti-hyperglycemic effect of plants used as antidiabetics. **Journal of ethnopharmacology**, v. 61, n. 2, p. 101-110, 1998.

ALBUQUERQUE, Karla dos Santos Pedrosa de; TONHOLO, Josealdo. Oportunidade de Negócio Sustentável, uma Própolis Vermelha de Alagoas. 2021.

ALDANA-MEJIA, Jennyfer A. et al. A validated HPLC-UV method for the analysis of phenolic compounds in Brazilian red propolis and *Dalbergia ecastaphyllum*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 198, p. 114029, 2021.

ALENCAR, Severino Matias de et al. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. **Journal of ethnopharmacology**, v. 113, n. 2, p. 278-283, 2007.

ALL CANCERS. SOURCE: Globocan 2020. The Global Cancer Observatory. International Agency for Research on Cancer (IARC). [Citado em 11 de Ago de 2021]. Disponível em <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/39-All-cancers-fact-sheet.pdf>.

ALMEIDA, E.R. **Plantas medicinais brasileiras**: conhecimentos populares e científicos. São Paulo: Hemus, 1993, 341 p.

ALMOG, J. et al. Genipin - a novel fingerprint reagent with colorimetric and fluorogenic activity. **Journal of Forensic Sciences**, v. 49, n. 2, p. 255-257, 2004.

ALVES, Robson Raion Vasconcelos et al. Myracrodruon urundeuva leaf lectin damages exochorionic cells and binds to the serosal cuticle of Aedes aegypti eggs. **3 Biotech**, v. 12, n. 5, p. 1-9, 2022.

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.

ALVES, Jovelina SF et al. Iridoids from leaf extract of Genipa americana. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, p. 641-644, 2017.

ANDRADE, Julianna Karla Santana et al. Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from Brazilian northeast region. **Food Research International**, v. 101, p. 129-138, 2017.

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.

ARAÚJO, J. G. Desenvolvimento de creme de *Rhizophora mangle L*: avaliação do potencial cicatrizante em feridas cutâneas. 2015. 132 f. Dissertação (Pós-Graduação em Ciências da Saúde), **Universidade Federal de Pernambuco**, Recife, 2015.

ARAÚJO, Jonalson Nogueira. Atividade citotóxica, bacteriostática e aglutinante para leishmania de ConM: uma lectina isolada das sementes do feijão de praia—*Canavalia marítima* (Aubl.) Thou. (1813). 2015. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

ARAÚJO, Regina MS et al. A lectina da casca de *Crataeva tapia* exerce atividades antitumorais, anti-inflamatórias e analgésicas. **Produtos naturais e bioprospecção**, v. 1, n. 2, p. 97-100, 2011.

ARAÚJO, Theolyta Santos de et al. Isolamento, purificação, caracterização e avaliação antinociceptiva e anti-inflamatória da lectina de semente de *Canna limbata* roscoe. 2011

ARFIN, Nawshin et al. Antibacterial, antifungal and in vivo anticancer activities of chitin-binding lectins from Tomato (*Solanum lycopersicum*) fruits. **Arabian Journal of Chemistry**, p. 104001, 2022.

AROKIYARAJ, Charles et al. Purification and structural characterization of lectin with antibacterial and anticancer properties from grubs of hide beetle, *Dermestes frischii*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 203, p. 312-332, 2022.

ARORA, Sushrut; SAXENA, Vikas; AYYAR, B. Vijayalakshmi. Affinity chromatography: A versatile technique for antibody purification. **Methods**, v. 116, p. 84-94, 2017.

AUGUSTO, C.V. et al. Giant Amazonian fish pirarucu (*Arapaima gigas*): its viscera as a source of thermostable trypsin. **Food chemistry**, v. 133, n. 4, p. 1596-1602, 2012.

AWALE, Suresh et al. Constituents of Brazilian red propolis and their preferential cytotoxic activity against human pancreatic PANC-1 cancer cell line in nutrient-deprived condition. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 16, n. 1, p. 181-189, 2008.

AZEVEDO, Alexandro et al. Combining gene therapy with other therapeutic strategies and imaging agents for cancer theranostics. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 606, p. 120905, 2021.

BANKOVA, Vassya. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 100, n. 1/2, p. 114-117, 2005.

BARBOSA, Paula Perazzo de Souza et al. Leguminosae lectins as biological tools in medical research: a review. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 64, 2021.

BARBOSA, NATANAEL CARDOSO. Uma revisão bibliográfica dos fatores antinutricionais: taninos, inibidores de proteases e lectinas. Trabalho de Conclusão de Curso de Licenciatura em Química, 2014.

BARBOSA, Paula Perazzo de Souza et al. Purificação, caracterização e atividade biológica de lectinas do extrato de sementes de canavalia brasiliensis (feijão-bravo-do-Ceará). 2013.

BARBOSA, D. A. Avaliação fitoquímica e farmacológica de *Genipa americana* L. (*Rubiaceae*). Tese de Doutorado. Dissertação (mestrado), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2008.

BARROS, Glauce SG et al. Pharmacological screening of some Brazilian plants. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 22, n. 2, p. 116-122, 1970.

BAUTISTA VALUIS, Luis Alfredo; MALLMA QUINTEROS, Juan Carlos. Efecto cicatrizante de una crema a base del extracto hidroalcohólico del fruto de *genipa americana* “huito” en animales de experimentación. 2020.

BEGNINI, Karine Rech et al. Brazilian red propolis induces apoptosis-like cell death and decreases migration potential in bladder cancer cells. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, 2014.

BERENGUER, B. et al. Protective and antioxidant effects of *Rhizophora mangle* L. against NSAID-induced gastric ulcers. **Journal of ethnopharmacology**, v. 103, n. 2, p. 194-200, 2006.

BERNINI, E. et al. Fitossociologia de florestas de mangue plantadas e naturais no estuário do Rio das Ostras, Rio de Janeiro, Biotemas, São Carlos, v. 27 n. 1, p. 37-48, 2014.

BESSA, N. G. F. et al. Prospeção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde–Tocantins. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 15, n. 4, p. 692-707, 2013.

BEZERRA, Anne Milane Formiga et al. Red propolis antifungal action on species of *Candida* of the oral cavity. **International Archives of Medicine**, v. 8, 2015.

BEZERRA, Walderly Melgaço. Microbioma de sedimentos de manguezais brasileiros e seu potencial biotecnológico. 2015.

BEZERRA, Rosiely F. **Purificação e caracterização parcial da lectina presente no soro do peixe amazônico Tambaqui (*Colossoma macropomum*)**. 2009. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.

BIES, Christiane; LEHR, Claus-Michael; WOODLEY, John F. Lectin-mediated drug targeting: history and applications. **Advanced drug delivery reviews**, v. 56, n. 4, p. 425-435, 2004.

BISPO, Jorge Luiz Peixoto; DE ALMEIDA, Ester Caetano; NUNES, Deisiane Moreira. Efeito do extrato bruto de jenipapo (*Genipa americana*) no controle do carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 9, p. e481997308-e481997308, 2020.

BKHAIRIA, Intidhar et al. Biochemical and molecular characterisation of a new alkaline trypsin from *Liza aurata*: Structural features explaining thermal stability. **Food chemistry**, v. 196, p. 1346-1354, 2016.

BLANCHARD, Jon; PRADO, Guillermo. Natural regeneration of *Rhizophora mangle* in strip clearcuts in northwest Ecuador. **Biotropica**, p. 160-167, 1995.

BLOTTA, K. D. et al. Fitossociologia comparativa de dois manguezais: Canal de Bertioga/SP e do estuário da Barra do Rio Una-Peruíbe-SP. **UNISANTA Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 5, n. 3, p. 271-282, 2016.

BOLT, Gert; KRISTENSEN, Claus; STEENSTRUP, Thomas Dock. Posttranslational N-glycosylation takes place during the normal processing of human coagulation factor VII. **Glycobiology**, v. 15, n. 5, p. 541-547, 2005.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos, Brasília, p. 148, 2009.

BREITENBACH BARROSO COELHO, L. C. et al. Lectins as antimicrobial agents. **Journal of applied microbiology**, v. 125, n. 5, p. 1238-1252, 2018.

BUENO-SILVA, Bruno et al. Anti-inflammatory and antimicrobial evaluation of neovestitol and vestitol isolated from Brazilian red propolis. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 61, n. 19, p. 4546-4550, 2013.

BHUTIA, Sujit K. et al. Plant lectins in cancer therapeutics: Targeting apoptosis and autophagy-dependent cell death. **Pharmacological research**, v. 144, p. 8-18, 2019.

BURGESS, Richard R. A brief practical review of size exclusion chromatography: Rules of thumb, limitations, and troubleshooting. **Protein expression and purification**, v. 150, p. 81-85, 2018.

BYUNG-CHUL, K.; HONG-GYUM, K.; SIN-AE, L.; SEUNGHWAN, L.; EUN-HEE, P.; SEONG-JIN, K.; CHANG-JIN, L. Genipin-induced apoptosis in hepatoma cells is mediated by reactive oxygen species/c-Jun NH2-terminal kinase-dependent activation of mitochondrial pathway. **Biochemical Pharmacology**, v. 70, n. 9, p. 1398-1407, 2005.

CABRAL, Ingridy Simone Ribeiro et al. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, v. 32, p. 1523-1527, 2009.

CÁCERES, A. et al. Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections. 2. Evaluation of antifungal activity of seven American plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 40, n. 3, p. 207-213, 1993.

CARDOSO, M. N. et al. Genetic diversity in native *Genipa americana* (Rubiaceae) populations in Sergipe, Brazil. 2019.

CARNEIRO, Mariela Andrea Medeiros Suarez et al. Efeitos imunomoduladores e anti-infecciosos da lectina de *Cratylia mollis* (Cramoll) em um modelo de infecção de ferida induzida por *Staphylococcus aureus*. **International Immunopharmacology**, v. 100, p. 108094, 2021.

CASTANHEIRA, Letícia Eulálio et al. Purificação e caracterização química e funcional de uma lectina tipo-C ligante de D-galactose da peçonha de *Bothropoides pauloensis* (*Bothrops pauloensis*). 2011.

CASTELÃO, Vitor José Alipio dos Santos. **Lectinas: uma nova atitude no diagnóstico e tratamento do cancro**. 2017. Tese de Doutorado.

CATANZARO, Elena et al. Antitumor potential of marine and freshwater lectins. **Marine drugs**, v. 18, n. 1, p. 11, 2019.

CAVADA, Benildo Sousa et al. Canavalia bonariensis lectin: Molecular bases of glycoconjugates interaction and antiglioma potential. **International journal of biological macromolecules**, v. 106, p. 369-378, 2018.

CAVENDISH, Rodrigo Lima et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Brazilian red propolis extract and formononetin in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 173, p. 127-133, 2015.

CHANDRASEKARAN, G.; LEE, Y.; PARK, H.; WU, Y.; SHIN, H. Antibacterial and antifungal activities of lectin extracted from fruiting bodies of the korean cauliflower medicinal mushroom, Sparassis latifolia (Agaricomycetes). **Int J Med Mushrooms**18(4), 291–299. 2016.

CHEN, Qi; KANG, Jian; FU, Caiyun. The independence of and associations among apoptosis, autophagy, and necrosis. **Signal transduction and targeted therapy**, v. 3, n. 1, p. 1-11, 2018.

CHETTRI, Dixita et al. Lectins: Biological significance to biotechnological application. **Carbohydrate Research**, v. 506, p. 108367, 2021.

COELHO, Luana Cassandra Breitenbach Barroso et al. Lectins, interconnecting proteins with biotechnological/pharmacological and therapeutic applications. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, 2017.

COOPER, Katrina F. Till death do us part: the marriage of autophagy and apoptosis. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, 2018.

CORREIA, Sarah Elizabeth Gomes. Purificação e caracterização físico-química de lectina isolada de sementes de Dalbergia ecastophyllum (L.) Taub. 2019.

COSKUN, Ozlem. Separation techniques: chromatography. **Northern clinics of Istanbul**, v. 3, n. 2, p. 156, 2016.

COSTA, Romero MPB et al. Can γ -radiation modulate hemagglutinating and anticoagulant activities of PpyLL, a lectin from Phthirusa pyrifolia?. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 125-136, 2017.

COSTA, Ricardo Bezerra et al. Purificação, caracterização e avaliação de atividade antifúngica e citotóxica da lectina de casca de Genipa americana (Jenipapo). 2018.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins pathologic basis of disease**. 7. ed. 2005.

CRUZ ZUMARAN, Katia Yeraldin. Efecto antibacteriano de tres concentraciones del extracto Hidroetanólico de la cáscara y pulpa de Genipa americana (Jagua) Sobre Cepas De *Streptococcus mutans* ATCC 25175, Trujillo-2019.

DA CONCEIÇÃO RIVANOR, Renata Line et al. A lectin from the green seaweed *Caulerpa cupressoides* reduces mechanical hyper-nociception and inflammation in the rat temporomandibular joint during zymosan-induced arthritis. **International Immunopharmacology**, v. 21, n. 1, p. 34-43, 2014.

DA CUNHA PEREIRA, Déborah Fernanda et al. Baltetina: uma nova lectina tipo C isolada do veneno da serpente *Bothrops alternatus* que atua como inibidor da agregação plaquetária. **Journal of Chromatography B**, v. 1173, p. 122695, 2021.

DAHLBÄCK, Björn. Blood coagulation. **The Lancet**, v. 355, n. 9215, p. 1627-1632, 2000.

DANTAS SILVA, Rejane Pina et al. Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts. **Plos one**, v. 12, n. 3, p. e0172585, 2017.

DARA, Shashikanth et al. Purificação e caracterização parcial de uma lectina de ligação à quitina de alta hemaglutinação de tubérculos de *Aponogeton natans*. **bioRxiv**, 2021.

DA SILVA, Suéllen Pedrosa et al. Purification, Characterization, and Assessment of Antimicrobial Activity and Toxicity of *Portulaca elatior* Leaf Lectin (PeLL). **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, p. 1-13, 2021.

DA SILVA, ALDENI JOSE. Purificação e caracterização de lectinas obtidas de *Scenedesmus sp.* Dissertação de mestrado. 2019.

DA SILVA, Cleidiane et al. Determination of total phenolic compounds and antioxidant activity of ethanolic extracts of propolis using ATR-FT-IR spectroscopy and chemometrics. **Food Analytical Methods**, v. 11, n. 7, p. 2013-2021, 2018.

DA SILVA, José Dayvid Ferreira. **Purificação e caracterização de uma lectina antimicrobiana da raiz de *Portulaca elatior***. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco. 2016.

DA SILVA, Paulo Henrique; HASHIMOTO, Yoshio. **Coagulação: visão laboratorial da hemostasia primária e secundária**. REVINTER, 2006.

DA SILVA FROZZA, Caroline Olivieri et al. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. **Food and chemical toxicology**, v. 52, p. 137-142, 2013.

DA SILVA SOUZA, Racquel Oliveira et al. Trypanocidal activity of polysaccharide extract from *Genipa americana* leaves. **Journal of ethnopharmacology**, v. 210, p. 311-317, 2018.

DAVIE, Earl W.; FUJIKAWA, Kazuo; KISIEL, Walter. The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. **Biochemistry**, v. 30, n. 43, p. 10363-10370, 1991.

DE ANDRADE LUZ, Luciana et al. Structural characterization of coagulant *Moringa oleifera* Lectin and its effect on hemostatic parameters. **International journal of biological macromolecules**, v. 58, p. 31-36, 2013.

DE ARAÚJO, Regina Maria Sousa et al. *Crataeva tapia* bark lectin is an affinity adsorbent and insecticidal agent. **Plant Science**, v. 183, p. 20-26, 2012.

DEEPA, Mundekkad et al. Purified mulberry leaf lectin (MLL) induces apoptosis and cell cycle arrest in human breast cancer and colon cancer cells. **Chemico-biological interactions**, v. 200, n. 1, p. 38-44, 2012.

DEGTYAREV, Michael; REICHEL, Mike; LIN, Kui. Novel quantitative autophagy analysis by organelle flow cytometry after cell sonication. **PloS one**, v. 9, n. 1, p. e87707, 2014.

DE-FARIA, Felipe Meira et al. Mechanisms of action underlying the gastric antiulcer activity of the *Rhizophora mangle* L. **Journal of ethnopharmacology**, v. 139, n. 1, p. 234-243, 2012.

DE JUAN, Laura Lavín et al. Aplicações farmacêuticas de lectinas. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 42, p. 126-133, 2017.

DELPRETE, P. G; SMITH, L. B; KLEIN, R.M. *Flora Ilustrada Catarinense: Rubiáceas*. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues. 2005.

DE LIMA, Amanda Beatriz Sales et al. Spectroscopy NIR and MIR toward predicting simultaneous phenolic contents and antioxidant in red propolis by multivariate analysis. **Food Chemistry**, v. 367, p. 130744, 2022.

DE MEJÍA, Elvira González; PRISECARU, Valentin I. Lectins as bioactive plant proteins: a potential in cancer treatment. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 45, n. 6, p. 425-445, 2005.

DE MARCO, Stefania et al. Antibiofilm and antioxidant activity of propolis and bud poplar resins versus *Pseudomonas aeruginosa*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, 2017.

DE SIQUEIRA PATRIOTA, Leydianne Leite et al. Purification, characterization, and immunomodulatory activity of a lectin from the seeds of horse chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.). **Current Research in Biotechnology**, v. 4, p. 203-210, 2022.

DE-SIMONE, Salvatore G.; PROVANCE, David W. Lectin Affinity Chromatography: An Efficient Method to Purify Horse IgG3. In: **Protein Downstream Processing**. Humana, New York, NY, 2021. p. 301-310.

DEVASAGAYAM, T. P. A. et al. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. **Japi**, v. 52, n. 794804, p. 4, 2004.

DEVEQUI-NUNES, Danielle et al. Chemical characterization and biological activity of six different extracts of propolis through conventional methods and supercritical extraction. **PLoS One**, v. 13, n. 12, p. e0207676, 2018.

DE YOE, Hudson et al. Biological Flora of the Tropical and Subtropical Intertidal Zone: Literature Review for *Rhizophora mangle* L. **Journal of Coastal Research**, v. 36, n. 4, p. 857-884, 2020.

DIAS, Lucas P. et al. *Machaerium acutifolium* lectin alters membrane structure and induces ROS production in *Candida parapsilosis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 163, p. 19-25, 2020.

DIAS, Heitor Menezes et al. Cuidados paliativos odontológicos a pacientes com câncer de cabeça e pescoço em Unidades de Terapia Intensiva: uma revisão integrativa da literatura. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 15, p. e143101522902-e143101522902, 2021.

DIAS SOUZA, Renata Kelly; ALCANTARA MORAIS MENDONÇA, Ana Cleide; PESSOA DA SILVA, Maria Arlene. Aspectos etnobotânicos, fitoquímicos y farmacológicos de espécies de Rubiaceae en Brasil. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 18, n. 1, p. 140-156, 2013.

DIKIC, Ivan; ELAZAR, Zvulun. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 19, n. 6, p. 349-364, 2018.

DI MINNO, A. et al. Old and new oral anticoagulants: Food, herbal medicines and drug interactions. **Blood Reviews**, v. 31, n. 4, p. 193–203, 2017.

DO BRASIL, Atlas dos Manguezais; DO SUL, PAN Herpetofauna. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. **Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade**, 2018.

DORNELLES, Leonardo Prezzi; PAIVA, Patrícia Maria Guedes. **EFEITO DE LECTINAS DE *Myracrodruon urundeuva* SOBRE BACTÉRIAS SIMBIONTES PRESENTES NO INTESTINO DE *Nasutitermes corniger***. 2011.

DOS SANTOS, Luis Eduardo Estellita Félix et al. ESTUDO DO EXTRATO DE RHIZOPHORA MANGLE E SEUS EFEITOS IN VITRO SOBRE A ATIVIDADE DA 7-ETOXIRESORUFINAO-DESETILASE (EROD) MICROSSOMAL HEPÁTICA EM RATOS. **Episteme Transversalis**, v. 10, n. 3, 2019.

DOS SANTOS TEIXEIRA, Kelly Cristina et al. Prospecção Tecnológica da Genipa Americana L. Exploration of Technological Genipa Americana L. **GEINTEC**, V. 11, n.1, p.5786-5794, jan/fev/mar, 2021.

DUARTE, Jady Alves. Caracterização lectínica e avaliação do potencial antimicrobiano de frações proteicas das folhas de Combretum Leprosum Mart. 2021.

DUARTE, Christiane Eliza Motta et al. BOL: a lectina extraída de *Brassica oleracea* ssp. botrytis e seus efeitos sobre macrófagos. **ANAIS SIMPAC**, v. 8, n. 1, 2017.

DUTTA, Debasmita et al. Nanoencapsulated betulinic acid analogue distinctively improves colorectal carcinoma in vitro and in vivo. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-20, 2019.

DUTTA, Indrajit et al. The efficacy of a novel insecticidal protein, *Allium sativum* leaf lectin (ASAL), against homopteran insects monitored in transgenic tobacco. **Plant Biotechnology Journal**, v. 3, n. 6, p. 601-611, 2005.

EL-DEEB, Dalia A. Insecticidal Activity, Growth Inhibitory and Biochemical Effects of Plant Lectins and *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* against the Pink Bollworm, *Pectinophora gossypiella*. **Alexandria Science Exchange Journal**, v. 42, n. JANUARY-MARCH, p. 11-20, 2021.

EL-ARABY, Magda M. et al. Characterization and antimicrobial activity of lectins purified from three Egyptian leguminous seeds. **AMB Express**, v. 10, n. 1, p. 1-14, 2020.

ERBANO, M.; DUARTE, M. R. Leaf and stem morpho-anatomy of *Genipa americana* L., Rubiaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 6, p. 825-832, 2010.

FARIAS, Maxmiliana Fernanda Alves Mariano Soares de. **Purificação, caracterização e atividade imunomoduladora de uma lectina da semente da Castanha-da-índia (*Aesculus hippocastanum* L.)**. 2020. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.

FAN, Qi-Wen et al. A dual phosphoinositide-3-kinase α /mTOR inhibitor cooperates with blockade of epidermal growth factor receptor in PTEN-mutant glioma. **Cancer research**, v. 67, n. 17, p. 7960-7965, 2007.

FEKETE, Szabolcs et al. Ion-exchange chromatography for the characterization of biopharmaceuticals. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 113, p. 43-55, 2015.

FERREIRA, CLÁUDIA NATÁLIA et al. A cell-based model of coagulation and its implications. **Revista brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, n. 5, p. 416-421, 2010.

FIGUEIRÔA, Evellyne de Oliveira et al. As lectinas pCramoll e rCramoll induzem a morte celular em células de adenocarcinoma da próstata humano (PC-3) pelo comprometimento da homeostase mitocondrial. **Toxicology in Vitro**, v. 43, p. 40-46, 2017.

FIK, E. et al. Effect of lectin from *Chelidonium majus* L. on normal and cancer cells in culture. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, v. 39, n. 2, p. 215-216, 2001.

FOLLAIN, Gautier et al. Fluids and their mechanics in tumour transit: shaping metastasis. **Nature Reviews Cancer**, v. 20, n. 2, p. 107-124, 2020.

FONSECA, VJA, BRAGA, AL, DE ALMEIDA, RS. Lectinas ConA e ConM extraídas de *Canavalia ensiformis* (L.) DC e *Canavalia rosea* (Sw.) DC inibem *Candida albicans* planctônica e *Candida tropicalis*. **Arch Microbiol** 204, 346 (2022).
<https://doi.org/10.1007/s00203-022-02959-x>

FRANCHIN, Marcelo et al. Vestitol isolated from Brazilian red propolis inhibits neutrophils migration in the inflammatory process: elucidation of the mechanism of action. **Journal of natural products**, v. 79, n. 4, p. 954-960, 2016.

FROZZA, C. O. S., et al. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 52, p. 137-142, 2013.

FU, L. et al. Plant lectins: targeting programmed cell death pathways as antitumor agents. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 43, n. 10, p. 1442-1449, 2011.

GARCIA-BERMUDEZ, Javier et al. Targeting extracellular nutrient dependencies of cancer cells. **Molecular Metabolism**, v. 33, p. 67-82, 2020.

GAMIE, Zakareya et al. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) for bone sarcoma treatment: Pre-clinical and clinical data. **Cancer letters**, v. 409, p. 66-80, 2017.

GAUTAM, Ajay Kumar et al. Legume lectins: Potential use as a diagnostics and therapeutics against the cancer. **International journal of biological macromolecules**, v. 142, p. 474-483, 2020.

GIRI, C. et al. Status and distribution of mangrove forests of the world using earth observation satellite data. **Global Ecology and Biogeography**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 154–159, 17 jan. 2011.

GOMES, Dayane Correia. **Purificação, caracterização e avaliação do potencial citotóxico da lectina extraída dos capítulos florais de Egletes viscosa.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco. 2020.

GOMES, F. S. et al. Antimicrobial lectin from *S chinus terebinthifolius* leaf. **Journal of applied microbiology**, v. 114, n. 3, p. 672-679, 2013.

GONDIM, Ana Claudia Silva. **Atividade antitumoral e antiviral de lectinas de leguminosas (tribo Phaseoleae, subtribo Diocleinae): ConBr, ConM, DLasiL e DSclerL.** 2014.

GONZÁLEZ-CRUZ, Leopoldo et al. Partial Purification and Characterization of the Lectins of Two Varieties of *Phaseolus coccineus* (Ayocote Bean). **Agronomy**, v. 12, n. 3, p. 716, 2022.

GRAIKOU, Konstantia et al. Characterization and biological evaluation of selected Mediterranean propolis samples. Is it a new type?. **LWT-Food Science and Technology**, v. 65, p. 261-267, 2016.

GROSS, P. L.; WEITZ, J. I. New anticoagulants for treatment of venous thromboembolism. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 28, n. 3, p. 380–386, 2008.

HIREMATH, Kavita Y. et al. A lectin with anti-microbial and anti proliferative activities from *Lantana camara*, a medicinal plant. **Protein Expression and Purification**, v. 170, p. 105574, 2020.

HOFFMAN, MAUREANE. A cell-based model of coagulation and the role of factor VIIa. **Blood reviews**, v. 17, p. S1-S5, 2003.

HÜTTE, Hermann J. et al. Uma lectina de ligação de manose bacteriana como uma ferramenta para o enriquecimento de peptídeos C e O-manosilados. **Química Analítica**, 2022.

IMAMICHI, Yoshitaka et al. Purification, characterization and cDNA cloning of a lectin from the brittle star *Ophioplocus japonicus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 262, p. 110757, 2022.

INUI, Saori et al. Identification of the phenolic compounds contributing to antibacterial activity in ethanol extracts of Brazilian red propolis. **Natural product research**, v. 28, n. 16, p. 1293-1296, 2014.

IORDACHE, F., IONITA, M., MITREA, L. I., FAFANEATA, C.; POP, A. Antimicrobial and antiparasitic activity of lectins. **Curr Pharm Biotechnol**, 16(2), 152-161. 2015.

JAIN, Monika et al. Insights into biological role of plant defense proteins: A review. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, p. 102293, 2022.

JAKOBEK, L. Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. **Food chemistry**, v. 175, p. 556-567, 2015.

JAVED, Mahwish et al. Purification and functional characterization of lectin from *Chenopodium album*. **Journal of Proteins and Proteomics**, v. 13, n. 1, p. 55-62, 2022.

JIANG, Bin et al. Two-step isolation, purification, and characterization of lectin from zihua snap bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. **Polymers**, v. 11, n. 5, p. 785, 2019.

JIANG, Li-Cheng et al. Inhibition of autophagy augments apoptosis in human oral squamous cell carcinoma under nutrient depletion. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 44, n. 5, p. 361-366, 2015.

JIANG, Q. L. et al. Plant lectins, from ancient sugar-binding proteins to emerging anti-cancer drugs in apoptosis and autophagy. **Cell Proliferation**, v. 48, n. 1, p. 17-28, 2015.

JONES, T. H., et al. Novel Antifungal Activity for the Lectin Scytovirin: Inhibition of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 755, 2017.

KAMEI, Rana et al. Purification and characterization of a novel D-Galactose binding lectin from seeds of *Meizotropis buteiformis*. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, 2022.

KFFURI, C. W. et al. Antimalarial plants used by indigenous people of the Upper Rio Negro in Amazonas, Brazil. **Journal of ethnopharmacology**, v. 178, p. 188-198, 2016.

KHAN, Fauzia et al. Lectins as markers for blood grouping. **Medical Science Monitor**, v. 8, n. 12, p. RA293-300, 2002.

KO, Sang-Mu et al. Development of lectin-linked immunomagnetic separation for the detection of hepatitis A virus. **Viruses**, v. 6, n. 3, p. 1037-1048, 2014.

KOCAZORBAZ, Ebru Kocadağ et al. Purification and Characterization of a Lectin from Bulbs of Cyclamen Mirabile. **Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi**, v. 8, n. 1, p. 1-7, 2021.

KONOZY, Emadeldin Hassan E.; OSMAN, Makarim El-fadil M.; DIRAR, Amina Ibrahim. Plant lectins as potent Anti-coronaviruses, Anti-inflammatory, antinociceptive and antiulcer agents. **Saudi Journal of Biological Sciences**, p. 103301, 2022.

LACERDA, Rodrigo Rodrigues e. Isolamento, caracterização e atividade biológica da lectina de sementes de variedade brasileira de feijão-lima (Phaseolus lunatus var. cascavel). 2015.

LEE, Wen-Chien; LEE, Kelvin H. Applications of affinity chromatography in proteomics. **Analytical biochemistry**, v. 324, n. 1, p. 1-10, 2004.

LEHANE, M. J. Peritrophic matrix structure and function. **Annual review of entomology**, v. 42, n. 1, p. 525-550, 1997.

LI, Wen-wen et al. Concanavalin A: a potential anti-neoplastic agent targeting apoptosis, autophagy and anti-angiogenesis for cancer therapeutics. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 414, n. 2, p. 282-286, 2011.

LIMA, Janaína Kívia Alves et al. Biototoxicity of aqueous extract of Genipa americana L. bark on red flour beetle Tribolium castaneum (Herbst). **Industrial Crops and Products**, v. 156, p. 112874, 2020.

LIMA, Isana Maria de Souza Feitosa et al. Schinus terebinthifolia leaf lectin (SteLL) has anti-infective action and modulates the response of Staphylococcus aureus-infected macrophages. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-14, 2019.

LIMA, Thâmarah de Albuquerque; PAIVA, Patrícia Maria Guedes. **AVALIAÇÃO DA LECTINA DE FOLHA DE MYRACRODUON URUNDEUVA COMO AGENTE LARVICIDA CONTRA AEDES AEGYPTI**. 2009.

LO, E. Y. Y. Y.; DUKE, N. C.; SUN, M. Phylogeographic pattern of Rhizophora (Rhizophoraceae) reveals the importance of both vicariance and long-distance oceanic dispersal to modern mangrove distribution. **BMC Evolutionary Biology**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 83, 2014.

LOPEZ, BG-C. et al. Antimicrobial and cytotoxic activity of red propolis: an alert for its safe use. **Journal of applied microbiology**, v. 119, n. 3, p. 677-687, 2015.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. Plantas medicinais no Brasil: Nativas e exóticas. 2^a Edição, Nova Odessa: **Instituto Plantarum**, 544p. 2004.

LUSTOSA, S. R., et al. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 447-454, 2008.

LUZ, M. N. C.; FRAGA, E. G. S. **Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de própolis vermelha frente ao propionibacterium acnes**. X Mmostra científica da farmácia. Qquixadá: centro universitário católica de quixadá, 2016.

MACEDO, Maria Lígia Rodrigues et al. Insecticidal action of Bauhinia monandra leaf lectin (BmoLL) against Anagasta kuehniella (Lepidoptera: Pyralidae), Zabrotes subfasciatus and Callosobruchus maculatus (Coleoptera: Bruchidae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 146, n. 4, p. 486-498, 2007.

MACEDO, Maria Lígia R.; OLIVEIRA, Caio FR; OLIVEIRA, Carolina T. Insecticidal activity of plant lectins and potential application in crop protection. **Molecules**, v. 20, n. 2, p. 2014-2033, 2015.

MACHADO, Bruna Aparecida Souza et al. Chemical composition and biological activity of extracts obtained by supercritical extraction and ethanolic extraction of brown, green and red propolis derived from different geographic regions in Brazil. **PloS one**, v. 11, n. 1, p. e0145954, 2016.

MAJIDPOOR, Jamal; MORTEZAEI, Keywan. Interleukin-2 therapy of cancer-clinical perspectives. **International Immunopharmacology**, v. 98, p. 107836, 2021.

MARCUCCI, M.C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, p.26, p.83-89,1995.

MARRERO, Evangelina et al. COX-2 and sPLA2 inhibitory activity of aqueous extract and polyphenols of *Rhizophora mangle* (red mangrove). **Fitoterapia**, v. 77, n. 4, p. 313-315, 2006.

MARQUELE, Franciane D. et al. Assessment of the antioxidant activities of Brazilian extracts of propolis alone and in topical pharmaceutical formulations. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 39, n. 3-4, p. 455-462, 2005.

MARIANO, Juliano Souza. Extração e caracterização de dois tipos de própolis: verde (mineira) e vermelha (alagoana). 2014.

MARTINEZ, Omar Arvey; SOARES, Ademilson Espencer Egea. Genetic improvement in the commercial Bbeekeeping in production of propolis. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 13, p. 982-990, 2012.

MAZALOVSKA, Milena; KOUOKAM, J. Calvin. Lectins as promising therapeutics for the prevention and treatment of HIV and other potential coinfections. **BioMed research international**, v. 2018, 2018.

MELCHOR, Gleiby et al. Antibacterial activity of *Rhizophora mangle* bark. **Fitoterapia**, v. 72, n. 6, p. 689-691, 2001.

MELO, Nayanna de Oliveira Ramos et al. Red propolis reduces inflammation in cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis in rats. **Biomédica**, v. 42, n. 2, 2022.

MESSIAS, M. C. T. B. et al. Uso popular de plantas medicinais e perfil socioeconômico dos usuários: um estudo em área urbana em Ouro Preto, MG, Brasil. **Rev. Bras. Pl. Med**, v. 17, n. 1, p. 76-104, 2015.

MISHRA, Abtar et al. Structure-function and application of plant lectins in disease biology and immunity. *Food and Chemical Toxicology*, v. 134, p. 110827, 2019. MITCHELL, Carter A.; RAMESSAR, Koreen; O'KEEFE, Barry R. Antiviral lectins: Selective inhibitors of viral entry. **Antiviral research**, v. 142, p. 37-54, 2017.

MONDAL, Saradmoni; SWAMY, Musti J. Purification, biochemical/biophysical characterization and chitooligosaccharide binding to BGL24, a new PP2-type phloem

exudate lectin from bottle gourd (*Lagenaria siceraria*). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 3656-3666, 2020.

MORITA, Takashi. Structures and functions of snake venom CLPs (C-type lectin-like proteins) with anticoagulant-, procoagulant-, and platelet-modulating activities. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 1099-1114, 2005.

MUKHERJEE, Ashis K.; DUTTA, Sumita; MACKESSY, Stephen P. A new C-type lectin (RVsnaclec) purified from venom of *Daboia russelii russelii* shows anticoagulant activity via inhibition of FXa and concentration-dependent differential response to platelets in a Ca²⁺-independent manner. **Thrombosis research**, v. 134, n. 5, p. 1150-1156, 2014.

MURALI, Pavitra et al. Novel role for the Golgi membrane protein TMEM165 in control of migration and invasion for breast carcinoma. **Oncotarget**, v. 11, n. 28, p. 2747, 2020.

MURUGESAN, Arul Kumar; GUNASAGARAN, Karuna Sagar. Purification and characterization of a synergistic bioactive lectin from *Pleurotus flabellatus* (PFL-L) with potent antibacterial and in-vitro radical scavenging activity. **Analytical Biochemistry**, v. 635, p. 114450, 2021.

MUSTHAFA, Shazia Anjum et al. Lectin isolated from *Abelmoschus esculentus* induces caspase mediated apoptosis in human U87 glioblastoma cell lines and modulates the expression of circadian clock genes. **Toxicon**, v. 202, p. 98-109, 2021.

NAIK, Sanjay; KUMAR, Sanjit. Biochemical Characterization of lactose binding Entadin lectin from *Entada rheedii* seeds with cytotoxic activity against cancer cell lines. **ACS omega**, v. 5, n. 27, p. 16430-16439, 2020.

NAITHANI, Sushma et al. Lectinas vegetais e seus muitos papéis: Ligação de carboidratos e além. **Journal of Plant Physiology**, v. 266, p. 153531, 2021.

NANDISH, Sharath Kumar M. et al. Purificação e caracterização de glicoproteína não enzimática (NEGp) de extrato tampão de semente de linho que apresenta atividade anticoagulante e antiplaquetária. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 163, p. 317-326, 2020.

NAPOLEÃO, T. H. et al. ***Moringa oleifera*: A Powerful Source of Environmentally, Medicinally and Biotechnologically Relevant Compounds**. In: Rusu Teodor. (Org.). *Advances in Applied Science and Technology*. 1ed. West Bengal: Book

Publisher International, 2019, v. 5, p. 58-77.

NASCIMENTO, K. S., et al. An overview of lectins purification strategies. **Journal of Molecular Recognition**, v. 25, n. 11, p. 527-541, 2012.

NASCIMENTO, A. K. C. et al. Produção simultânea de-fructofuranosidase e fructo-oligossacarídeos por *Penicillium citreonigrum* URM 4459. **ENZITEC 2016-XXII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática**, p. 1-4, 2016.

NASCIMENTO, Ana Paula M. et al. Anti-glioma properties of DVL, a lectin purified from *Dioclea violacea*. **International journal of biological macromolecules**, v. 120, p. 566-577, 2018.

Nathan Sharon, Halina Lis. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules, **Glycobiology**, 14, 11, Nov 2004, Pages 53R–62R, <https://doi.org/10.1093/glycob/cwh122>.

NETO, MS Regueira et al. Seasonal variation of Brazilian red propolis: Antibacterial activity, synergistic effect and phytochemical screening. **Food and Chemical Toxicology**, v. 107, p. 572-580, 2017.

NEVES, Michelline Viviane Marques das et al. Isoflavone formononetin from red propolis acts as a fungicide against *Candida* sp. **brazilian journal of microbiology**, v. 47, p. 159-166, 2016.

NOVAK, Estela Maria et al. Antitumoural activity of Brazilian red propolis fraction enriched with xanthochymol and formononetin: An in vitro and in vivo study. **Journal of functional foods**, v. 11, p. 91-102, 2014.

NGOC, D. P. et al. Characterization of immunogenic *Clonorchis sinensis* protein fractions by gel filtration chromatography. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 5, n. 4, p. 284-288, 2015.

NUBI, Tolulope et al. Purification and erythrocyte-membrane perturbing activity of a ketose-specific lectin from *Moringa oleifera* seeds. **Biotechnology Reports**, v. 31, p. e00650, 2021.

ODDEPALLY, Rajender; SRIRAM, Gopi; GURUPRASAD, Lalitha. Purification and characterization of a stable Kunitz trypsin inhibitor from *Trigonella foenum-graecum* (fenugreek) seeds. **Phytochemistry**, v. 96, p. 26-36, 2013.

OFORI-KWAKYE, Kwabena; KWAPONG, Awo Afi; BAYOR, Marcel Tunkumgnen. Wound healing potential of methanol extract of *Spathodea campanulata* stem bark formulated into a topical preparation. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 8, n. 3, 2011.

OHSUMI, Yoshinori. Historical landmarks of autophagy research. **Cell research**, v. 24, n. 1, p. 9-23, 2014.

OLADOKUN, Boniface Oladiran et al. Anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of *Tetracarpidium conophorum* seed lectin. **Scientific African**, v. 3, p. e00073, 2019.

OLDONI, T. L. C., et al. Isolation and analysis of bioactive isoflavonoids and chalcone from a new type of Brazilian propolis. **Separation and Purification Technology**, v. 77, p. 208-213, 2011.

OLIVEIRA, Messias V. et al. Purification and characterization of a highly thermostable GlcNAc-binding lectin from *Collaea speciosa* seeds. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 193, p. 1562-1571, 2021.

OLIVEIRA, Jaqueline Franciele Caetano de et al. Lectinas vegetais: de moléculas de defesa de plantas às suas diversas aplicações biotecnológicas. 2018.

OLIVEIRA, Jaqueline Franciele Caetano de et al. Lectinas vegetais: de moléculas de defesa de plantas às suas diversas aplicações biotecnológicas. 2018.

OLIVEIRA, Messias Vital de. Determinação estrutural de uma lectina pró-inflamatória de sementes de *Vaitarea guianensis* (Aublet). 2017.

OLIVEIRA, W. R. de. Lectinas de *Crotalaria spectabilis* R.: isolamento, purificação e atividade aglutinante em *Leptospirabiflexa* (saprófita) e *L. interrogans* (patogênica). 2017.

OLIVEIRA, M. V. de. Determinação Estrutural de Uma Lectina Pró-Inflamatória de Sementes de *Vatairea Guianensis* (Aublet). 58p. Dissertação (mestrado). Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, fortaleza. 2017.

OLIVEIRA, R. G.; TOGNELLA, M. M. P. Processo de colonização do manguezal do Rio Tavares por análise da estrutura de diferentes bosques. *Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology*, Itajaí, v.18, n. 1, p. 9-18, 2014.

OLIVEIRA, H. Chromium as an environmental pollutant: insights on induced plant toxicity. *Journal of botany*, v. 2012, 2012.

OSMAN M.E.M, AWADALLAH A.K.E, KONOZY E.H.E Isolation purification and partial characterization of three lectins from *Tamarindus indica* seeds with a novel sugar specificity *Int. J. Plant Res.*, 6 (1) (2016), pp. 13-19.

OSORIO, Andres F. et al. Wave dissipation across a *Rhizophora* mangrove patch on a Colombian Caribbean Island: An experimental approach. *Ecological Engineering*, v. 130, p. 271-281, 2019.

PAIVA, P. M. G. et al. Antimicrobial activity of secondary metabolites and lectins from plants. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, v. 1, p. 396-406, 2010.

PALHARINI, Julio G. et al. **Eutirucallin: A lectin with antitumor and antimicrobial properties.** *Frontiers in cellular and infection microbiology*, v. 7, p. 136, 2017.

PAWLACZYK, Izabela et al. Anticoagulant and anti-platelet activity of polyphenolic-polysaccharide preparation isolated from the medicinal plant *Erigeron canadensis* L. *Thrombosis Research*, v. 127, n. 4, p. 328-340, 2011.

PEREIRA JÚNIOR, Francisco Nascimento. **Caracterização estrutural parcial e biológica de uma lectina de sementes de *Dioclea reflexa* Hook F.** 2014.

PEREIRA, Z. V.; KINOSHITA, L. S. Rubiaceae Juss. of Parque Estadual das Várzeas do Rio Ivinhema, Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Hoehnea*, v. 40, n. 2, p. 205-251, 2013.

PERERA, Luz María Sánchez et al. Pharmacological and toxicological evaluation of *Rhizophora mangle* L., as a potential antiulcerogenic drug: Chemical composition of active extract. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, v. 2, n. 4, p. 56-63, 2010.

PEREIRA, A. S.; SEIXAS, F. R. M. S.; AQUINO NETO, F. R. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. *Química Nova*, v. 25, n. 2, p. 321-326, 2002.

PERERA, Luz María Sánchez; RUEDAS, Dayamí; GÓMEZ, B. C. Gastric antiulcer effect of *Rhizophora mangle* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, n. 1, p. 1-3, 2001.

PETER, C. M. et al. Atividade antiviral e virucida de extratos hidroalcoólicos de própolis marrom, verde e de abelhas Jataí (*Tetragonisca angustula*) frente ao herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e ao vírus da diarreia viral bovina (BVDV). **Pesq. Vet. Bras.**, v. 37, n. 7, p. 667-675, 2017.

PINTO JÚNIOR, Vanir Reis. Análise da estrutura cristalográfica de DLyl, uma lectina de sementes de *Dioclea lasiophylla* Mart. ex Benth, e avaliação do seu efeito citotóxico contra glioma. 2019.

PINTO, E. G. **Caracterização da espuma de jenipapo (*Genipa americana* L.) com diferentes aditivos visando à secagem em leito de espuma. 2009. 69f.** Tese de Doutorado. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) -Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga. 2009.

PINTO, L. M. A. PRADO, N. R. T. CARVALHO, L. B. Propriedades, usos e aplicações da própolis. **Revista Eletrônica de Farmácia** Vol. VIII (3), 76 - 100, 2011.

PINTO-JUNIOR, Vanir R. et al. Purification and molecular characterization of a novel mannose-specific lectin from *Dioclea reflexa* hook seeds with inflammatory activity. **Journal of Molecular Recognition**, v. 29, n. 4, p. 134-141, 2016.

PIRES, Hérica Ribeiro Almeida et al. Flood tolerance in two tree species that inhabit both the Amazonian floodplain and the dry Cerrado savanna of Brazil. **AoB Plants**, v. 10, n. 6, p. ply065, 2018.

PLATTNER, V. E. et al. Alteration of the glycosylation pattern of monocytic THP-1 cells upon differentiation and its impact on lectin-mediated drug delivery. **European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics**, v. 73, n. 3, p. 324-330, 2009.

PONIEDZIAŁEK, BARBARA et al. The effect of mushroom extracts on human platelet and blood coagulation: in vitro screening of eight edible species. **Nutrients**, v. 11, n. 12, p. 3040, 2019.

PORTO, R. G. C.L.; BARROS, N. V. A.; CUNHA, E. M. F.; ARAÚJO, M. A. M.; MOREIRA-ARAÚJO, R. S. R. Composição química, determinação de fenólicos totais e atividade antioxidante em polpa e semente de Jenipapo (*Genipa americana* L.). Universidade Federal do Piauí; 2010. 1-4.

POWELL, Kevin S. et al. Immunohistochemical and developmental studies to elucidate the mechanism of action of the snowdrop lectin on the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stal). **Journal of Insect Physiology**, v. 44, n. 7-8, p. 529-539, 1998.

PREETHAM, Elumalai et al. Antibiofilm and immunological properties of lectin purified from shrimp *Penaeus semisulcatus*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 106, p. 776-782, 2020.

PROCÓPIO, T. 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.

RAFIQ, Shaista et al. Purification and partial characterization of a fructose-binding lectin from the leaves of *Euphorbia helioscopia*. **Pak J Pharm Sci**, v. 27, p. 1805-10, 2014.

RATHNASAMY, Senthil Kumar; BALARAMAN, Harish Babu; MUNIASAMY, Ramya. Air-assisted dispersive liquid phase microextraction coupled chromatography quantification for purification of therapeutic lectin from aloe vera—A potential COVID-19 immune booster. **Microchemical Journal**, v. 165, p. 106187, 2021.

REGALADO, A. I.; SÁNCHEZ, L. M.; MANCEBO, B. *Rhizophora mangle* L. (mangle rojo): Una especie con potencialidades de uso terapêutico. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*. v. 4, p. 1-17. 2016.

REGALADO, Johana. **Evaluacion de los Efectos Antitumorales de Genipa Americana**. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso.

RENHE, I. R. T. et al. Extração e estabilidade do corante azul de jenipapo (*Genipa americana* L.). 2008.

REIS, João Henrique de Oliveira et al. Evaluation of the antioxidant profile and cytotoxic activity of red propolis extracts from different regions of northeastern Brazil obtained by conventional and ultrasound-assisted extraction. **PloS one**, v. 14, n. 7, p. e0219063, 2019.

REIS, João Henrique de Oliveira. Caracterização química e biológica de extratos de própolis vermelha do nordeste do Brasil obtidos por diferentes métodos de extração. (Dissertação). 2021

REYES-MONTAÑO, Edgar Antonio; VEGA-CASTRO, Nohora Angélica. Plant lectins with insecticidal and insectistatic activities. **Insecticides-Agriculture and Toxicology; IntechOpen: London, UK**, p. 17-42, 2018.

REZENDE, S. M. Distúrbios da Hemostasia: doenças hemorrágicas. *Rev Med Minas Gerais*, v. 20, n. 4, p. 534–553, 2010.

RIBEIRO, Juliane Paula Vieira. **Quantificação de biomoléculas e investigação de atividades biológicas do extrato e frações do cogumelo *Clavulina coralloides***. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. 2020.

RIBEIRO, Danielle R. et al. Inhibition of DMBA-induced oral squamous cells carcinoma growth by brazilian red propolis in rodent model. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 117, n. 2, p. 85-95, 2015.

RIDDEL JR, JAMES P. et al. Theories of blood coagulation. *Journal of Pediatric Oncology Nursing*, v. 24, n. 3, p. 123-131, 2007.

RIGHI, Adne A. et al. Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 13, p. 2363-2370, 2011.

RIVERO, Vilma Kenia Fondén et al. Eficacia de la crema de *Rhizophora mangle* l al 50% en el tratamiento local de las quemaduras dérmicas AB. **Multimed**, v. 19, n. 2, 2016.

RODRIGUES, Ilza Fernanda Barboza Duarte et al. Estudo dos constituintes voláteis e atividades antioxidante e microbiológica dos extratos de própolis vermelha de Alagoas. 2020.

ROLIM, S. G. et al. Prioridades e lacunas de pesquisa e desenvolvimento em silvicultura de espécies nativas no Brasil. São Paulo: WRI Brasil, 2020. Disponível em: <https://wribrasil.org.br/pt/publicacoes/prioridades-e-lacunas-de-pesquisae-desenvolvimento-em-silvicultura-de-especiesnativas>. Acesso em: 20 abr. 2021.

RUPACHANDRA, S.; SARADA, D. V. L. Induction of apoptotic effects of antiproliferative protein from the seeds of *Borreria hispida* on lung cancer (A549) and cervical cancer (HeLa) cell lines. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.

RUFATTO, Luciane Corbellini et al. Red propolis: Chemical composition and pharmacological activity. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, n. 7, p. 591-598, 2017.

RUZZA, D. A. C. et al. The genetic diversity and population structure of *Genipa Americana* (Rubiaceae) in Northern Mato Grosso, Brazil. **Gene Conserve**, v. 17, n. 69, 2018.

RYVA, Bradley et al. Wheat germ agglutinin as a potential therapeutic agent for Leukemia. **Frontiers in oncology**, v. 9, p. 100, 2019.

SÁ, R. A. 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.

SAMUELSON, B. T. et al. Laboratory Assessment of the Anticoagulant Activity of Direct Oral Anticoagulants: A Systematic Review. *Chest*, v. 151, n. 1, p. 127–138, 2017.

SÁNCHEZ, Janet et al. Antioxidant activity of *Rhizophora mangle* bark. **Fitoterapia**, v. 77, n. 2, p. 141-143, 2006. SALATINO, Antonio; SALATINO, Maria Luiza F. Brazilian red propolis: legitimate name of the plant resin source. **MOJ Food Process. Technol**, v. 6, p. 21-22, 2018.

SALOMÃO, A. N.; PADILHA, L. S. Avaliação preliminar da germinabilidade e da micoflora associada às sementes de *Genipa americana* em diferentes estágios de maturação. **Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Série Embrapa-Circular Técnica 50)**, 2006.

SAMAH, Saoud et al. Purification and characterization of Cc-Lec, C-type lactose-binding lectin: a platelet aggregation and blood-clotting inhibitor from *Cerastes cerastes* venom. **International journal of biological macromolecules**, v. 102, p. 336-350, 2017.

SÁNCHEZ, Janet et al. Antioxidant activity of *Rhizophora mangle* bark. **Fitoterapia**, v. 77, n. 2, p. 141-143, 2006.

SANTANA, Eduarda Santos de. **Hidrogéis à base da associação de *Rhizophora mangle* e ácido ascórbico: desenvolvimento e avaliações citotóxica e imunomoduladora**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco. 2019.

SANTOS, C. S. et al. Root deformation affects mineral nutrition but not leaf gas exchange and growth of *Genipa americana* seedlings during the recovery phase after soil flooding. **Brazilian Journal of Biology**, v. 82, 2021.

SANTOS, Lucas Adriel Tavares et al. Controle de qualidade e atividade antimicrobiana de extratos da própolis vermelha de Alagoas comercializados em Maceió. 2020.

SANTOS, Anyelly Gomes et al. Identificação, purificação e caracterização de uma lectina de folhas de *Jatropha multifida* L. (*MALPIGHIALES: EUPHORBIACEAE*). 2020.

SANTOS, Valdenice Ferreira dos. **Extração e caracterização parcial de uma lectina das sementes de *Camptosema rubicundum* HOOK. & ARN.** 2018.

SANTOS, A. F.S. et al. Lectins: Function, structure, biological properties and potential applications. **Current topics in peptide & protein research**, v. 15, p. 41-62, 2014

SATYANARAYANA, Behara et al. A socio-ecological assessment aiming at improved forest resource management and sustainable ecotourism development in the mangroves of Tanbi Wetland National Park, The Gambia, West Africa. **Ambio**, v. 41, n. 5, p. 513-526, 2012.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y.; CINTRÓN, G. Guia para estudo de áreas de manguezal: estrutura, função e flora. São Paulo: **Caribbean Ecological Research**, 1986. 150 p.

SENA-LOPES, Angela et al. Chemical composition, immunostimulatory, cytotoxic and antiparasitic activities of the essential oil from Brazilian red propolis. **PLoS One**, v. 13, n. 2, p. e0191797, 2018.

SHARON, Nathan; LIS, Halina. Lectins: Cell-Agglutinating and Sugar-Specific Proteins: Lectins provide new tools for studying polysaccharides, glycoproteins, and cell surfaces, and for cancer research. **Science**, v. 177, n. 4053, p. 949-959, 1972.

SHIVAMADHU, Madhu Chakkere et al. Anti-cancer and anti-angiogenic effects of partially purified lectin from *Praecitrullus fistulosus* fruit on in vitro and in vivo model. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 96, p. 1299-1309, 2017.

SILVA, A. J. et al. The green microalgae *Tetradismus obliquus* (*Scenedesmus acutus*) as lectin source in the recognition of ABO blood type: purification and characterization. **Journal of Applied Phycology**, v. 32, n. 1, p. 103-110, 2020.

SILVA, Simony Andrade; BARROS, Vitória; OLIVEIRA, Alexandre. Estrutura fitossociológica do manguezal da Lagoa do Roteiro, Alagoas, Nordeste do Brasil. **Ciência Florestal**, v. 30, p. 532-541, 2020.

SILVA, Ruan Vitor Teixeira da. Comportamento de *Apis mellifera* sobre *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) para produção de própolis vermelha em Alagoas. 2020.

SILVA, Valdemir C. et al. New Insights for Red Propolis of Alagoas—Chemical Constituents, Topical Membrane Formulations and Their Physicochemical and Biological Properties. **Molecules**, v. 25, n. 24, p. 5811, 2020.

SILVA, Lourenço Moniz Cunha. **A evolução do esvaziamento cervical**. Tese de Doutorado. 2020.

SILVA, J. D. F. et al., Portulaca elatior root contains a trehalose-binding lectin with antibacterial and antifungal activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, 126, 291-297, 2019.

SILVA, Josiane Ferreira da. **Otimização da imobilização de carboidratos em matrizes macroporosas para a purificação de lectinas por afinidade**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. 2018.

SILVA, F. R. G. et al. Phytochemical screening and in vitro antibacterial, antifungal, antioxidant and antitumor activities of the red propolis Alagoas. **Brazilian Journal of Biology**, v. 79, p. 452-459, 2018.

SILVA, Roberto José Amaro da et al. Isolamento e caracterização de uma nova lectina da casca de *Schinus terebinthifolius* (aroeira-da-praia). 2017.

SILVA, Pollyanna M. et al. The juicy sarcotesta of *Punica granatum* contains a lectin that affects growth, survival as well as adherence and invasive capacities of human pathogenic bacteria. **Journal of functional foods**, v. 27, p. 695-702, 2016.

SILVA, José Dayvid Ferreira da. Purificação e caracterização de uma lectina antimicrobiana da raiz de Portulaca elatior. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco. 2016.

SILVA, RASSAN DYEGO ROMÃO; DE MELO, ERICO MEIRELLES. A atual teoria da coagulação baseada em superfícies celulares. *Saúde & ciência em ação*, v. 2, n. 1, p. 79-92, 2016.

SILVA, C. R.; BALTAZAR, F.; ALMEIDA, A. C. **Propolis: a complex natural product with a plethora of biological activities that can be explored for drug development.** Propolis: a complex natural product with a plethora of 36 biological activities that can be. Evidence-based complementary and alternative medicine, V.2015, N.1, P.1-29, 2015.

SILVA, P. M. da. Caracterização estrutural e avaliação da atividade antimicrobiana da lectina da testa de *Punica granatum* L. 2015.

SILVA, Pollyanna Michelle da. Caracterização estrutural e avaliação da atividade antimicrobiana da lectina da testa de *Punica granatum* L. Dissertação de Mestrado. UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO. 2015.

SILVA, Denise Wanderlei et al. Antimicrobial activity of fractions of red propolis from Alagoas, Brazil Atividade antimicrobiana de frações da própolis vermelha de Alagoas, Brasil. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, 2012.

SILVA, Mariana CC et al. Purification, primary structure and potential functions of a novel lectin from *Bauhinia forficata* seeds. **Process biochemistry**, v. 47, n. 7, p. 1049-1059, 2012.

SILVA, Michele D. C da. **Aplicações biotecnológicas das lectinas ClaveLL (*Cladonia verticillaris* Lichen Lectin) E BmoLL (*Bauhinia monandra* Leaf Lectin).** 2008.

SILVA, Mariana CC et al. Immobilized *Cratylia mollis* lectin: An affinity matrix to purify a soybean (*Glycine max*) seed protein with in vitro platelet antiaggregation and anticoagulant activities. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 1, p. 74-80, 2011.

SILVA, S; TASSARA, H. Frutas Brasil frutas, 4th edn. **Empresa das Artes**, São Paulo. 2005.

SINDHURA, B. R. et al. High mannose N-glycan binding lectin from *Remusatia vivipara* (RVL) limits cell growth, motility and invasiveness of human breast cancer cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 93, p. 654-665, 2017.

SINGH, Ram Sarup; THAKUR, Shivani Rani; KENNEDY, John F. Purification and characterisation of a xylose-specific mitogenic lectin from *Fusarium sambucinum*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 152, p. 393-402, 2020.

SOARES, M. L. G. et al. Southern limit of the Western South Atlantic mangroves: assessment of the potential effects of global warming from a biogeographical perspective. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, Amsterdam, v. 101, p. 44-53, 2012.

SOLER ROGER, Dulce María et al. Estabilidad acelerada de un gel de *Rhizophora mangle* L(mangle rojo) para heridas y quemaduras. **Revista Cubana de Farmacia**, v. 45, n. 4, p. 563-574, 2011.

SOUZA, A. et al. **Fruteiras da Amazônia**. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI; Manaus: EMBRAPA-CPAA, 1996., 1996.

SOUZA, Vinicius Castro; LORENZI, Harri. Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III. 2012.

SOUZA DE JESUS, Alex et al. Bioactividad de iridoides de *Genipa americana* contra el ácaro del cocotero *Aceria guerreronis* Keifer (Acari: Eriophyidae). **Revista de Protección Vegetal**, v. 35, n. 1, 2020.

SOUSA-SANTOS, Catriane et al. Root deformation affects the allometric relationships of young plants of *Genipa americana* under contrasting light conditions. **New Forests**, p. 1-17, 2022.

SINDHURA, B. R. et al. High mannose N-glycan binding lectin from *Remusatia vivipara* (RVL) limits cell growth, motility and invasiveness of human breast cancer cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 93, p. 654-665, 2017.

SINGH, Ram Sarup; WALIA, Amandeep Kaur; KENNEDY, John F. Purification and characterization of a heterodimeric mycelial lectin from *Penicillium proteolyticum* with potent mitogenic activity. **International journal of biological macromolecules**, v. 128, p. 124-131, 2019.

SINGH, Ram Sarup; WALIA, Amandeep Kaur; KENNEDY, John F. Purification and characterization of a mitogenic lectin from *Penicillium duclauxii*. **International journal of biological macromolecules**, v. 116, p. 426-433, 2018.

SIMÃO, Estefani P. et al. Nanostructured impedimetric lectin-based biosensor for arboviruses detection. **Talanta**, v. 208, p. 120338, 2020.

SINGH, R. S., JAIN, P. AND KAUR, H. P. Characterization and antimicrobial activity of lectins from *Penicillium* sp. **Indian J Exp Biol.** 51, 984-991. 2013.

SRINIVAS, Balaji Kyathegowdanadoddi; SHIVAMADHU, Madhu Chakkere; JAYARAMA, Shankar. Musa acuminata lectin exerts anti-cancer effects on HeLa and EAC cells via activation of caspase and inhibitions of Akt, Erk, and Jnk pathway expression and suppresses the neoangiogenesis in in-vivo models. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 166, p. 1173-1187, 2021.

SPALDING, M.; KAINUMA, M.; COLLINS, L. World Atlas of Mangroves. London Washington, DC: Earthscan, 2010. v. 39

STOGER, Eva et al. Expression of the insecticidal lectin from snowdrop (*Galanthus nivalis* agglutinin; GNA) in transgenic wheat plants: effects on predation by the grain aphid *Sitobion avenae*. **Molecular Breeding**, v. 5, n. 1, p. 65-73, 1999.

STRYER, L.; BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L. Biochemistry: International Edition. 2006.

SUSREE, MODEPALLI; PANTELEEV, MIKHAIL A.; MOHAN, ANAND. Competitive Binding, and Accounting for Procoagulant Platelets, Significantly Change Thrombin Profiles in in vitro Coagulation. 2019.

TALLENT, W. H. Two new antibiotic cyclopentanoid monoterpenes of plant origin. **Tetrahedron**, v. 20, n. 7, p. 1781-1787, 1964.

TSANEVA, M., VAN DAMME, EJM 130 anos de Pesquisa em Lectina Vegetal. **Glycoconj J** 37, 533-551. 2020. <https://doi.org/10.1007/s10719-020-09942-y>.

TELES, Flavio et al. Brazilian red propolis attenuates hypertension and renal damage in 5/6 renal ablation model. **PLoS One**, v. 10, n. 1, p. e0116535, 2015.

THAKUR, Randhir PS et al. Apparatus for cyclical deposition of thin films. U.S. Patent n. 7,175,713, 13 fev. 2007.

VAN DAMME, EJM 35 years in plant lectin research: a journey from basic science to applications in agriculture and medicine. **Glycoconj J** 39, 83-97. 2022.

VANDENBORRE, Gianni; SMAGGHE, Guy; VAN DAMME, Els JM. Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects. **Phytochemistry**, v. 72, n. 13, p. 1538-1550, 2011.

VASCONCELOS, M. A. et al. Purification and primary structure of a novel mannosespecific lectin from *Centrolobium microchaete* Mart seeds. **International journal of biological macromolecules**, v. 81, p. 600-607, 2015.

VASCONCELOS, Mayron Alves de. Atividade das lectinas de *Canavalia brasiliensis* e *Canavalia ensiformis* sobre o crescimento “in vitro” de *Rhizobium tropici*. 2010.

VAZ, A. F. M. 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.

VIANA, Lucas Alecrim Amorim. Purificação, caracterização bioquímica e estrutura primária parcial de uma lectina da esponja marinha *Aplysina cauliformis*. 2021.

VIRGENS, I. O. et al. Revisão: *Jatropha curcas* L.: aspectos morfofisiológicos e químicos Review: *Jatropha curcas* L.: morphophysiological and chemical aspects. **Braz.J. Food Technol**, v. 20, p. e2016030, 2017.

WANG, Y., et al. Extraction, purification and physicochemical properties of a novel lectin from *Laetiporus sulphureus* mushroom. **LWT**, 2018.

WANG, Peipei et al. Functional component isolated from *Phaseolus vulgaris* lectin exerts in vitro and in vivo anti-tumor activity through potentiation of apoptosis and immunomodulation. **Molecules**, v. 26, n. 2, p. 498, 2021.

WARNER, Alden H. Proteases and protease inhibitors in *Artemia* and their role in the developmental process. In: **Biochemistry and Cell Biology of Artemia**. CRC Press, 2017. p. 113-132.

WENDEL, G. H, et al. Evaluation of the Antidiarrheal Activity of *Rhizophora mangle* L. (Rhizophoraceae). **Latin American Journal of Pharmacy**. v. 32, p.128-31. 2013.

WILLIAMS, L. A. D. et al. *Rhizophora mangle* (Rhizophoraceae) triterpenoids with insecticidal activity. **Naturwissenschaften**, v. 86, n. 9, p. 450-452, 1999.

WOLIN, Ingrid Alessandra Victoria et al. Ação antitumoral das lectinas DrfL I e ConBr via ativação de caspases e autofagia: potencial aplicação em estudos e terapia de gliomas. 2021.

WU, J. et al. Lunatin, a novel lectin with antifungal and antiproliferative bioactivities from *Phaseolus lunatus* billb. **International journal of biological macromolecules**, v. 89, p. 717-724, 2016.

YANG, Qing et al. Anti-metastatic activity of *Agrocybe aegerita* galectin (AAL) in a mouse model of breast cancer lung metastasis. **Journal of Functional Foods**, v. 41, p. 163-170, 2018.

YANG, Likui; MANITHODY, Chandrashekhara; REZAIE, Alireza R. Functional role of O-linked and N-linked glycosylation sites present on the activation peptide of factor X. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 7, n. 10, p. 1696-1702, 2009.

YASSIN, Abdelrahman Mohamed et al. Lectin from *Pisum fulvum* seeds as in vitro anticancer and apoptotic gene regulator. **Rev Chim-Bucharest**, v. 70, n. 4, p. 1490-5, 2019.

YAU, Tammy et al. Lectins with potential for anti-cancer therapy. **Molecules**, v. 20, n. 3, p. 3791-3810, 2015.

XIAO, Xiuqing et al. Purification and cloning of lectin that induce cell apoptosis from *Allium chinense*. **Phytomedicine**, v. 22, n. 2, p. 238-244, 2015.

XIMENES, Neila Caroline de Araújo. Caracterização e avaliação de atividades biológicas da lectina da Vagem de *Caesalpinia ferrea* (CfePL). 2009.

XIU, Y. et al. Isolation and characterization of two novel C-type lectins from the oriental river prawn, *Macrobrachium nipponense*. **Fish & shellfish immunology**, v. 46, n. 2, p. 603-611, 2015.

ZHANG, Zheyang et al. COL1A1 promotes metastasis in colorectal cancer by regulating the WNT/PCP pathway. **Molecular Medicine Reports**, v. 17, n. 4, p. 5037-5042, 2018.

ZHAO, J. K.; WANG, H. X.; NG, T. B. Purification and characterization of a novel lectin from the toxic wild mushroom *Inocybe umbrinella*. **Toxicon**, v. 53, n. 3, p. 360-366, 2009.

ZHAO, et al. Ping. Development of a rapid high-efficiency scalable process for acetylated *Sus scrofa* cationic trypsin production from *Escherichia coli* inclusion bodies. **Protein expression and purification**, v. 116, p. 120-126, 2015.

ZHONG, Shu-Rong et al. Caracterização e clonagem molecular da dabocetina, uma potente proteína antiplaquetária tipo lectina do veneno de *Daboia russellii siamensis*. **Toxicon**, v. 47, n. 1, pág. 104-112, 2006.

ANEXOS

ANEXO 1: ARTIGO SOBRE A PURIFICAÇÃO DA LECTINA GABL:

Purification and characterization of a lectin with refolding ability from *Genipa americana* bark

International Journal of Biological Macromolecules 119 (2018) 517–523



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ijbiomac>

Purification and characterization of a lectin with refolding ability from *Genipa americana* bark



Ricardo Bezerra Costa^a, Patricia Targon Campana^b, Felipe Santiago Chambergo^b, Thiago Henrique Napoleão^c, Patrícia Maria Guedes Paiva^c, Hugo Juarez Vieira Pereira^a, Maria Luiza Vilela Oliva^d, Francis Soares Gomes^{a,*}

^a Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, 57072-900 Maceió, Alagoas, Brazil

^b Escola de Artes, Ciências e Humanidades, Universidade de São Paulo, 03828-000 São Paulo, SP, Brazil

^c Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-420 Recife, Pernambuco, Brazil

^d Departamento de Bioquímica, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, 04044-020 São Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 May 2018

Received in revised form 24 July 2018

Accepted 28 July 2018

Available online 29 July 2018

Keywords:

Bark

Lectin

Structural stability

ABSTRACT

Genipa americana L., commonly known as genipap, is a plant with economical and medicinal importance, and a promising source of bioactive compounds. Lectins are carbohydrate-binding proteins with several biotechnological applications. This study reports the isolation and characterization of a *G. americana* bark lectin (GaBL). A single chromatographic procedure on Sephacryl S-100 resulted in isolation of GaBL, a protein with native molecular weight of over 200 kDa and pI 4.02, whose hemagglutinating activity was inhibited by lactose and fetuin, not affected by ions (Ca^{2+} and Mg^{2+}), and stable upon heating (303–393 K) as well as over the pH range 5–10. The highest activity was found at a temperature lower than 333 K and pH 5. The secondary structure was analyzed by circular dichroism and showed a prevalence of beta structures and unordered forms. GaBL was able to partially refold in acidic pH conditions when dissolved in PBS buffer at pH 7.4. In conclusion, GaBL was purified in milligram quantities with high stability against different conditions, and is a new biomaterial with potential biotechnological applications.

© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

ANEXO 2: PATENTE SOBRE A ATIVIDADE ANTICANCERÍGENA DA LECTINA GABL:

Identificação de uma nova lectina da casca de Genipa americana com potencial terapêutico contra células cancerígenas



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

Número do Processo: BR 10 2022 020978 2

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24464109000148

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av. Lourival Melo Mota, s/n, Tabuleiro do Martins

Cidade: Maceió

Estado: AL

CEP: 57072-970

País: Brasil

Telefone: 82-3214-1064

Fax: 82-3214-1035

Email: nit@propep.ufal.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): Identificação de uma nova lectina da casca de Genipa americana com potencial terapêutico contra células cancerígenas

Resumo: Lectinas são proteínas com alta especificidade a carboidratos e diversas atividades biológicas, como a ação antitumoral, por apresentarem elevada afinidade pelos carboidratos presentes nestas células. A lectina isolada das cascas de Genipa americana (GaBL) apresentou alta especificidade para lactose e fetuina. Esse resultado levou ao desenvolvimento dessa pesquisa que buscou avaliar sua atividade antitumoral frente as linhagens de câncer de pele (A431), melanoma (B16) e carcinoma espinocelular de língua (SCC9). Estas células foram tratadas com GaBL para avaliar a viabilidade celular, seguido de ensaios de migração e invasão celular, identificação de alterações de membrana celular e reação em cadeia da polimerase em tempo real para caspase-3 e expressão de mRNA de proteínas relacionadas à transição epitelial-mesênquimal (E-caderina, Col1A1). GaBL diminuiu a proliferação celular e reduziu a migração celular contra todas as cepas avaliadas e diminuiu significativamente a invasão de células SCC9. O processo de apoptose e transcrição da caspase-3 foi significativamente maior nas células B16 e SCC9 tratadas com lectina. GaBL induziu upregulation de E-caderina e supressão de Col1A1 em todas as cepas testadas. Tais resultados mostram que o efeito antitumoral do GaBL indica que esta biomolécula pode ter potencial para tratamento futuro do câncer.

Figura a publicar: 1

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 10

Nome: RICARDO BEZERRA COSTA

CPF: 34576467832

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Outras ocupações não especificadas anteriormente

Endereço: Rua C

Cidade: Coruripe

Estado: AL

CEP: 57230-000

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email: ricardobcosta10@gmail.com

ANEXO 2: PATENTE SOBRE A ATIVIDADE ANTICOAGULANTE DE LEITE (COLABORAÇÃO).

Obtenção de um novo agente coagulante de leite produzido pelo fungo *Pleurotus djamor* PLO13 através de fermentação em estado sólido.



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

Número do Processo: BR 10 2021 022819 9

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
 Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica
 CPF/CNPJ: 24464109000148
 Nacionalidade: Brasileira
 Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa
 Endereço: Av. Lourival Melo Mota, s/n, Tabuleiro do Martins
 Cidade: Maceió
 Estado: AL
 CEP: 57072-970
 País: Brasil
 Telefone: 82-3214-1064
 Fax: 82-3214-1035
 Email: nit@propep.ufal.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): Obtenção de um novo agente coagulante de leite produzido pelo fungo *Pleurotus djamor* PLO13 através de fermentação em estado sólido

Resumo: A presente patente de invenção foi desenvolvida para a obtenção de um novo coagulante de leite a partir de cultivo da espécie *Pleurotus djamor* O13 através de fermentação em estado sólido com farelo de trigo como substrato de crescimento residual. A metodologia de detecção da atividade coagulante foi realizada por meio da análise do tempo mínimo necessário para obter a total coagulação do leite bovino desnatado e, integralmente pasteurizado, utilizando o extrato enzimático. Os resultados demonstram que o extrato apresenta, ao menos, uma protease com elevada atividade coagulante frente as amostras de leites testadas. Também foi observado que este novo agente coagulante apresenta atividade ótima de 50 °C e, que se comporta como as demais enzimas, sendo visto que a hidrólise da caseína ocorreu diretamente proporcional ao tempo e foi inativada quando aquecida. Tais resultados mostram que estas proteases apresentam alto potencial de utilização na indústria de laticínios, principalmente no que se refere a produção de queijo.

Figura a publicar: 1

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 13

Nome: MONIZY DA COSTA SILVA
 CPF: 08479074493
 Nacionalidade: Brasileira
 Qualificação Física: Outras ocupações não especificadas anteriormente
 Endereço: Rua Hêlvio de Castro Reis
 Cidade: Coruripe
 Estado: AL
 CEP: 57230-000
 País: BRASIL
 Telefone: (82) 999 638938
 Fax:
 Email: monizy.silva@iqb.ufal.br

Inventor 4 de 13

Nome: RICARDO BEZERRA COSTA
 CPF: 34576467832
 Nacionalidade: Brasileira
 Qualificação Física: Outras ocupações não especificadas anteriormente
 Endereço: Rua C, Joaquim Beltrão
 Cidade: Coruripe
 Estado: AL
 CEP: 57230-000
 País: BRASIL
 Telefone: (82) 996 917400
 Fax:
 Email: ricardobcosta10@gmail.com