

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
CURSO DE LICENCIATURA EM QUÍMICA

KEILANE CRUZ FRANÇA

**IDENTIFICAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE UMA LECTINA DE FOLHAS DE *Jatropha*
multifida L.**

Maceió
2020

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, p. 1507-1513, 2010.

WILSON, K.; WALKER, J. **Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology**. 7. ed. New York: Cambridge University Press, 2010.

XU, J. et al. A Reliable and Efficient Method for Total RNA Isolation from Various Members of Spurge Family (Euphorbiaceae). **Phytochemical Analysis**, v. 21, n. 5, p. 395-398, 2010.

ZHANG, J-S. et al. Cytotoxic macrocyclic diterpenoids from *Jatropha multifida*. **Bioorganic Chemistry**, v. 80, p. 511-518, 2018.

KEILANE CRUZ FRANÇA

IDENTIFICAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE UMA LECTINA DE FOLHAS DE *Jatropha multifida* L.

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado ao Curso de Licenciatura em Química da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do título de Licenciada em Química.

Orientador: Prof. Dr. Francis Soares Gomes

Maceió
2020

KEILANE CRUZ FRANÇA

**IDENTIFICAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE UMA LECTINA DE FOLHAS DE *Jatropha*
multifida L.**

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC)
apresentado ao Curso de Licenciatura em
Química da Universidade Federal de Alagoas,
como requisito parcial para obtenção do título
de Licenciada em Química.

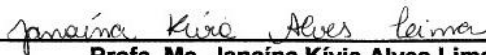
Banca Examinadora:



Prof. Dr. Francis Soares Gomes
Universidade Federal de Alagoas – IQB/UFAL (Orientador)



Profa. Dra. Sônia Salgueiro Machado
Universidade Federal de Alagoas – IQB/UFAL



Profa. Me. Janaina Kivia Alves Lima
Faculdade Regional da Bahia – UNIRB

*Aos meus pais, Etã Cruz e Marcos
França, por toda dedicação, amor e
ensinamentos a mim concedidos.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e pelo entendimento. Por conhecer e suprir todas as minhas necessidades. Pelo acesso à sua viva e eficaz Palavra que me mostra o caminho, me ergue e revela minha identidade em Cristo. Por todas as bênçãos e pelo seu amor incondicional e incalculável. Ele me deu honra e poder sobre toda a sua criação (Salmos 8), por isso me sinto incentivada à pesquisa científica. Glória, pois, a Ele!

Aos meus pais, Etã e Marcos, por todo amor, conselhos, apoio e incentivo durante minha trajetória.

Ao meu irmão, Yuri, por todos os momentos de descontração e risos em vários momentos.

Às minhas avós Terezinha e Maria das Graças, em memória, pela palavra de sabedoria.

Aos meus tios e primos que me ajudaram de diversas formas, além de comemorarem juntamente comigo as minhas vitórias.

Ao Prof. Dr. Francis Soares Gomes por ter me recebido, pela oportunidade de trabalhar com ele e por ter me conduzido a mais uma conquista tão almejada.

À mestranda Anyelly Gomes pela dedicação e por compartilhar seu conhecimento comigo.

A todos os colegas do Laboratório de Metabolismo e Proteômica (LAMP) pelos bons momentos e pela disposição em responder as dúvidas que por momentos surgem.

Aos professores e coordenadores do curso de Licenciatura em Química que contribuíram na minha formação profissional.

Ao órgão de fomento, CNPq, pela bolsa concedida.

Sou imensamente grata a cada um que contribuiu de forma direta ou indireta nesta etapa da minha vida. Que Deus possa recompensá-los com chuvas de bênçãos!

“Bem-aventurado o homem que acha
sabedoria, e o homem que adquire
conhecimento;
porque é melhor a sua mercadoria do
que artigos de prata, e maior o seu
lucro que o ouro mais fino.”

Provérbios 3.13-14

RESUMO

O interesse por plantas medicinais tem aumentado progressivamente, visto que seus constituintes podem proporcionar uma variedade de produtos de importância econômica. A espécie *Jatropha multifida* é uma planta pertencente à família Euphorbiaceae utilizada na medicina popular na cicatrização de feridas e úlceras, como purgativo e antipirético, para o tratamento de gonorreia, candidíase oral e infecções na pele e urinárias. Dentre as diversas biomoléculas que podem apresentar estas propriedades, destacam-se as lectinas por possuírem aplicações biotecnológicas como atividade antimicrobiana, imunomoduladora, mitogênica, inseticida, antitumoral e anti-inflamatória. As lectinas são proteínas que possuem pelo menos um domínio não-catalítico com capacidade de se ligar reversivelmente a carboidratos com alta especificidade, sendo encontradas desde microrganismos aos animais e vegetais. O presente trabalho teve como objetivo a identificação e purificação de uma lectina das folhas de *Jatropha multifida*. Para isso, o extrato das folhas (10%, m/v) foi preparado em três diferentes soluções: NaCl 0,15 M, Tris-HCl 50 mM pH 8,0 e fosfato de sódio 50 mM pH 7,2 por 16 h. A extração realizada com Tris-HCl 50 mM pH 8,0 apresentou maior atividade hemaglutinante (AH: 512) bem como o maior teor de proteínas (3,152 mg/mL). O extrato, então, foi submetido ao fracionamento salino com sulfato de amônio em diferentes concentrações (0-20%, 20-40%, 40-60% e 60-80%), sendo a fração F0-20% a que apresentou maior AH (2048). Os ensaios de hemaglutinação foram realizados com uma suspensão de eritrócitos de coelho 2,5% (v/v) em NaCl 0,15 M tratados com solução alsevier. Em seguida, a F0-20% foi cromatografada em coluna de quitina equilibrada com NaCl 0,15 M. As frações eluídas com ácido acético 0,5 M que demonstraram AH foram, então, reunidas e dialisadas contra água Milli-Q e duas vezes contra Tris-HCl 50 mM pH 8,0 por 6 h. A lectina demonstrou maior especificidade a glicose e maltose, mas também apresentou afinidade por N-acetilglicosamina, ribose e sacarose. Para verificar o grau de pureza da lectina, a amostra foi analisada por método eletroforético em gel de poliacrilamida a 10% sob condições desnaturantes, utilizando dodecilsulfato de sódio, e não redutoras, onde foi possível a visualização de uma banda proteica. Desta forma, foi identificada e purificada uma lectina das folhas de *J. multifida* por cromatografia em coluna de quitina, estimulando futuros estudos sobre a caracterização e o potencial biotecnológico da mesma.

Palavras-chave: Lectina; *Jatropha multifida*; purificação.

ABSTRACT

The interest in medicinal plants has increased progressively, since their constituents can provide a variety of products of economic importance. The species *Jatropha multifida* is a plant belonging to the family Euphorbiaceae used in folk medicine in the healing of wounds and ulcers, as a purgative and antipyretic, for the treatment of oral candidiasis, gonorrhoea, skin and urinary infections. Among the various biomolecules that can have these properties, lectins stand out for presenting biotechnological applications such as antimicrobial, immunomodulatory, mitogenic, insecticidal, antitumor and anti-inflammatory activity. Lectins are proteins that have at least one non-catalytic domain with the ability to bind reversibly to carbohydrates with high specificity, being found from microorganisms to animals and vegetables. This work aimed to identify and purify a lectin from the leaves of *Jatropha multifida*. For this, the leaf extract (10%, w/v) was prepared in three different solutions: 0.15 M NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.0 and 50 mM sodium phosphate pH 7.2 for 16 h. The extraction performed with 50 mM Tris-HCl pH 8.0 showed the highest hemagglutinating activity (HA: 512) as well as the highest protein content (3.152 mg/mL). The extract was then subjected to saline fractionation with ammonium sulfate in different concentrations (0-20%, 20-40%, 40-60% and 60-80%), with F0-20% being the only one that presented HA (2048). The hemagglutination assays were performed with a 2.5% (v/v) suspension of rabbit erythrocytes in 0.15 M NaCl treated with alevier solution. Then, the F0-20% was chromatographed on a chitin column equilibrated with 0.15 M NaCl. The fractions eluted with 0.5 M acetic acid that demonstrated HA were then collected and dialyzed against Milli-Q water and twice against 50 mM Tris-HCl pH 8.0 for 6 h. Lectin demonstrated greater specificity for glucose and maltose, but also showed affinity for N-acetylglycosamine, ribose and sucrose. To verify the purity of the lectin, the sample was analyzed by 10% polyacrylamide gel electrophoretic method under non-reducing and denaturing conditions, using sodium dodecyl sulfate, where it was possible to visualize a protein band. Thus, a lectin of *J. multifida* leaves was identified and purified by chitin column chromatography, stimulating future studies on its characterization and biotechnological potential.

Keywords: Lectin; *Jatropha multifida*; purification.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AH: Atividade Hemaglutinante

AHE: Atividade Hemaglutinante Específica

DRC: Domínio de Reconhecimento a Carboidrato

M: Molar

mA: Miliampère

mg: Miligramas

mL: Mililitros

mM: Milimolar

m/v: massa por volume

NI: Não Inibiu

nm: Nanômetros

pH: Potencial hidrogeniônico

SDS-PAGE: Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecilsulfato de Sódio

TEMED: Tetrametiletilenodiamina

µg: Microgramas

µL: Microlitros

v/v: volume por volume

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Espécie *Jatropha multifida*. (A) Aspecto geral; (B) folhas; (C) fruto e flores.15
- Figura 2.** Esquema ilustrativo da interação de lectina ao carboidrato através do Domínio de Reconhecimento a Carboidrato (DRC).17
- Figura 3.** Classificação estrutural de lectinas de plantas.18
- Figura 4.** A adesão de bactérias à membrana da célula hospedeira (1) pode ser impedida devido ao bloqueio da interação por uma lectina antibacteriana que reconhece e se liga aos carboidratos da superfície bacteriana (2).19
- Figura 5.** Hemaglutinação e teste de inibição da atividade hemaglutinante. (a) A presença de lectina é detectada pela formação de uma rede de hemaglutinação. (b) O teste de AH é executado em placas de microtitulação. (c) A inibição da AH é revelada quando a ligação específica da lectina a carboidrato desfaz a formação da rede. C – Controle, CC – Carboidrato Competidor, CME – Carboidrato da Membrana de Eritrócito, E – Eritrócito, L – Lectina.22
- Figura 6.** Cromatografia da F0-20% de folhas de *J. multifida* por coluna (7.5 x 1.5 cm) de quitina. Frações de 2,0 mL foram coletadas e avaliadas quanto à absorbância e AH.32
- Figura 7.** Eletroforese SDS-PAGE a 10% sem redutor da lectina de folhas de *J. multifida*. O pico proteico ativo advindo da cromatografia foi dialisado e aplicado no poço do gel e a banda proteica foi corada com nitrato de prata.33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Potencial biotecnológico de lectinas da família Euphorbiaceae.21

Tabela 2. Teor de proteínas, atividade hemaglutinante (AH) e atividade hemaglutinante específica (AHE) de extratos de folhas de *J. multifida* em diferentes soluções.29

Tabela 3. Concentração de proteínas e atividade hemaglutinante das frações oriundas do fracionamento salino do extrato de folhas de *J. multifida*.30

Tabela 4. Inibição da atividade hemaglutinante do extrato de folhas de *J. multifida* por glicoproteína e carboidratos.31

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	14
2.1. CONSIDERAÇÕES SOBRE A FAMÍLIA EUPHORBIACEAE E A ESPÉCIE <i>Jatropha multifida</i> Linn.....	14
2.1.1. Família Euphorbiaceae	14
2.1.2. Espécie <i>Jatropha multifida</i> Linn.	15
2.2. LECTINAS	16
2.3. FUNÇÕES BIOLÓGICAS E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE LECTINAS DE PLANTAS	19
2.4. DETECÇÃO E PURIFICAÇÃO DE LECTINAS	21
3. OBJETIVOS	25
3.1. Objetivo geral	25
3.2. Objetivos específicos.....	25
4. METODOLOGIA.....	26
4.1. Coleta do material vegetal	26
4.2. Extração e fracionamento de proteínas	26
4.3. Tratamento de eritrócitos	26
4.4. Teste de hemaglutinação.....	27
4.5. Especificidade a carboidratos.....	27
4.6. Quantificação de proteínas	27
4.7. Purificação da lectina das folhas de <i>Jatropha multifida</i>	28
4.8. Eletroforese em gel de poliácridamida	28
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5.1. Quantificação de proteínas e atividade hemaglutinante.....	29
5.2. Teste de inibição da AH	30
5.3. Purificação da lectina.....	32
6. CONCLUSÃO.....	34
REFERÊNCIAS.....	35

1. INTRODUÇÃO

A utilização de plantas com o intuito de prevenir, aliviar ou curar processos patológicos vem sendo descrita desde 1500 a.C. (BETTEGA et al., 2011), e suas propriedades também têm sido exploradas para o uso como combustível, roupas, abrigo e alimento. Nos últimos anos, o interesse pelas plantas medicinais tem aumentado progressivamente, pois seus constituintes podem proporcionar diversos produtos de importância econômica. As partes das plantas que podem apresentar compostos ativos a serem utilizados para fins terapêuticos variam de sementes, raízes, folhas, frutos, flores até mesmo a planta inteira (JAMSHIDI-KIA; LORIGOOINI; AMINI-KHOEI, 2018).

O Brasil abrange 55 mil espécies catalogadas de um total de 350 a 550 mil espécies de plantas, sendo o país com a maior diversidade genética vegetal do mundo. Os produtos naturais biologicamente ativos existentes nas plantas apresentam diversas propriedades, incluindo ações sinérgicas, que podem ser utilizadas para a síntese de medicamentos como também para impedir o desenvolvimento de certas doenças. Diante disto, a toxicidade e os efeitos colaterais de medicamentos de origem sintética tornam o uso de plantas medicinais cada vez mais atrativo e confiável ao público. Assim, os materiais vegetais são testados para a observação de alguma atividade, que se houver, o extrato é submetido a etapas de fracionamento, isolamento, identificação e testes biológicos para a determinação do (s) princípio (s) ativo (s) responsáveis (GUERRA & NODARI, 2007; JAMSHIDI-KIA; LORIGOOINI; AMINI-KHOEI, 2018).

A espécie *Jatropha multifida* L. é conhecida pelos nomes vulgares de flor-de-coral, coral, coral-dos-jardins, flor-de-sangue e pertence à família Euphorbiaceae. É cultivada no sul da China, na África e na América do Sul, sendo encontrada também no estado de Alagoas, região Nordeste do Brasil, onde é comumente chamada de Merthiolate (RAMPADARATH; PUCHOOA; RANGHOO-SANMUKHIYA, 2014a; ZHANG et al., 2018). Na medicina popular, raízes, caules, folhas, sementes e látex são utilizados com a finalidade de acelerar o processo de cicatrização de feridas e úlceras, como purgativo e antipirético, no tratamento de lesões, candidíase oral, gonorreia, infecções na pele e urinárias (FALODUN et al., 2014).

Dentre as macromoléculas biofuncionais destacam-se as lectinas, que são proteínas que se ligam a carboidratos seletiva e reversivelmente e estão presentes desde os microrganismos até os animais e vegetais. Nas últimas décadas, lectinas têm recebido notoriedade no âmbito biotecnológico em função de suas potenciais propriedades biológicas, incluindo atividades antitumoral, anti-inflamatória, imunomoduladora, inseticida, antifúngica, antibacteriana, antiviral e mitogênicas (PROCÓPIO et al., 2017).

Avaliando o interesse crescente pela lectina como uma importante ferramenta em pesquisas biológicas e médicas e que os estudos existentes centrados nos constituintes da espécie *Jatropha multifida* ainda são escassos, o presente trabalho tem como objetivo identificar e purificar uma lectina das folhas de *Jatropha multifida*, possibilitando estudos futuros para aplicações biotecnológicas.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. CONSIDERAÇÕES SOBRE A FAMÍLIA EUPHORBIACEAE E A ESPÉCIE *Jatropha multifida* Linn.

2.1.1. Família Euphorbiaceae

Euphorbiaceae é uma das famílias de maior potencial econômico do grupo das Angiospermas e agrupa 317 gêneros, incluindo 8000 espécies distribuídas especialmente nas regiões tropicais e temperadas (SÁTIRO & ROQUE, 2008). No Brasil, esta família compreende 1100 espécies em 72 gêneros que são encontrados nos diversos tipos de vegetação (LUCENA & ALVES, 2010). Possui elevada diversidade morfológica, englobando árvores, arbustos, ervas ou lianas, sendo caracterizada pela presença de flores unissexuais, frutos, látex e geralmente folhas alternas (TRINDADE & LAMEIRA, 2014; HURBATH; TORRES; ROQUE, 2016).

Desde a antiguidade, na história das civilizações orientais e ocidentais, a utilização de espécies das Euforbiáceas era relatada para fins medicinais (TRINDADE & LAMEIRA, 2014). Entre a extensa variedade de espécies, a mandioca (*Manihot esculenta*) pode ser citada como referência de alto valor nutricional, muito consumida nas regiões tropicais (FERREIRA et al., 2009); a seringueira (*Hevea brasiliensis*) é empregada na indústria para a produção de borracha; e as sementes de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) são úteis como matéria-prima dos biodiesel. Algumas espécies são importantes fontes de óleo ou cera, como a *Ricinus communis* da qual é extraído o óleo de mamona que é aproveitado na iluminação, em pomadas corporais, além de viabilizar o crescimento capilar (XU et al., 2010).

O gênero *Jatropha*, um dos principais da família Euphorbiaceae, tem seu nome oriundo da palavra grega “*jatros*” que significa “médico” e “*trophe*”, “comida”, abrangendo 170 espécies que podem ser ervas, arbustos ou árvores (RAMPADARATH; PUCHOOA; RANGHOO-SANMUKHIYA, 2014b). Extratos e compostos puros destas plantas são descritos em relação à toxicidade e às atividades antimicrobiana, antiprotozoária, anticoagulante e anti-inflamatória. As pesquisas relacionadas aos seus constituintes proporcionaram o isolamento de alcaloides, peptídeos cíclicos, terpenos, flavonóides, compostos fenólicos, ácidos graxos, entre

outros compostos, demonstrando elevado potencial das espécies como fontes de medicamentos (SABANDAR et al., 2013).

2.1.2. Espécie *Jatropha multifida* Linn.

A *Jatropha multifida* L., conhecida popularmente como flor-de-coral, coral, coral-dos-jardins, flor-de-sangue ou merthiolate, é um arbusto com até 2 m de altura, suas folhas estão divididas em segmentos longos, medindo de 10 a 20 cm de largura, apresenta flores pequenas agrupadas em cachos com a coloração vermelho-brilhante, enquanto que os frutos são verdes a amarelos (Figura 1). Ademais, possui seiva leitosa ou incolor que, em contato com a pele, é capaz de provocar dermatite (QUEENSLAND GOVERNMENT, acesso em 2019).

Figura 1. Espécie *Jatropha multifida*. (A) Aspecto geral; (B) folhas; (C) fruto e flores.



A

B



C

Na medicina popular, é utilizada com a finalidade de acelerar o processo de cicatrização, como purgativo e antipirético, no tratamento de lesões, gonorreia, candidíase oral, infecções urinárias como também de pele, e a seiva incolor é empregada para tratar úlceras gastrointestinais (AIYELAAGBE, 2000; BUCH; ARANTES; CAMPELO, 2008; SABANDAR et al., 2013). Na África Ocidental, o látex é aplicado para curar aftas em línguas de bebês, tratar infecções e o óleo de semente é útil como lubrificante, na fabricação de sabão caseiro e de velas (AIYELAAGBE et al., 2008).

Estudos comprovaram que a espécie *Jatropha multifida* possui atividades antibacteriana (SABANDAR et al., 2013; AIYELAAGBE, 2000), antifúngica (HAMZA et al., 2006), larvicida e biopesticida (RAMPADARATH; PUCHOOA; RANGHOO-SANMUKHIYA, 2014a,b). Além disso, devido à sua atividade antimicrobiana, o extrato da planta pode ser explorado no tratamento de infecções sexualmente transmissíveis (AIYELAAGBE, 2008).

Dentre os compostos vegetais que podem apresentar atividades biológicas, destacam-se as proteínas e metabólitos secundários tais como compostos de nitrogênio (alcalóides, aminoácidos não-proteicos, aminas, alcanidas, glicosídeos cianogênicos e glicosinolatos) e compostos não nitrogenados (monoterpenos, diterpenos, triterpenos, tetraterpenos, sesquiterpenos, saponinas, flavonóides, esteróides, cumarinas). Dentre o grupo de proteínas, lectinas vêm sendo identificadas como princípio ativo de diversas propriedades descritas na medicina popular (PAIVA et al., 2012).

2.2. LECTINAS

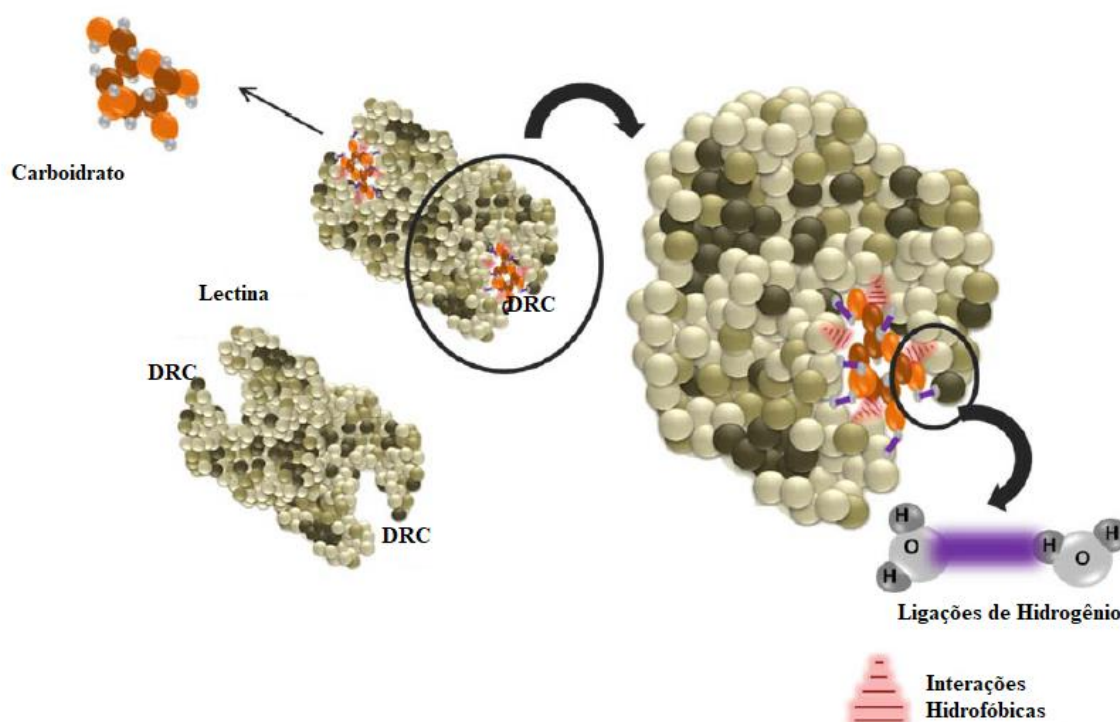
As lectinas são proteínas que contêm pelo menos um domínio não-catalítico capaz de se ligar a carboidratos com alta especificidade de maneira reversível, por meio de ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e de Van der Waals (PEUMANS & VAN DAMME, 1995; COELHO et al., 2017).

A região na lectina em que ocorre estas interações é denominada Domínio de Reconhecimento a Carboidrato (DRC) (Figura 2), pelo qual as lectinas podem aglutinar células, como os eritrócitos, quando interagem com carboidratos da

superfície celular. Ademais, esta classe de proteínas é de origem não imunológica, pois não são produtos de uma resposta imune, o que faz desta natureza uma característica que difere de anticorpos anticarbohidratos os quais também possuem a habilidade de promover aglutinação das células (GOMES, 2013; DIAS et al., 2015).

A primeira descrição de uma proteína capaz de aglutinar eritrócitos foi apresentada por Peter Hermann Stillmark no ano de 1888 em sua tese de doutorado. Stillmark isolou esta proteína altamente tóxica, nomeada de ricina, a partir das sementes de *Ricinus communis* (mamona). Em 1936, Sumner e Howell relataram em seu trabalho a especificidade por açúcares de uma proteína denominada concanavalina A, por meio da observação da inibição da sua atividade hemaglutinante pela sacarose. Somente em 1954, Boyd e Shapleigh propuseram o termo lectina, do latim “*legere*” que significa “escolher”, para o grupo de proteínas vegetais capaz de distinguir eritrócitos de diferentes tipos sanguíneos. O termo, então, foi generalizado para todas as proteínas que se ligam a carboidratos com elevada especificidade (SHARON & LIS, 2004).

Figura 2. Esquema ilustrativo da interação de lectina ao carboidrato através do Domínio de Reconhecimento a Carboidrato (DRC).

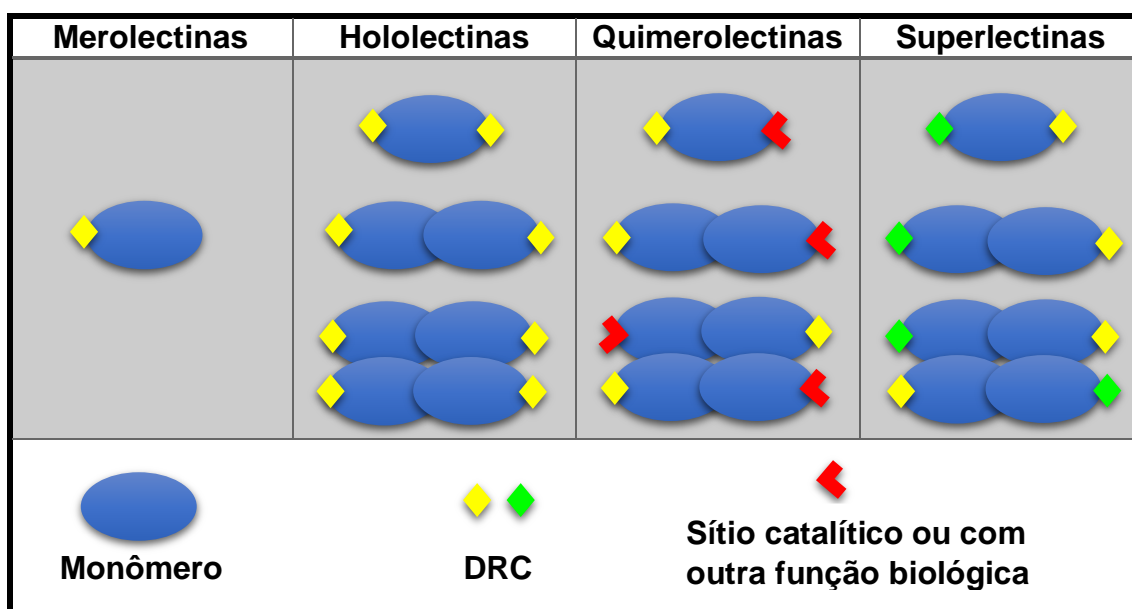


Fonte: Adaptado de Lino et al., 2013.

Em relação à estrutura molecular, as lectinas são diferentes entre si quanto à composição aminoacídica, massa molecular, estrutura tridimensional e dependência de metais a fim de se tornarem ativas para cumprir sua função biológica (VAN DAMME et al., 1998). De acordo com Peumans & Van Damme (1998), as lectinas de plantas são classificadas, quanto à sua estrutura geral, como merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas.

As merolectinas contêm exclusivamente um único domínio de ligação a carboidratos, por isso são impossibilitadas de precipitar glicoconjugados ou aglutinar células devido ao seu caráter monovalente. Enquanto as hololectinas possuem dois ou mais domínios de ligação semelhantes ou idênticos, sendo assim, di ou polivalentes com habilidade, portanto, de aglutinar células e precipitar glicoconjugados. As quimerolectinas consistem de um domínio de ligação a carboidrato e um domínio não-relacionado que apresenta função catalítica ou outra atividade biológica, atuando de forma independente do domínio de ligação a carboidratos. O grupo de lectinas compostas por pelo menos dois domínios de ligação distintos capazes de interagir com açúcares diferentes corresponde às superlectinas (Figura 3).

Figura 3. Classificação estrutural de lectinas de plantas.



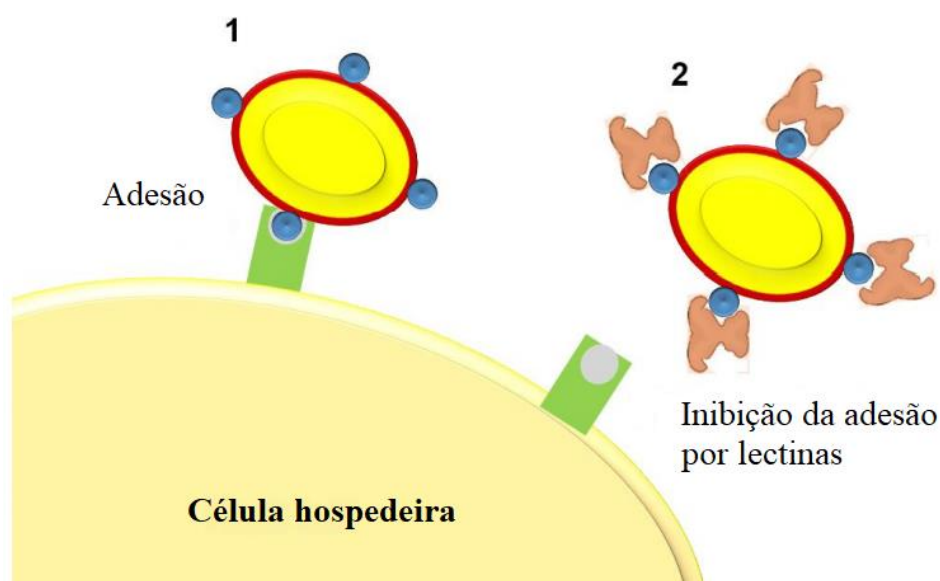
Fonte: Adaptado de Peumans & Van Damme, 1998.

2.3. FUNÇÕES BIOLÓGICAS E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE LECTINAS DE PLANTAS

Lectinas são amplamente distribuídas na natureza e têm sido isoladas de vírus, fungos, bactérias, invertebrados, organismos unicelulares, animais e plantas (DIAS et al., 2015). Devido à alta especificidade que as lectinas apresentam a carboidratos, estas proteínas agem como moléculas de reconhecimento no interior de uma célula, entre as células ou entre os organismos (CHRISPEELS & RAIKHEL, 1991).

Em plantas, lectinas estão presentes principalmente em cascas e sementes, mas também em bulbo, grão, raiz, folha, fruto, haste e flor (CORREIA; COELHO; PAIVA, 2008). Elas atuam no desenvolvimento e sinalização celular, participam do mecanismo de defesa contra o ataque de microrganismos, insetos e animais predadores, além de inibirem o crescimento de vários fungos fitopatogênicos e não patogênicos (SHARON & LIS, 2004; DIAS et al., 2015). Além disso, lectinas podem interferir no processo de aderência e invasão de uma bactéria na célula ao reconhecer carboidratos na superfície bacteriana, bloqueando os locais de interação do microrganismo com a célula hospedeira (Figura 4) (PROCÓPIO et al., 2017).

Figura 4. A adesão de bactérias à membrana da célula hospedeira (1) pode ser impedida devido ao bloqueio da interação por uma lectina antibacteriana que reconhece e se liga aos carboidratos da superfície bacteriana (2).



Fonte: Adaptado de Procópio et al., 2017.

As funções das lectinas de outras fontes incluem contribuição no processo de endocitose e transporte intracelular, como também são capazes de induzir apoptose

em células tumorais, bloquear infecção de microrganismos, controlar os níveis de proteínas no sangue e atuar no sistema imunológico ao reconhecer carboidratos exclusivos de patógenos (DIAS et al., 2015).

As lectinas possuem a habilidade de reconhecer carboidratos em células, seções de tecido, fluidos biológicos e, devido à sua alta especificidade, têm sido utilizadas como importantes ferramentas em biotecnologia no agronegócio, bem como em áreas de saúde humana e animal. Entre as diversas atividades das lectinas, alguns exemplos de aplicações são como agentes antitumorais, anti-inflamatórios, anti-helmínticos, antimicrobianos, biossensores de doenças e inseticidas (CARVALHO et al., 2015; DIAS et al., 2015; COELHO et al., 2017).

Aplicações biotecnológicas também têm sido demonstradas em extratos e frações contendo lectina. O extrato salino da raiz de *Borreria verticillata* comprovou ser fonte de lectinas e apresentou atividade antibacteriana contra espécies de *Pectobacterium* (SILVA et al., 2018). O extrato salino das folhas, a fração 20-40% com a lectina parcialmente purificada com sulfato de amônio, bem como a lectina isolada exibiram atividades termiticida, bactericida e fungicida (SILVA et al., 2015). Ademais, estudo somente com o extrato salino demonstrou atividade larvicida contra *Aedes aegypti* (SILVA & SÁ, 2015).

O extrato salino e a lectina de folhas de *Schinus terebinthifolius* apresentaram efeito antitumoral (RAMOS et al., 2019). O extrato aquoso e a fração rica em lectina das sementes de *Moringa oleifera* foram capazes de atrasar o ciclo de desenvolvimento de *Aedes aegypti*, induzir a morte de larvas, como também comprometer a fertilidade e fecundidade das fêmeas (SILVA et al., 2019b). O extrato bruto em solução tampão de bicarbonato de amônio e a lectina isolada do látex de *Euphorbia tirucalli* comprovaram atividades antitumoral, antimicrobiana e antiparasitária (PALHARINI et al., 2017). Propriedades inseticidas também têm sido encontradas no extrato salino das folhas de *Schinus terebinthifolius*, e a lectina isolada afetou na conversão dos alimentos em biomassa nos insetos (CAMAROTI et al., 2018).

Lima et al. (2010) avaliaram a lectina de sementes de *Cratylia mollis* e constataram duas isoformas que podem auxiliar no diagnóstico de câncer de próstata. O efeito antitumoral foi observado na lectina purificada do exudato de frutos de

Praecitrullus fistulosus contra células de câncer de cólon (MADHU et al., 2019), e propriedades anti-inflamatórias e antinociceptivas foram notórias no estudo da lectina das folhas de *Bauhinia monandra* (CAMPOS et al., 2016).

Algumas lectinas são capazes de atuar como agente de controle de pragas. Caccia et al. (2012) comprovaram o potencial inseticida da lectina do bulbo de *Hypeastrum hybrid* (Amaryllis) contra as larvas do verme do algodão. A lectina de sementes de *Chenopodium quinoa* apresentou atividade antimicrobiana (POMPEU et al., 2015), enquanto que a de *Canavalia brasiliensis* foi capaz de inibir o desenvolvimento do parasita responsável por infectar pequenos ruminantes (BATISTA et al., 2018). A tabela 1 demonstra estudos relacionados ao potencial biotecnológico das lectinas oriundas das espécies da família Euphorbiaceae.

Tabela 1. Potencial biotecnológico de lectinas da família Euphorbiaceae.

Parte da planta	Espécie	Potencial biotecnológico	Referências
Látex	<i>Synadenium carinatum</i>	Antiparasitário	AFONSO-CARDOSO et al., 2011
		Tratamento de doenças alérgicas	ROGÉRIO et al., 2007
Látex	<i>Euphorbia antiquorum</i> L.	Antibacteriano	SIRITAPETAWEET et al., 2018
Casca	<i>Sebastiania jacobinensis</i>	Antifúngico	VAZ et al., 2010
Sementes	<i>Tetracarpidium conophorum</i>	Antinociceptivo Anti-inflamatório	OLADOKUN et al., 2019

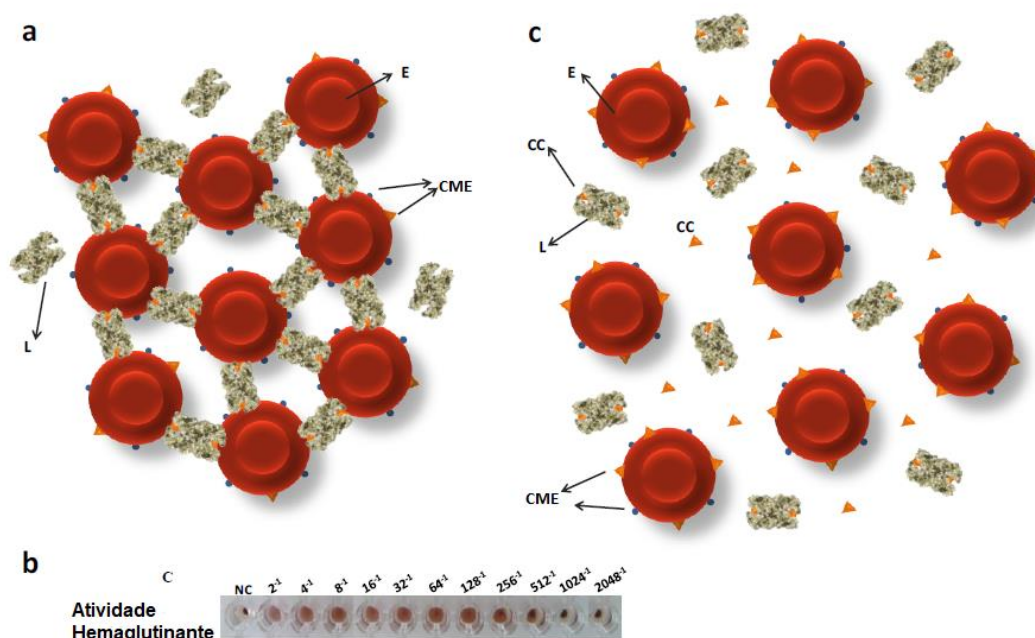
2.4. DETECÇÃO E PURIFICAÇÃO DE LECTINAS

A presença de lectinas pode ser detectada por meio do teste da atividade hemaglutinante (AH), que consiste na realização de uma diluição em série da amostra, seguida da adição de eritrócitos humanos ou de animais em placa de microtitulação. As lectinas, que possuem dois ou mais domínios (di ou polivalentes), se ligam aos carboidratos da superfície celular, formando uma rede entre os eritrócitos (Figura 5a e 5b). Assim, a atividade hemaglutinante corresponde ao inverso da última diluição em que ainda apresenta hemaglutinação e a atividade hemaglutinante específica

(AHE), à razão entre a AH e a concentração de proteína (mg/mL) (CORREIA & COELHO, 1995; SHARON & LIS, 2001).

O efeito aglutinante não é suficiente para comprovar a presença da lectina, devido à possibilidade da existência de alguns compostos como taninos, lipídios ou íons bivalentes na amostra, os quais também possuem a habilidade de aglutinar células. A confirmação que o agente aglutinante é uma lectina é feita através do teste de inibição da AH, em que são utilizadas soluções de carboidratos livres que interagem com os domínios de ligação das lectinas, impossibilitando a interação com os carboidratos da superfície dos eritrócitos (Figura 5c). Por conseguinte, a formação da reticulação das células é impedida e os eritrócitos precipitam. O teste revela os carboidratos específicos da lectina definidos como aqueles que inibiram mais efetivamente a atividade hemaglutinante (SILVA, 2015).

Figura 5. Hemaglutinação e teste de inibição da atividade hemaglutinante. (a) A presença de lectina é detectada pela formação de uma rede de hemaglutinação. (b) O teste de AH é executado em placas de microtitulação. (c) A inibição da AH é revelada quando a ligação específica da lectina a carboidrato desfaz a formação da rede. C – Controle, CC – Carboidrato Competidor, CME – Carboidrato da Membrana de Eritrócito, E – Eritrócito, L – Lectina.



Fonte: Adaptado de Procópio et al., 2017.

As moléculas de lectina podem não ser detectadas como consequência do impedimento estérico na interação lectina-carboidrato, o que torna necessário submeter os eritrócitos ao tratamento enzimático (tripsina, papaína ou

neuraminidase), com a finalidade de facilitar a aglutinação, provocando o aumento da sensibilidade das células à lectina (KENNEDY et al., 1995; PAIVA et al., 2010). Para a preservação dos eritrócitos, é empregado um tratamento químico utilizando solução de glutaraldeído (BING et al., 1967) ou uma solução de alsevier como anticoagulante (DENIS et al., 2017).

O primeiro passo para a purificação da lectina é a preparação do extrato em solução aquosa, salina ou tampão (PAIVA et al., 2010). O extrato é submetido ao processo de fracionamento salino que se baseia na adição de um sal que possibilita a precipitação seletiva de algumas proteínas, enquanto outras permanecem em solução (NELSON & COX, 2014, p. 90). O sulfato de amônio é comumente utilizado por ser altamente hidrofílico, capaz de retirar a camada de solvatação das proteínas, fazendo com que elas precipitem e, posteriormente, sejam separadas (SILVA, 2015). Este processo permite purificar parcialmente as lectinas e proporciona a estabilização da atividade hemaglutinante, mesmo após o armazenamento em longos períodos (KENNEDY et al., 1995).

O isolamento da lectina presente em uma mistura de proteínas pode ser realizado por métodos cromatográficos conforme a especificidade a carboidratos (cromatografia de afinidade), carga (cromatografia de troca iônica) ou tamanho (cromatografia de exclusão molecular) da molécula (PAIVA et al., 2011). A cromatografia de afinidade é a mais utilizada e vantajosa para purificação de lectina, pois a biomolécula se liga a suportes polissacarídicos de forma reversível, com alta especificidade e recuperação, sem modificar a estrutura dos compostos com os quais interage (KENNEDY et al., 1995).

As frações obtidas contendo a lectina parcialmente purificada são submetidas ao processo de diálise em membranas semipermeáveis, para separar proteínas de solutos pequenos, empregando como fator determinante o tamanho das biomoléculas. A membrana, quando suspensa em uma solução tamponada, permite a livre passagem de carboidratos, sais – inclusive o sulfato de amônio adicionado no fracionamento salino – e da solução tampão, mas não de proteínas grandes, estas permanecem retidas no interior da bolsa membranosa (NELSON & COX, 2014, p. 90).

A pureza da lectina pode ser avaliada através da eletroforese em gel de poliacrilamida, que funciona como peneira molecular, com dodecilsulfato de sódio

(SDS-PAGE). O SDS é um detergente aniônico que possui a finalidade de desnaturar as proteínas, convertendo-as em uma estrutura linear, e de torná-las carregadas negativamente. Assim, a presença do SDS permite a separação destas biomoléculas considerando quase que exclusivamente a massa molecular, enquanto que a sua ausência proporcionaria a migração das proteínas com base também no diferencial de carga e formato. Adicionalmente, pode ser empregado um agente redutor, como o 2-mercaptoetanol, para romper as ligações dissulfeto responsáveis por manter a estrutura tridimensional da proteína (NELSON & COX, 2014, p. 93-94; ROCHA et al., 2005; WILSON & WALKER, 2010, p. 407).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Identificar e purificar uma lectina de folhas de *Jatropha multifida* Linn.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar métodos de extração da lectina de folhas de *J. multifida*;
- Detectar a presença de lectina nos extratos e realizar fracionamento protéico;
- Determinar a especificidade da lectina a carboidratos;
- Purificar uma lectina através de método cromatográfico;
- Avaliar o grau de pureza da preparação lectínica obtida na cromatografia por eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE).

4. METODOLOGIA

4.1. Coleta do material vegetal

As folhas da planta *Jatropha multifida* foram coletadas e secas no Centro de Ciências Agrárias – CECA/UFAL, localizado no município de Rio Largo, Alagoas, região Nordeste do Brasil. O material foi triturado em um liquidificador e peneirado para a obtenção de um pó fino, o qual foi armazenado em frasco fechado para ser utilizado, posteriormente, na extração proteica.

4.2. Extração e fracionamento de proteínas

Na proporção de 1:10 (m/v), 2 g do pó foram pesados e os extratos foram preparados em três soluções diferentes: salina com NaCl 0,15 M; tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0; e tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,2, sob agitação suave por 16 h circundado por gelo. Após a filtração das misturas, os precipitados foram descartados e os filtrados, utilizados para avaliar a concentração de proteínas e a presença de atividade hemaglutinante. O sobrenadante, denominado extrato bruto, que proporcionou maior dosagem proteica foi submetido a um fracionamento realizado com sulfato de amônio 0-20%, 20-40%, 40-60% e 60-80% de saturação. Após 1 h na geladeira, a solução resultante foi centrifugada por 15 min, 15000 × g a 4 °C e o precipitado, separado do sobrenadante.

4.3. Tratamento de eritrócitos

O sangue de coelho foi tratado com solução alsevier (2,05 g de glicose, 1,20 g de citrato de sódio, 0,42 g de cloreto de sódio, 0,055 g de ácido cítrico em 100 mL de água destilada) e centrifugado a 15000 × g, 4 °C por 15 min. O sobrenadante foi retirado e o precipitado, suspenso em NaCl 0,15 M, sendo esse procedimento repetido três vezes. A coleta de eritrócitos foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação com animais (processo 23076.033782/2015-70).

4.4. Teste de hemaglutinação

O ensaio de atividade hemaglutinante foi realizado em placa de microtitulação de acordo com Paiva e Coelho (1992). Os poços foram preenchidos com 50 μL de solução NaCl 0,15 M e, posteriormente, 50 μL do extrato bruto foi acrescentado, homogeneizado e diluído serialmente. Isto significa que, partindo de um volume total de 100 μL , 50 μL foi transferido para o próximo poço até o último com o intuito de reduzir a sua concentração pela metade. Em seguida, 50 μL de uma suspensão de 2,5% (v/v) de eritrócitos de coelho em NaCl 0,15 M foi adicionado em cada poço e mantida em repouso durante 45 min a temperatura ambiente. O mesmo procedimento foi realizado com as frações provenientes do fracionamento salino e com as frações oriundas da cromatografia. A atividade hemaglutinante foi calculada considerando o inverso da última diluição que ainda apresentou hemaglutinação.

4.5. Especificidade a carboidratos

O teste de inibição da atividade hemaglutinante foi realizado como descrito por Napoleão et al. (2011), utilizando soluções de 0,1 M dos seguintes carboidratos e glicoproteína: fetuína, frutose, galactose, glicose, lactose, maltose, N-acetilglicosamina, ribose e sacarose. Foram adicionados em todos os poços da placa de microtitulação 50 μL da solução de carboidrato ou glicoproteína em NaCl 0,15 M. Em seguida, foi acrescentada uma alíquota de 50 μL do extrato bruto no primeiro poço, diluindo serialmente até o último e submetida à incubação durante o período de 15 min. Uma suspensão de 50 μL de 2,5% (v/v) de eritrócitos de coelho, então, foi adicionada e incubada por 45 min a temperatura ambiente.

4.6. Quantificação de proteínas

A concentração de proteínas (mg/mL) foi determinada através do método de Bradford (1976) utilizando a curva-padrão de albumina de soro bovino. Neste procedimento, foram utilizados 1 μL de amostra, 9 μL de tampão (Tris-HCl 50 mM pH 8,0) e 190 μL de reagente de Bradford, resultando em uma amostra de 200 μL medida a absorbância a 595 nm em uma placa de microtitulação.

4.7. Purificação da lectina das folhas de *Jatropha multifida*

Para a purificação da lectina, foi empregado o método cromatográfico em matriz de quitina, um polissacarídeo de β -(1,4)-N-acetil-D-glicosamina, equilibrada previamente com 100 mL de solução de NaCl 0,15 M. Em seguida, 600 μ L da F0-20% foram aplicados na coluna, seguida dos solventes Tris-HCl 50 mM pH 8,0, Tris-HCl 50 mM pH 8,0 + NaCl 0,5 M, ácido acético 0,5 M e ácido acético 1,0 M. Durante o processo, foram coletadas alíquotas de 2,0 mL em 65 tubos falcon e, posteriormente, em espectrofotômetro, foi realizada a leitura de absorbância a 280 nm para cada tubo. As frações que apresentaram o maior pico proteico com atividade hemaglutinante foram reunidas e submetidas ao processo de diálise contra água Milli-Q por 2 h e duas vezes contra Tris-HCl 50 mM pH 8,0 durante 2 h em agitador magnético, totalizando 6 h.

4.8. Eletroforese em gel de poliacrilamida

A pureza da lectina foi avaliada segundo Laemmli (1970), através do método eletroforético com gel de poliacrilamida (PAGE) na concentração de 10% (m/v) contendo dodecilsulfato de sódio (SDS), em condição não redutora, sob corrente de 90 mA. O gel foi constituído por gel inferior e gel superior preparados com os mesmos constituintes, alterando apenas a quantidade de cada, os valores são apresentados respectivamente: água destilada (1396 e 1400 μ L), Tris-HCl 2,0 M pH 8,8 (937,5 e 1000 μ L), SDS a 1% (500 e 400 μ L), acrilamida a 30% (1667 e 800 μ L), persulfato de amônio (250 e 200 μ L) e TEMED (250 e 200 μ L), sendo estes dois últimos catalisadores. O gel superior (gel de empilhamento) foi preparado para assegurar que todas as proteínas chegassem ao gel inferior (gel de separação) simultaneamente, com o intuito de que a migração das proteínas com o mesmo peso molecular ocorresse como bandas estreitas. A amostra proveniente da diálise foi aplicada no poço do gel e a banda proteica foi corada com nitrato de prata. A duração da corrida foi determinada pela chegada do azul de bromofenol, contido no tampão de amostra, ao final do gel, pois o corante é capaz de migrar facilmente, por ser uma molécula pequena, apontando a localização da frente da eletroforese.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Quantificação de proteínas e atividade hemaglutinante

O extrato das folhas de *J. multifida* foi obtido em três diferentes soluções e analisado quanto à dosagem proteica e atividade hemaglutinante para a escolha do solvente que proporcione mais eficiência na extração de lectina. Assim, foi notório o maior teor de proteínas quando a extração foi realizada com solvente Tris-HCl 50 mM pH 8,0, onde também foi evidenciada a maior atividade hemaglutinante e atividade hemaglutinante específica (Tabela 2). Costa et al. (2018) e Martínez-Alarcón et al. (2019) também utilizaram este tampão para extração de lectinas vegetais oriundas de *Genipa americana* e *Phaseolus acutifolius*, respectivamente, ambas com potencial biotecnológico.

Tabela 2. Teor de proteínas, atividade hemaglutinante (AH) e atividade hemaglutinante específica (AHE) de extratos de folhas de *J. multifida* em diferentes soluções.

Solução para extração proteica	Concentração de proteínas (mg/mL)	AH	AHE
NaCl 0,15 M	2,012	-	-
Tris HCl 50 mM pH 8,0	3,152	512	162,44
Fosfato de sódio 50 mM pH 7,2	2,780	256	92,09

AH foi definida como o inverso da menor concentração capaz de produzir a rede de hemaglutinação de eritrócitos de coelho. AHE foi calculada como a razão entre AH e a concentração proteica (mg/mL).

Fonte: Autora, 2019.

Utilizando 2 g de material vegetal, foi preparado 20 mL de extrato em Tris-HCl 50 mM pH 8,0, de onde foi extraído 63,04 mg de proteínas. Para realizar o fracionamento proteico com intuito de purificação da lectina, ciclos do fracionamento salino (0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80%) foram realizados com o extrato resultante. O processo de hemaglutinação em cada amostra foi analisado visualmente, comparando-se com seus respectivos controles negativos, os quais continham apenas a suspensão (2,5%, v/v) de eritrócitos e a solução salina NaCl 0,15 M.

A fração que apresentou maior dosagem proteica correspondeu a F40-60%, expressando 4,362 mg/mL. Contudo, a fração F0-20% foi a única que apresentou atividade hemaglutinante (2048) com concentração de proteína igual a 3,677 mg/mL, indicando que nas demais frações as proteínas precipitadas não tinham natureza lectínica (Tabela 3). Utilizando o volume da alíquota de 50 µL da F0-20%, pode-se afirmar que 0,1838 mg foram utilizados para o teste de AH em placa de microtitulação. Assim, considerando a diluição, foi possível observar que a quantidade mínima para promover a hemaglutinação de 50 µL da suspensão de eritrócitos foi de 0,0897 µg de proteínas, sugerindo que lectinas podem estar presentes na amostra. O fracionamento salino é uma técnica bastante empregada no isolamento de proteínas, pois permite que haja a remoção de contaminantes presentes no extrato, resultando em uma fração mais rica em lectina, fato observado através da elevação do valor de AHE (162,44 no extrato para 556,98 na F0-20%). O procedimento também resulta em melhor resolução na etapa seguinte, a de cromatografia.

Tabela 3. Concentração de proteínas e atividade hemaglutinante das frações oriundas do fracionamento salino do extrato de folhas de *J. multifida*.

Amostras	Concentração de proteínas (mg/mL)	AH	AHE
Extrato bruto	3,152	512	162,44
F0-20%	3,677	2048	556,98
FS20%	0,714	-	-
F20-40%	3,668	-	-
FS40%	0,631	-	-
F40-60%	4,362	-	-
FS60%	0,260	-	-
F60-80%	0,521	-	-
FS80%	0,082	-	-

Fonte: Autora, 2019.

5.2. Teste de inibição da AH

O ensaio de atividade hemaglutinante não é conclusivo para confirmar a presença de lectinas, devido à possibilidade de outros compostos como taninos,

lipídios ou íons bivalentes poderem dispersar eritrócitos através de ligações não específicas, resultando em um falso positivo de AH. Por isso, foi realizado o teste de inibição da AH, onde os carboidratos livres em solução interagem com os domínios de ligação da lectina, dependendo da sua especificidade, impedindo sua interação com os glicoconjugados presentes na membrana dos eritrócitos. Este ensaio determina também o grau de especificidade da lectina a carboidratos, sendo o carboidrato mais específico aquele que resultou na maior inibição da hemaglutinação (PAIVA et al., 2013).

Desta forma, foi demonstrado que tanto os monossacarídeos N-acetilglicosamina, ribose e glicose, quanto os dissacarídeos sacarose e maltose foram capazes de inibir a hemaglutinação. Dentre estes cinco carboidratos, a lectina em estudo evidenciou maior afinidade a glicose e maltose, por terem apresentado maior inibição da atividade hemaglutinante (Tabela 4).

Tabela 4. Inibição da atividade hemaglutinante do extrato de folhas de *J. multifida* por glicoproteína e carboidratos.

Ligante	AH
Controle negativo	512
Fetuína	NI
Frutose	NI
Galactose	NI
Glicose	2
Lactose	NI
Maltose	2
N-acetilglicosamina	8
Ribose	4
Sacarose	8

NI: Não Inibiu

Fonte: Autora, 2019.

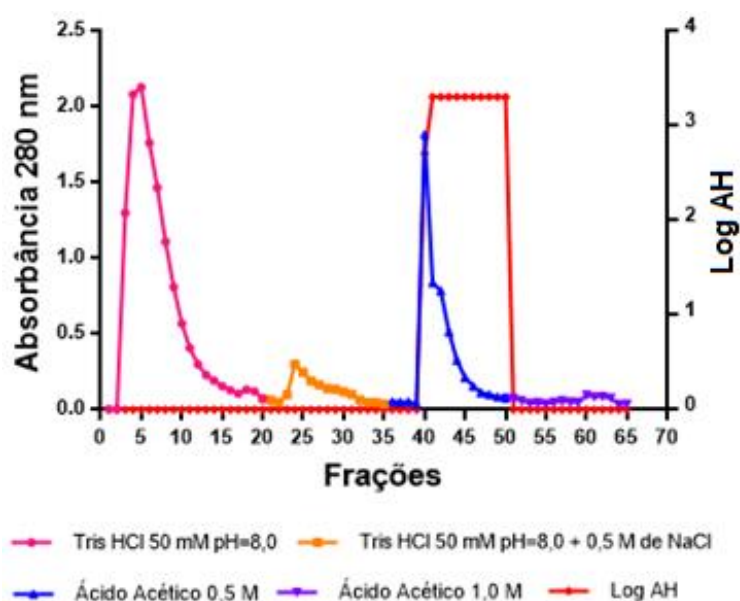
Na literatura, a sacarose foi citada como o carboidrato capaz de inibir a atividade hemaglutinante promovida pela concanavalina A, oriunda da espécie *Canavalia ensiformis*, sendo o primeiro relato da especificidade de uma lectina a carboidratos (SHARON & LIS, 2004). Souza et al. (2011) descreveram a redução da atividade hemaglutinante da lectina das raízes de *Bauhinia monandra* devido à

presença da sacarose. Acerca do gênero *Jatropha*, uma lectina com especificidade a glicose também foi relatada para a espécie de *Jatropha curcas* (AL-SAMAN et al., 2015). Além disso, uma lectina de rizomas de *Calystegia sepium* também teve sua atividade hemaglutinante inibida por maltose (PEUMANS et al., 1997).

5.3. Purificação da lectina

A F0-20% foi submetida à cromatografia em coluna de quitina. A coluna de quitina é utilizada tanto para cromatografia por afinidade a lectinas ligadoras de N-acetilglicosamina como também pode ser empregada como cromatografia de troca iônica, uma vez que os grupos amino das cadeias de quitina em pH <6,0 capturam íons H⁺ da solução e exibem carga superficial positiva (ROY et al., 2017). No início da eluição com Tris-HCl 50 mM pH 8,0, foi evidente um pico com maior absorbância a 280 nm, porém sem AH, indicando que houve eluição de compostos não lectínicos e que a lectina provavelmente teria sido adsorvida na matriz cromatográfica (GOMES et al, 2012). Ao alterar o eluente adicionando Tris-HCl 50 mM pH 8,0 contendo NaCl 0,5 M, um segundo pico também foi observado, este com menor absorbância, entre as frações 24 e 25, porém sem atividade hemaglutinante.

Figura 6. Cromatografia da F0-20% de folhas de *J. multifida* por coluna (7.5 x 1.5 cm) de quitina. Frações de 2,0 mL foram coletadas e avaliadas quanto à absorbância e AH.



Fonte: Autora, 2019.

A lectina adsorvada na coluna foi recuperada com a eluição com ácido acético 0,5 M, revelando sua estabilidade estrutural com baixo valor de pH (SÁ et al., 2009). O pico proteico ativo mostrou elevada atividade hemaglutinante, de 512 na fração 40 e de 2048, nas frações de 41 a 50, assegurando que a quitina foi capaz de interagir e reter seletivamente a lectina (Figura 6).

Algumas lectinas de origem vegetal já foram isoladas por cromatografia utilizando matriz de quitina, a exemplo da lectina extraída das folhas de *Schinus terebinthifolius* com atividade antimicrobiana (GOMES et al., 2012), como também a lectina das sementes de *Apuleia leiocarpa* revelando potencial antibacteriano (CARVALHO et al., 2015), além da lectina das raízes de *Portulaca elatior* que apresentou propriedades bactericida e fungicida contra patógenos humanos (SILVA et al, 2019a).

As frações obtidas no método cromatográfico que apresentaram atividade hemaglutinante foram reunidas e dialisadas contra água Milli-Q por 2 h e duas vezes contra Tris HCl 50 mM pH 8,0 durante 4 h. Posteriormente, a solução resultante foi submetida à eletroforese com a finalidade de avaliar o grau de pureza da amostra e confirmar se a metodologia de purificação utilizada foi eficiente. Dessa forma, o isolamento da lectina foi comprovado devido à aparição de uma única banda em condições desnaturantes e não redutoras (Figura 7).

Figura 7. Eletroforese SDS-PAGE a 10% sem redutor da lectina de folhas de *J. multifida*. O pico proteico ativo advindo da cromatografia foi dialisado e aplicado no poço do gel e a banda proteica foi corada com nitrato de prata.



6. CONCLUSÃO

- Foi detectada a presença de lectina em folhas de *J. multifida*, extraída em maior quantidade em solução de Tris-HCl 50 mM pH 8,0;
- O fracionamento salino mostrou-se eficaz em concentrar a lectina em uma fração, a F0-20%, que demonstrou maior atividade hemaglutinante;
- A lectina em estudo possui maior especificidade por glicose e maltose, mas também por N-acetilglicosamina, ribose e sacarose;
- A cromatografia em matriz de quitina permitiu purificar a lectina que, após diálise, apresentou-se como uma banda proteica na eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% sob condições desnaturantes sem redutor;
- As perspectivas de estudo para esta lectina incluem avaliar sua estabilidade térmica, efeito de íons e pH na atividade hemaglutinante, como também sua possível aplicação biológica.

REFERÊNCIAS

AFONSO-CARDOSO, S. R. et al. Effect of the *Synadenium carinatum* latex lectin (ScLL) on *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection in murine macrophages. **Experimental Parasitology**, v. 128, p. 61-67, 2011.

AIYELAAGBE, O. O. Antibacterial activity of *Jatropha multifida* roots. **Fitoterapia**, v. 72, p. 544-546, 2000.

AIYELAAGBE, O. O. et al. The Antimicrobial Activity of *Jatropha multifida* Extracts and Chromatographic Fractions Against Sexually Transmitted Infections. **Journal of Medical Sciences**, v. 8, n. 2, p. 143-147, 2008.

AL-SAMAN, M. A. et al. Bioactivity of lectin from Egyptian *Jatropha curcas* seeds and its potentiality as antifungal agent. **Global Advanced Research Journals**, v. 4, n. 7, p. 087-097, 2015.

BATISTA, K. L. R. et al. Structural analysis and anthelmintic activity of *Canavalia brasiliensis* lectin reveal molecular correlation between the carbohydrate recognition domain and glycans of *Haemonchus contortus*. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 225, p. 67-72, 2018.

BETTEGA, P. V. C. et al. Fitoterapia: dos canteiros ao balcão da farmácia. **Archives of Oral Research**, v. 7, n. 1, p. 89-97, 2011.

BING, D. H.; WEYAND, J. G. M.; STAVITSKY, A. B. Hemagglutination with Aldehyde-Fixed Erythrocytes for Assay of Antigens and Antibodies. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** v. 124, n. 4, p. 1166-1170, 1967.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BUCH, D. R.; ARANTES, A. B.; CAMPELO, P. M. S. Verificação da atividade cicatrizante do exudato de folhas de *Jatropha multifida* L. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 89, n. 2, p. 142-145, 2008.

CACCIA, S. et al. Mechanism of entomotoxicity of the plant from *Hippeastrum* hybrid (*Amaryllis*) in *Spodoptera littoralis* larvae. **Journal of Insect Physiology**, v. 58, p. 1177-1183, 2012.

CAMAROTI, J. R. S. L. et al. *Sitophilus zeamais* adults have survival and nutrition affected by *Schinus terebinthifolius* leaf extract and its lectin (SteLL). **Industrial Crops & Products**, v. 116, p. 81-89, 2018.

CAMPOS, J. K. L. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Bauhinia monandra* leaf lectin. **Biochimie Open**, v. 2, p. 62-68, 2016.

CARVALHO, A. de S. et al. Purification, characterization and antibacterial potential of a lectin isolated from *Apuleia leiocarpa* seeds. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 75, p. 402-408, 2015.

CHRISPEELS, M. J.; RAIKHEL, N. V. Lectins, lectin genes, and their role in plant defense. **Plant Cell**, v. 3, n.1, p. 1-9, 1991.

COELHO, L. C. B. B. et al. Lectins, Interconnecting Proteins with Biotechnological/ Pharmacological and Therapeutic Applications. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, 22 p., 2017.

CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B. Purification of a Glucose/Mannose Specific Lectin, Isoform 1, from Seeds of *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu Bean). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 55, p. 261-273, 1995.

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

COSTA, R. B. et al. Purification and characterization of a lectin with refolding ability from *Genipa americana* bark. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 119, p. 517-523, 2018.

DENIS, M. et al. Activation of phenoloxidase activity by humoral lectin in hemocytes of freshwater crab *Paratelphusa jacquemontii*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 97, p. 258-263, 2017.

DIAS, R. de O. et al. Insights into Animal and Plant Lectins with Antimicrobial Activities. **Molecules**, v. 20, n. 1, p. 519-541, 2015.

FALODUN, A. et al. Isolation of antileishmanial, antimalarial and antimicrobial metabolites from *Jatropha multifida*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 4, n. 5, p. 374-378, 2014.

FERREIRA, A. L. et al. Produção e valor nutritivo da parte aérea da mandioca, maniçoba e pornunça. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 10, n. 1, p. 129-136, 2009.

GOMES, F. S. et al. Antimicrobial lectin from *Schinus terebinthifolius* leaf. **Journal of Applied Microbiology**, v. 114, p. 672-679, 2012.

GOMES, F. S. **Purificação e caracterização de lectinas e inibidor de tripsina presentes em tecidos de *Myracrodruon urundeuva* e *Schinus terebinthifolius*: ação antimicrobiana de preparações**. Tese (Doutorado em Bioquímica e Fisiologia). Centro de Ciências Biológicas. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2013.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Biodiversidade: Aspectos Biológicos, Geográficos, Legais e Éticos. In: SIMÕES et al., **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007. p. 13-20.

HAMZA, O. J. M. et al. Antifungal activity of some Tanzanian plants used traditionally for the treatment of fungal infections. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 108, p. 124-132, 2006.

HURBATH, F.; TORRES, D. S. C.; ROQUE, N. Euphorbiaceae na Serra Geral de Licínio de Almeida, Bahia, Brasil. **Rodriguésia**, v. 67, n. 2, p. 489-531, 2016.

JAMSHIDI-KIA, F.; LORIGOOINI, Z.; AMINI-KHOEI, H. Medicinal plants: Past history and future perspective. **Journal of Herbmed Pharmacology**, v. 7, n. 1, p. 1-7, 2018.

KENNEDY, J. F. et al. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 26, p. 219-230, 1995.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LIMA, A. L. R. de. et al. Histochemical Evaluation of Human Prostatic Tissues with *Cratylia mollis* Seed Lectin. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, p. 1-6, 2010.

LINO, M. A. da S. et al. Fish lectins: a brief review. In: JENKINS, O. P. (ed.), **Advances in Zoology Research**, v. 5. New York: Nova Science Publishers, Inc., p. 95-114, 2013.

LUCENA, M. de F. de A.; ALVES, M. Notas taxonômicas para Euphorbiaceae s.l do Nordeste do Brasil. **Hoehnea**, v. 37, n. 1, p. 71-85, 2010.

MADHU, C. S. et al. Antitumor effects of chitin specific lectin from *Praecitrullus fistulosus* by targeting angiogenesis and apoptosis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 518, p. 381-387, 2019.

MARTÍNEZ-ALARCÓN, D. et al. Rhizosecretion of a cisgenic lectin by genetic manipulation of Terapy bean plants (*Phaseolus acutifolius*). **Journal of Biotechnology: X**, v. 3, 8 p., 2019.

NAPOLEÃO, T. H. et al. Termiticidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* against *Nasutitermes corniger* and its mechanisms. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, p. 52-59, 2011.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014, 1220 p.

OLADOKUN, B. O. et al. Anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of *Tetracarpidium conophorum* seed lectin. **Scientific African**, v. 3, e00073, 2019.

PALHARINI, J. G. et al. Eutirucallin: A Lectin with Antitumor and Antimicrobial Properties. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, p. 1-13, 2017.

PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. B. B. Purification and Partial Characterization of Two Lectin Isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu Bean). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 36, p. 113-118, 1992.

PAIVA, P. M. G. et al. Antimicrobial activity of secondary metabolites and lectins from plants. In: MENDEZ-VILAS, A. (ed.). **Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**, p. 396-406, 2010.

PAIVA, P. M. G. et al. Plant compounds with *Aedes aegypti* larvicidal activity and other biological properties. In: LIONG, M.-T. (ed.), **Bioprocess Sciences and Technology**. New York: Nova Science Publishers, Inc., p. 269-294, 2011.

PAIVA, P. M. G. et al. Insecticide activity of lectins and secondary metabolites. In: **Insecticides-advances in integrated pest management**. IntechOpen, 2012.

PAIVA, P. M. G. et al. Lectins and Trypsin Inhibitors from Plants: Biochemical Characteristics and Adverse Effects on Insect Larvae. 1. ed. New York: Nova Science Publishers, Inc., 2013, v. 1, 52p.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Lectins as Plant Defense Proteins. **Plant Physiology**, v. 109, n. 2, p. 347-352, 1995.

PEUMANS, W. J. et al. Isolation of a novel plant lectin with an unusual specificity from *Calystegia sepium*. **Glycoconjugate Journal**, v. 14, p. 259-265, 1997.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Plant Lectins: Versatile Proteins with Important Perspectives in Biotechnology. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 15, p. 199-228, 1998.

POMPEU, D. G. et al. Purification, partial characterization and antimicrobial activity of Lectin from *Chenopodium quinoa* seeds. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 35, n. 4, p. 696-703, 2015.

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

QUEENSLAND GOVERNMENT. Coral plant (*Jatropha multifida*). Disponível em: <https://www.childrens.health.qld.gov.au/poisonous-plant-coral-plant-jatropha-multifida/>. Acesso em: 21 nov. 2019.

RAMOS, D. de B. M. et al. Evaluation of antitumor activity and toxicity of *Schinus terebinthifolia* leaf extract and lectin (SteLL) in sarcoma 180-bearing mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 233, p. 148-157, 2019.

RAMPADARATH, S.; PUCHOOA, D.; RANGHOO-SANMUKHIYA, V. M. Antimicrobial, phytochemical and larvicidal properties of *Jatropha multifida* Linn. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 7, n. 1, p. S380-S383, 2014a.

RAMPADARATH, S.; PUCHOOA, D.; RANGHOO-SANMUKHIYA, V. M. A comparison of polyphenolic content, antioxidant activity and insecticidal properties of *Jatropha* species and wild *Ricinus communis* L. found in Mauritius. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 7, n. 1, p. 384-390, 2014b.

ROCHA, T. L. et al. **Eletroforese bidimensional e análise de proteomas**. Comunicado Técnico 136. Brasília: Embrapa, 2005.

ROGÉRIO, A. P. et al. Anti-asthmatic potential of a D-galactose-binding lectin from *Synadenium carinatum* latex. **Glycobiology**, v. 17, n. 8, p. 795-804, 2007.

ROY, Jagadish C. et al. Solubility of Chitin: Solvents, Solution Behaviors and Their Related Mechanisms. *Solubility of Polysaccharides*; Xu, Z., Ed.; InTech: Vienna, Austria, 2017, 109-127.

SÁ, R. A. et al. Larvicidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* on *Aedes aegypti*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, v. 149, p. 300-306, 2009.

SABANDAR, C. W. et al. Medicinal property, phytochemistry and pharmacology of several *Jatropha* species (Euphorbiaceae): A review. **Phytochemistry**, v. 85, p. 7-29, 2013.

SÁTIRO, L. N.; ROQUE, N. A família Euphorbiaceae nas caatingas arenosas do médio rio São Francisco, BA, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 22, n. 1, p. 99-118, 2008.

SHARON, N.; LIS, H. The structural basis for carbohydrate recognition by lectins. In: **The Molecular Immunology of Complex Carbohydrates**, v. 2, p. 1-16, 2001.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v. 14, n. 11, p. 53-62, 2004.

SILVA, C. D. et al. **Larvicidal effect against *Aedes aegypti* of a *Borreria verticillata* leaves extract with lectin activity**. In: 23^o Congress of the International Union for

Biochemistry and Molecular Biology & 44° Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology, Resumo, Foz do Iguaçu, 2015.

SILVA, C. D. da; SÁ, R. A. **Lectinas de *Borreria verticillata*: avaliação de atividade inseticida contra gorgulho de milho *Sitophilus zeamais* e sobre cupins *Nasutitermes corniger* (Termitidae)**. In: XXIII CONIC, VII CONITI e IV ENIC, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, 2015.

SILVA, P. M. **Caracterização estrutural e avaliação da atividade antimicrobiana da lectina da testa de *Punica granatum* L.** Dissertação de mestrado. Bioquímica e Fisiologia. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2015.

SILVA, J. N. de O. et al. **Avaliação da presença de lectina e atividade antimicrobiana em extrato de raiz de *Borreria verticillata***. In: 1° Curso de Inverno em Biociências. Anais. Recife: Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – PPGCB/UFPE, p. 79-83, 2018.

SILVA, J. D. F. da. et al. *Portulaca elatior* root contains a trehalose-binding lectin with antibacterial and antifungal activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 126, p. 291-297, 2019a.

SILVA, L. L. de S. et al. Exposure of mosquito (*Aedes aegypti*) larvae to the water extract and lectin-rich fraction of *Moringa oleifera* seeds impairs their development and future fecundity. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 183, 109583, 2019b.

SIRITAPETAWE, J. et al. Isolation and characterization of a galactose-specific lectin (EantH) with antimicrobial activity from *Euphorbia antiquorum* L. latex. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 1846-1854.

SOUZA, J. D. et al. A new *Bauhinia monandra* galactose-specific lectin purified in milligram quantities from secondary roots with antifungal and termiticidal activities. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, p. 696-702, 2011.

TRINDADE, M. J. de S.; LAMEIRA, O. A. Espécies úteis da família Euphorbiaceae no Brasil. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 19, n. 1, p. 292-309, 2014.

VAN DAMME, E. J. M. et al. Plant Lectins: A Composite of Several Distinct Families of Structurally and Evolutionary Related Proteins with Diverse Biological Roles. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 17, n. 6, p. 575-692, 1998.