



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

ANYELLY GOMES SANTOS

IDENTIFICAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA LECTINA DE  
FOLHAS DE *Jatropha multifida* L. (MALPIGHIALES: EUPHORBIACEAE)

MACEIÓ

2020

ANYELLY GOMES SANTOS

IDENTIFICAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA LECTINA DE  
FOLHAS DE *Jatropha multifida* L. (MALPIGHIALES: EUPHORBIACEAE)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Química e Biotecnologia – IQB da Universidade Federal de Alagoas, como um dos requisitos para a obtenção do título de mestra em Química e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Francis Soares Gomes

MACEIÓ

2020

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**

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

S237i Santos, Anyelly Gomes.

Identificação, purificação e caracterização de uma lectina de folhas de *Jatropha multifida* L. (MALPIGHIALES: EUPHORBIACEAE) / Anyelly Gomes Santos. – 2020.

70 f. : il color.

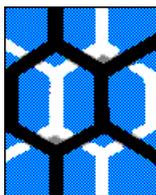
Orientador: Francis Soares Gomes.

Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia. Maceió, 2020.

Bibliografia: f. 55-70.

1. Merthiolate. 2. Plantas medicinais. 3. Hemaglutinação. 4. Proteínas. 5. Lectina. I. Título.

CDU: 582.5/9:615



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



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

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Defesa de dissertação da mestranda intitulada: “*IDENTIFICAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA LECTINA DE FOLHAS DE *Jatropha multifida* L. (MALPIGHIALES: EUPHORBIACEAE)*”, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas no dia 4 de dezembro de 2020, às 14h, por meio de videoconferência.

### Comissão Examinadora:

Dr. JOSÉ MARIA RODRIGUES DA LUZ, UFAL

Examinador(a) Externo(a) ao Programa

Dr. HUGO JUAREZ VIEIRA PEREIRA, UFAL

Examinador(a) Interno(a)

Dr. FRANCIS SOARES GOMES, UFAL

Presidente

*Anyelly Gomes Santos*  
ANYELLY GOMES SANTOS

Mestranda

Dedico este trabalho às minhas avós maternas Maria José Gomes Soares (in memoriam) e Deusdete dos Santos, pelo amor, criação e por todo ensinamento.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pela vida a mim concedida e a força para vencer os obstáculos até chegar aqui. Pois posso dizer que “Até aqui me ajudou o Senhor” (1 Samuel 7:12).

À melhor mãe do mundo Adriana Fracelino Gomes Santos e ao meu pai Esaquiel dos Santos por todo amor incondicional, dedicação e apoio.

À minha irmã Deisiele Gomes Santos e ao meu irmão Esley Gomes Santos, por toda cumplicidade, paciência e pelos melhores momentos juntos.

Ao meu noivo, João Pedro de Castro Silva, pelo companheirismo, incentivo, paciência e por todo amor e carinho dedicado a mim.

À minha avó, Deusdete dos Santos, por todo amor a mim dedicado.

Às minhas tias, Rosane, Rosilene e Eneilza e aos meus primos Mathews, Kamily, Davi e Sara, pela força e incentivo.

Aos pais do meu noivo, Vírgina de Castro e Flávio Ricardo, por todo apoio e carinho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Francis Soares Gomes, por todo ensinamento, atenção disponibilizada e orientação. Um exemplo para mim de ser humano e profissionalismo, tenho muita admiração.

Aos professores parceiros do Laboratório de Metabolômica e Proteômica, professora Edma Miranda e Hugo Juarez, pela convivência amigável e pelos ensinamentos.

À minha parceira de laboratório, Andrea Carla de Almeida Barros, por ter me acolhido desde o primeiro momento e ser presente ao longo dessa jornada percorrida. Sei que sempre posso contar com você.

À minha amiga, Stella Freitas de Queiroz, pela amizade, disponibilidade em ajudar e parceria de sempre.

À minha amiga, Camila Pereira de Lima Chicuta, por ter me apresentado ao laboratório e ter me dado todo o suporte no início da pesquisa.

Ao Cledson, Tati e Cláudio por sempre tirarem minhas dúvidas. Vocês são incríveis, sou muito fã.

Aos amigos de laboratório, Alexsandra, Roberta, Fabiana, Dávida, Monizy e Ricardo, pelos momentos de descontração e por aliviarem a tensão dos dias mais difíceis.

Às minhas amigas do “Clubinho”, Késia Filadélfia, Cléo Cardoso e Suane Letícia, pela amizade sincera, por todo apoio, pelas palavras reconfortantes e principalmente pelas orações para meu gel dar certo.

À Universidade Federal de Alagoas, ao Instituto de Química e Biotecnologia e ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia, pela oportunidade de realização do mestrado.

Aos laboratórios GCAR, LINQA e LBM, por estarem sempre de portas abertas.

Ao CNPq, pelo suporte financeiro.

E a todos que de forma direta e indireta contribuíram para a realização deste trabalho e minha formação acadêmica.

## RESUMO

*Jatropha multifida*, conhecida popularmente pelos nomes de merthiolate, flor-de-coral, coral, coral-dos-jardins, flor-de-sangue, é uma planta cultivada na América do Sul, no sul da China e na África, sendo também encontrada em Alagoas. Diversos tecidos da planta são utilizados na medicina popular como cicatrizante, para o tratamento da candidíase oral, gonorreia, febre, artrite, feridas e infecções. Metabólitos secundários e primários podem estar relacionados às propriedades medicinais dessa planta. Através de cromatografia em camada delgada foi observado a presença de alcalóides, flavonóides, taninos esteróides e fenóis nos extratos brutos em metanol e acetato de etila. Dentre os metabólitos primários, lectinas são proteínas capazes de se ligar a carboidratos e exercerem diversas atividades biológicas tais como antimicrobiana, inseticida, antitumoral e imunomoduladora. O presente estudo teve como objetivo a identificação, o isolamento e a caracterização de uma lectina extraída das folhas secas de *J. multifida*. Proteínas foram extraídas do pó das folhas através de homogeneização (16 h, 4 °C) em quatro diferentes soluções: NaCl 0,15 M e nos tampões Tris-HCl 50 mM pH 8,0, fosfato de sódio 50 mM pH 7,2 e o acetato de sódio pH 5,0. A extração realizada com Tris - HCl 50 mM pH 8,0 apresentou maior atividade hemaglutinante específica (AHE: 162,44) bem como extraiu uma quantidade maior de proteínas (3,15 mg/mL). O extrato obtido foi tratado com sulfato de amônio em diferentes concentrações (0-20%, 20-40%, 40-60% e 60-80%) para fracionamento protéico e a fração 0-20% foi a única que apresentou AHE (556,98). A fração 0-20% foi submetida à cromatografia em coluna de quitina equilibrada com Tris-HCl 50 mM pH 8,0. Frações de 2 mL foram coletadas e avaliadas quanto a absorbância a 280 nm e AH. O pico protéico ativo obtido com o eluente ácido acético 0,5 M foi reunido e dialisado contra Tris HCl 50 mM pH 8,0 por 6 horas. Para verificar o grau de pureza da lectina e determinar a massa molecular aparente, a amostra foi analisada por método eletroforético em gel de poliacrilamida a 10% sob condições desnaturantes, utilizando dodecilsulfato de sódio, e na presença e ausência de agente redutor, onde foi possível a visualização de uma banda protéica de massa molecular aparente de 56 kDa em condição não-redutora e redutora. Portanto, uma lectina de folhas de *J. multifida* (JamuLL) foi isolada através de um único passo cromatográfico em quantidades miligramas (2,5 mg; AHE: 10.240). A dosagem de proteínas e de fenóis foi feita em todas as etapas da purificação, mostrando que o procedimento de purificação removeu fenóis encontrados no extrato e fração. A caracterização da lectina mostrou que ela possui atividade hemaglutinante parcialmente inibida por caseína, mas que não é afetada por íons divalentes ( $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ ) nem pela presença de EDTA. JamuLL é classificada como uma lectina termoestável, pois se manteve ativa entre as temperaturas de 30 °C a 100 °C durante 60 minutos, bem como entre a faixa de pH 5,0 a 8,0, apresentando melhor atividade nos valores de pH ácidos. Neste trabalho foi possível isolar uma lectina de uma planta medicinal com possível potencial biotecnológico.

**Palavras-chaves:** Merthiolate, planta medicinal, hemaglutinação, proteína, lectina.

## ABSTRACT

*Jatropha multifida*, popularly known by the names merthiolate, coral flower, coral, garden coral, blood flower, is a plant grown in South America, southern China and Africa, and is also found in Alagoas. Various tissues of the plant are used in folk medicine as a healing agent for the treatment of oral candidiasis, gonorrhoea, fever, arthritis, wounds and infections. Secondary and primary metabolites may be related to the medicinal properties of this plant. Through thin layer chromatography, the presence of alkaloids, flavonoids, steroid tannins and phenols was observed in the crude extracts in methanol and ethyl acetate. Among the primary metabolites, lectins are proteins capable of binding to carbohydrates and exerting various biological activities such as antimicrobial, insecticide, antitumor and immunomodulatory. The present study aimed to identify, isolate and characterize a lectin extracted from the dry leaves of *J. multifida*. Proteins were extracted from the leaf powder through homogenization (16 h, 4 °C) in four different solutions: NaCl 0.15 M and in Tris-HCl 50 mM pH 8.0, sodium phosphate 50 mM pH 7.2 and the sodium acetate pH 5.0. The extraction performed with Tris-HCl 50 mM pH 8.0 showed a higher specific haemagglutinating activity (AHE: 162.44) as well as extracting a larger amount of proteins (3.15 mg / mL). The obtained extract was treated with ammonium sulfate in different concentrations (0-20%, 20-40%, 40-60% and 60-80%) for protein fractionation and the fraction 0-20% was the only one that presented AHE ( 556.98). The 0-20% fraction was subjected to chitin column chromatography balanced with 50 mM Tris - HCl pH 8.0. 2 mL fractions were collected and evaluated for absorbance at 280 nm and HA. The active protein peak obtained with the eluent 0.5 M acetic acid was collected and dialyzed against 50 mM Tris HCl pH 8.0 for 6 hours. To check the purity of the lectin and determine the apparent molecular mass, the sample was analyzed by electrophoretic method on 10% polyacrylamide gel under denaturing conditions, using sodium dodecyl sulfate, and in the presence and absence of reducing agent, where it was possible the visualization of a protein band of apparent molecular mass of 56 kDa in a non-reducing and reducing condition. Therefore, a *J. multifida* leaf lectin (JamuLL) was isolated using a single chromatographic step in milligram quantities (2.5 mg; AHE: 10.240). The measurement of proteins and phenols was carried out at all stages of the purification, showing that the purification procedure removed phenols found in the extract and fraction. The characterization of lectin showed that it has hemagglutinating activity partially inhibited by casein, but that it is not affected by divalent ions (Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>) or by the presence of EDTA. JamuLL is classified as a thermostable lectin, as it remained active between temperatures of 30 ° C to 100 ° C for 60 minutes, as well as between the pH range 5.0 to 8.0, showing better activity at acidic pH values . In this work it was possible to isolate a lectin from a medicinal plant with possible biotechnological potential.

**Key words:** Merthiolate, medicinal plant, hemagglutination, protein, lectin.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema ilustrativo da interação de lectina com carboidrato específico através de domínio de reconhecimento a carboidratos – DRC formando complexo lectina-ligante.	16
Figura 2 – Representação dos ensaios de hemaglutinação. (A) detecção de lectinas. (B) inibição da atividade hemaglutinante por carboidratos.	17
Figura 3 – Classificação estrutural das lectinas, com ênfase para os DRC.	20
Figura 4 – Esquema representativo de uma cromatografia por exclusão molecular.	25
Figura 5 – Esquema representativo de uma cromatografia por troca iônica.	27
Figura 6 – Esquema representativo de uma cromatografia por afinidade.	28
Figura 7 – Cálculo estimativo da massa molecular de proteínas.	31
Figura 8 – Distribuição geográfica do gênero <i>Jatropha</i> no Brasil.	35
Figura 9 – Espécies do gênero <i>Jatropha</i> .	36
Figura 10 – Folhas de <i>Jatropha multifida</i> .	37
Figura 11 – Coluna Cromatográfica de Quitina, com amostra de <i>Jatropha multifida</i> .	40
Figura 12 - Perfil cromatográfico da F0-20% de folhas de <i>J. multifida</i> por coluna (7.5 x 1.5 cm) de quitina. Frações de 2,0 mL foram coletadas e avaliadas quanto à absorbância e AH.	46
Figura 13 - Eletroforese com gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 10 % coradas com nitrato de prata - 1: marcador de massa molecular; 2: Lectina em condições desnaturante e não redutora; 4: Lectina em condição desnaturante e redutora com detiotreitol.	47
Figura 14 – Efeito da temperatura na AH.	49
Figura 15 – Efeito do pH na AH.	51
Figura 16 – Efeito do EDTA e de íons divalentes na AH	52

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação de lectinas quanto à especificidade ao ligante.	19
Tabela 2 – Atividades biológicas de lectinas em diferentes tecidos vegetais.	22
Tabela 3 – Teor de proteínas, atividade hemaglutinante (AH) e atividade hemaglutinante específica (AHE) de extratos de folhas de J.Multifida em diferentes soluções.	44
Tabela 4 – Fracionamento do extrato bruto com Sulfato de Amônio	45
Tabela 5 – Purificação da lectina das folhas de J. multifida.	46
Tabela 6 – Teste de inibição da atividade hemaglutinante de JamuLL por carboidratos e glicoproteína.	49

## LISTA DE ABREVIATURAS

- AH:** Atividade hemaglutinante;
- AHE:** Atividade hemaglutinante específica;
- ApulSL:** Lectina isolada de sementes de *Apuleia leiocarpa*;
- Ca<sup>2+</sup>:** Íon Cálcio;
- Ddel:** Lectina isolada de sementes de *Dypsis decaryi*;
- DRC:** Domínio de reconhecimento a carboidrato;
- DTT:** Ditioneitol;
- EantH:** Lectina isolada do látex de *Euphorbia antiquorum* L.;
- Ebulin-f:** Lectina isolada do fruto de *Sambucus ebulus* L.;
- EDTA:** Etilenodiaminotetracético;
- EMtL6:** Lectina isolada da semente de *Tamarindus indica*;
- GaBL:** Lectina isolada da casca da *Genipa americana*;
- HCl:** Ácido Clorídrico;
- IFL:** Lectina isolada da recolha de *Fenneropenaeus indicus*;
- JamuLL:** Lectina isolada das folhas de *Jatropha multifida*;
- kDa:** Quilo Dalton;
- Lunati:** Lectina isolada de *Phaseolus lunatus* billb;
- Mg<sup>2+</sup>:** Íon Magnésio;
- Mn<sup>2+</sup>:** Íon Manganês;
- mg:** Miligrama;
- mL:** Mililitros;
- mM:** Milimolar;
- nm:** Nanômetros;
- µL:** Microlitros;
- µg:** Microgramas;
- m/v:** Massa por volume;
- NaCl:** Cloreto de sódio;
- NaOH:** Hidróxido de sódio;

**(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>**: Sulfato de Amônio;

**pH**: Potencial hidrogeniônico;

**PAGE**: Eletroforese em gel de poliacrilamida;

**PBS**: Tampão fosfato salino;

**PDL**: Lectina isolada de *Parkia discolor*;

**PeRoL**: Lectina isolada da raiz de *Portulaca elatior*;

**PgTeL**: Lectina isolada da *Punica granatum* L;

**PPL**: Lectina isolada de sementes de *Parkia platycephala*;

**RPM**: Rotação por minuto;

**SDS**: Dodecil-sulfato de sódio;

**SejaBL**: Lectina isolada da casca de *Sebastiania jacobinensis*;

**SEL-fd**: Lectina isolada do fruto de *Sambucus ebulus* L

**SteLL**: Lectina isolada de folhas de *Schinus terebinthifolius*;

**TBFL**: lectina isolada de sementes de *Phaseolus acutifolius*;

**TRIS**: 2-amino-2-hidrometilpropano-1,3-diol;

**TxLCI**: Lectina isolada do bulbo da *Tulipa gesneriana*;

**VGL**: Lectina isolada de sementes de *Vatairea guianensis*;

**WSMoL**: Lectina isolada de sementes de *Moringa oleífera*;

**Zn<sup>2+</sup>**: íon zinco

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	16
<b>2.1 Lectinas conceitos e aspectos históricos</b> .....	16
2.1.1 Classificação e fontes das lectinas.....	18
2.1.2 Aplicações de lectinas de plantas .....	21
2.1.3 Estratégias de purificação de lectinas.....	22
2.1.4 Técnicas de caracterização de lectinas.....	29
2.1.4.1 Eletroforese.....	30
2.1.4.2 Efeito do pH na atividade de lectinas.....	31
2.1.4.3 Efeito da temperatura na atividade de lectinas.....	32
<b>2.2 A Importância da Investigação de Produtos Naturais</b> .....	33
<b>2.3 Espécie Vegetal em Estudo</b> .....	34
2.3.1 Gênero <i>Jatropha</i> .....	34
2.3.2 <i>Jatropha multifida</i> L.....	36
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	38
<b>3.1 Objetivo Geral</b> .....	38
<b>3.2 Objetivos Específicos</b> .....	38
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	39
<b>4.1 Obtenção do Material</b> .....	39
<b>4.2 Preparo do extrato bruto</b> .....	39
<b>4.3 Precipitações com Sulfato de Amônio</b> .....	39
<b>4.4 Cromatografia Líquida</b> .....	40
<b>4.5 Teste de hemaglutinação</b> .....	40
<b>4.6 Determinação da Concentração de Proteínas</b> .....	41
<b>4.7 Eletroforese SDS-PAGE</b> .....	41
<b>4.8 Dosagem de fenóis</b> .....	41
<b>4.9 Teste de Inibição da AH por carboidratos e glicoproteína</b> .....	42
<b>4.10 Avaliação do efeito da temperatura e do pH na AH</b> .....	42
<b>4.11 Avaliação do efeito do EDTA e de íons divalentes sobre AH</b> .....	43
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	43
<b>5.1 Extrato Bruto</b> .....	43
<b>5.2 Fracionamento Salino</b> .....	44

<b>5.3 Cromatografia em coluna de quitina .....</b>	<b>45</b>
<b>5.4 Eletroforese SDS-PAGE.....</b>	<b>47</b>
<b>5.5 Teste de inibição da AH por carboidratos e glicoproteína.....</b>	<b>48</b>
<b>5.6 Efeito da temperatura e do pH na AH.....</b>	<b>49</b>
<b>5.7 Efeito do EDTA e íons divalentes na AH.....</b>	<b>51</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>54</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>55</b>

## 1. INTRODUÇÃO

As lectinas compreendem um grupo de proteínas com pelo menos um domínio não catalítico e a capacidade de se ligar reversivelmente a carboidratos simples ou complexos através de interações fracas (SHARMA, et al., 2017). As lectinas estão presentes na maioria das espécies, sendo particularmente bem conhecidas nos tecidos vegetais, exercendo uma ampla gama de papéis biológicos (CAGLIARI, et al., 2018). Desde o primeiro relato de isolamento de lectina no século 19 por Stillmark, vários estudos relataram a purificação e caracterização dessas biomoléculas, bem como suas diversas aplicações. Dentre as principais atividades dessas proteínas, podemos destacar as atividades biológicas anti-inflamatórias, antitumorais, inseticidas, antifúngicas e antibacterianas (CAVADA et al. 2020; FONTENELLE et al. 2018; PALHARINI et al., 2017; MACEDO et al., 2015; OHIZUMI et al., 2009; SILVA et al., 2018; PAIVA et al., 2010; GOMES et al., 2014).

Para que as características, propriedades e atividades de uma determinada proteína, como a lectina, possa ser confirmadas se faz necessário avaliá-la em sua forma pura, para que se possa confirmar o princípio ativo da atividade observada nas preparações anteriores (extrato e fração pré-purificada). As principais etapas para tal feito consistem no preparo de extrato bruto, fracionamento (salino e/ou orgânico), cromatografia (exclusão molecular, troca iônica e/ou afinidade), e as técnicas de caracterização, como eletroforese, e a influência de pH e temperatura e dependência de íons. (COSTA, 2018).

Os produtos naturais são alvo de diversas pesquisas pois mostram-se contendo uma grande diversidade de compostos com diversas propriedades físico-químicas e biológicas. Esses compostos podem ser obtidos de organismos como as plantas. Dentre elas, *Jatropha multifida* L. (MALPIGHIALES: EUPHORBIACEAE) é uma espécie conhecida pelos nomes vulgares de flor-de-coral, coral, coral-dos-jardins e flor-de-sangue. É cultivada na América do Sul, no sul da China e na África, sendo também encontrada em Alagoas (ZHANG, et al., 2018; RAMPADARATH et al., 2014; SMITH et al., 1988). As raízes, os caules, as folhas, as sementes e óleo da planta têm sido amplamente utilizados na medicina popular como cicatrizantes de feridas e úlceras, para o tratamento da candidíase oral, gonorreia, febre, artrite e infecções na pele e urinárias (FALODUN et al., 2014). Extratos orgânicos de raízes da *J. multifida*

foram avaliadas quanto a sua atividade antibacteriana frente a inibição do crescimento de infecções causadas por *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* (AIYELAAGBE, 2001) e o extrato aquoso de suas folhas possuem atividade antimicrobiana e podem ser utilizados no tratamento de Candidíase causada por *C. albicans* e infecções por *S. aureus*. (AGBAN et al., 2020) e extratos orgânicos de suas folhas indicaram propriedades antimicrobianas e larvicidas (RAMPADARATH et al., 2014), porém não está descrita na literatura nenhuma identificação, purificação ou caracterização de lectinas de folhas de *J. multifida*, dessa forma a presente investigação objetiva, de maneira geral, identificar, purificar e caracterizar uma lectina das folhas de *J. multifida*.

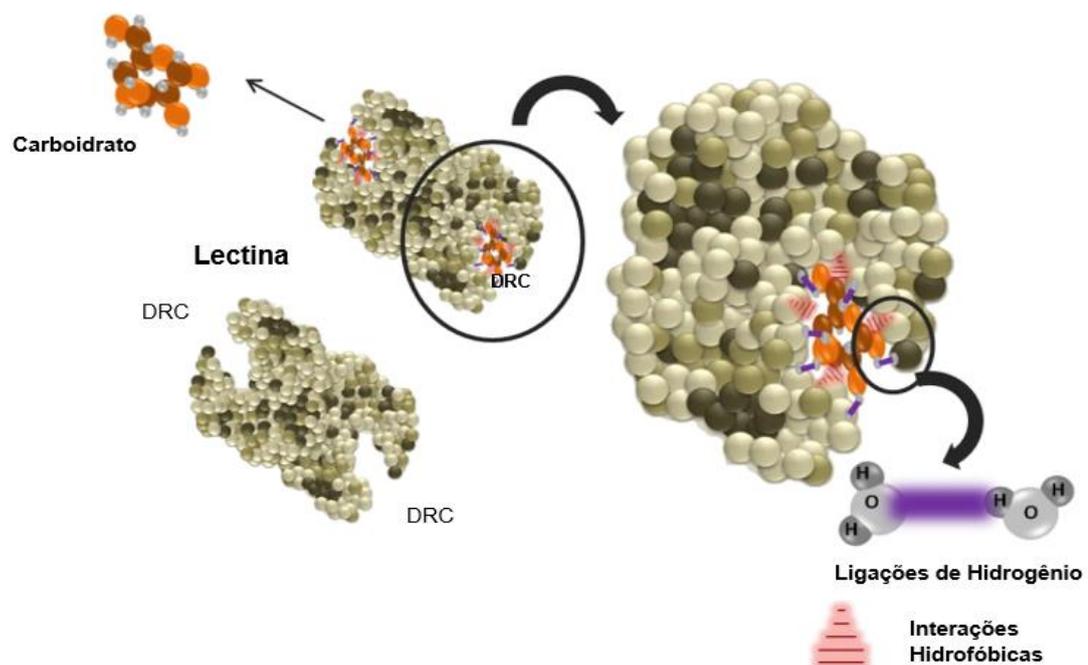
## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Lectinas: conceitos e aspectos históricos

As lectinas são proteínas de origem não imune, pois não são produtos de uma resposta imune, o que faz desta natureza uma característica que difere de anticorpos anticarboídratos os quais também possuem a habilidade de promover aglutinação das células. Embora os anticorpos possam ser estruturalmente semelhantes, as lectinas diferem no envolvimento de metais, estrutura tridimensional e massa molecular. Além disso, as lectinas existem em animais e também em organismos sem sistema imunológico, como plantas e bactérias (SANTOS et al, 2014).

Lectinas apresentam ampla distribuição na natureza e são capazes de reconhecer e se ligar reversivelmente a carboidratos e glicoconjugados através de ligações de hidrogênio e interações de Van der Waals, que ocorrem no domínio de reconhecimento de carboidratos da lectina (Figura 1) (SANTOS et al, 2014).

Figura 1 - Esquema ilustrativo da interação de lectina com carboidrato específico através de domínio de reconhecimento a carboidratos – DRC formando complexo lectina-ligante.

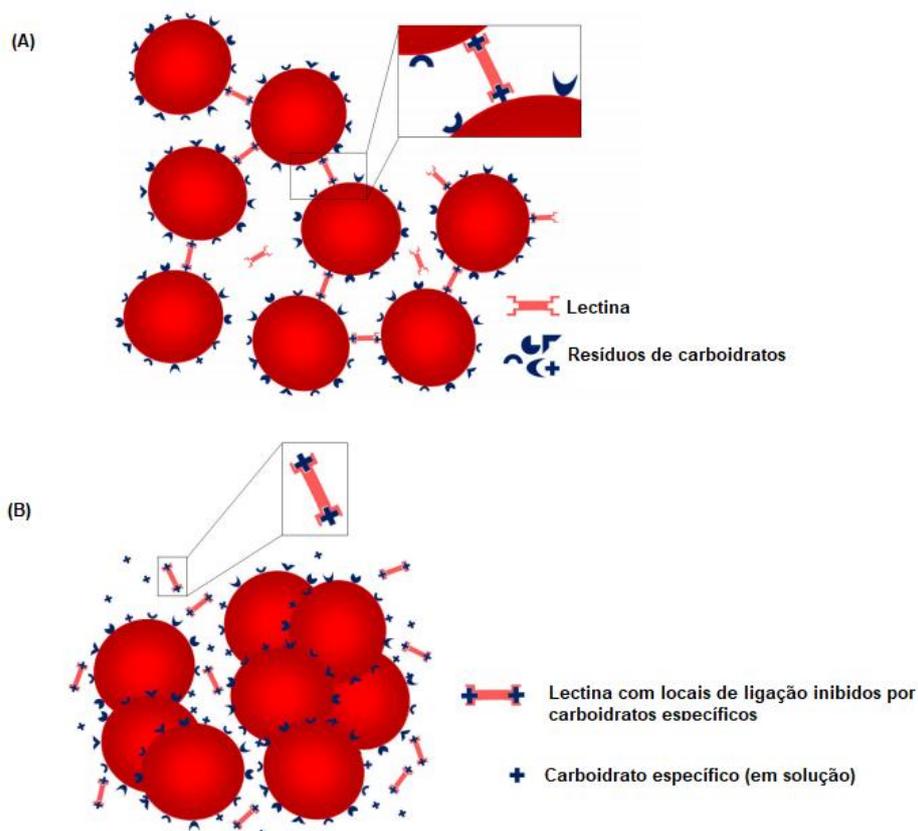


Fonte: Adaptado de SILVA et al., 2012.

As primeiras lectinas descobertas nas plantas foram ricina (presente em extratos de *Ricinus communis*) e abrina (obtidas de extratos de *Abrus precatorius*), capazes de aglutinar células sanguíneas e proteínas inativadoras de ribossomos (PIRs) (OLSNES, 2004; BRADBERRY, 2007) de proteínas heterodiméricas com duas cadeias peptídicas mantidas juntas por uma ponte dissulfeto (BAYER et al., 2012).

O ensaio de hemaglutinação é a forma mais simples e rápida de detectar lectinas em uma amostra, isto por que as lectinas aglutinam eritrócitos por reconhecer os carboidratos da superfície celular, formando uma rede reticulada (figura 2A) (SANTOS et al, 2014). Uma vez que outras moléculas como os compostos fenólicos também apresentam a capacidade de aglutinar células por interações não-específicas a especificidade da lectina para um determinado carboidrato, assim como a confirmação de sua presença numa amostra é definida pelo ensaio de inibição da atividade hemaglutinante na presença do carboidrato ou glicoproteína em concentração determinada na solução do ensaio (figura 2B) (CORREIA et al., 2008).

Figura 2– Representação dos ensaios de hemaglutinação. (A) detecção de lectinas. (B) inibição da atividade hemaglutinante por carboidratos.



Lectinas capazes de aglutinar eritrócitos eram chamadas anteriormente de fitohemaglutininas, fitoaglutininas ou aglutininas de plantas (TSANEVA; DAMME, 2020). O termo lectina (originário do latim *lectus*, que significa “selecionado”) para designar a classe de proteínas que apresenta características comuns de seletividade na interação com carboidratos (OLIVEIRA, 2018). Este termo foi generalizado por Sharon e Lis (1972) para incluir todas as proteínas de fontes variáveis, de origem não imune e capazes de se ligar a carboidratos, com ou sem especificidade para os eritrócitos do tipo sanguíneo. Em 1980, as lectinas foram designadas como (glico-) proteínas de origem não imune, mostrando dois ou mais locais de ligação capazes de interagir reversivelmente com carboidratos, precipitar glicoconjugados e aglutinar células animais ou vegetais. Investigações de lectinas indicaram sua presença em animais, líquens, bactérias e fungos (SANTOS et al., 2013).

### 2.1.1 Classificação e fontes das lectinas

A classe de proteínas representada pelas lectinas é classificada de diversas formas. Dentre as diversas maneiras de classificação de lectinas, podemos citar como principais: especificidade de ligação ao carboidrato ou a glicoconjugados (tabela 1) e a quantidade e tipos de domínios de ligação.

a) Quanto à especificidade ao ligante: podem ser classificadas como demonstrado na tabela 1.

Tabela 1 - Classificação de lectinas quanto à especificidade ao ligante.

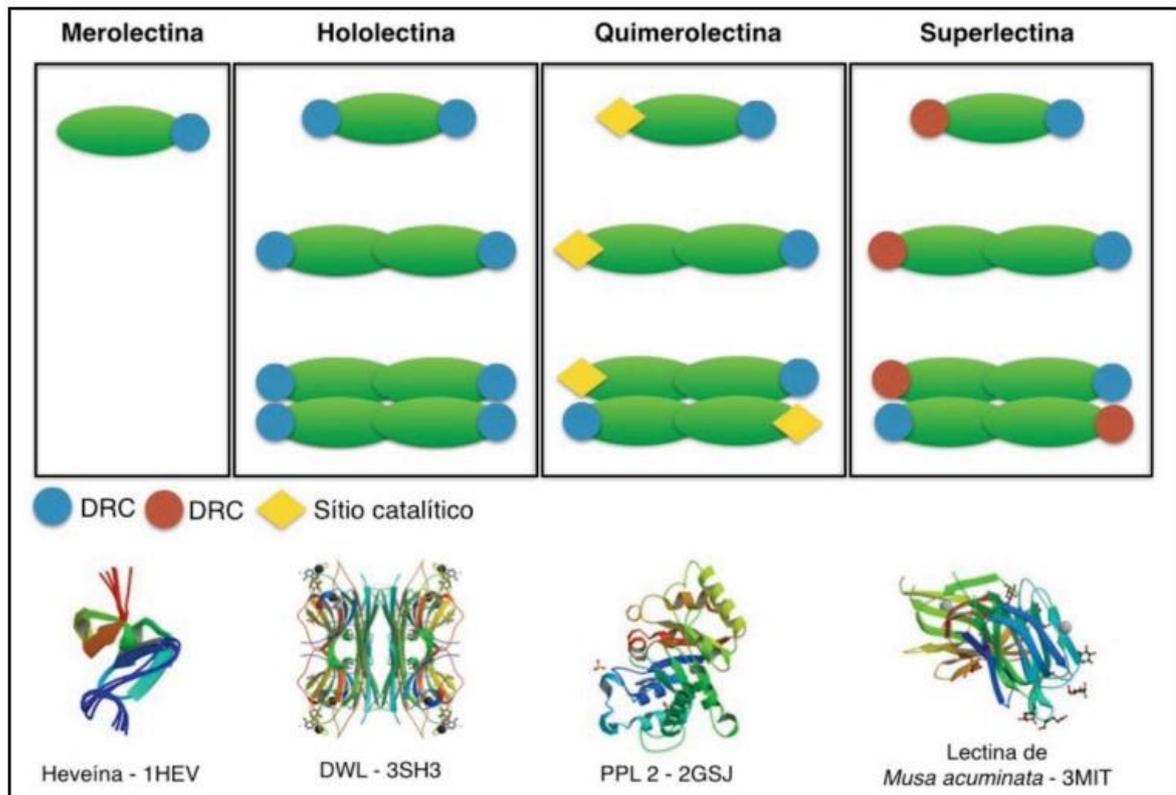
<b>Famílias</b>	<b>Exemplos</b>	<b>Fonte</b>
Lectinas ligadoras de glicose/manose	Lectina das sementes de <i>Cratylia mollis</i> (CramoLL)	Melo et al., 2011.
Lectinas ligadoras de N-acetilglicosamina	Lectina das folhas de <i>Schinus terebinthifolius</i> (SteLL)	Gomes et al., 2013.
Lectinas ligadoras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

Fonte: adaptado de SILVA, 2018.

b) Quanto ao número de domínios de reconhecimento a carboidrato (DRC)

Em relação a classificação de lectinas em função do número de domínios de reconhecimento a carboidrato (Figura 3), elas podem ser assim divididas: merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e as superlectinas. (OSTERNE, 2016).

Figura 3 - Classificação estrutural das lectinas, com ênfase para os DRC.



Fonte: OSTERNE, 2016, adaptada de VAN DAMME et al., 1998. DRC: domínio de reconhecimento a carboidratos.

- Merolectinas: apresentam apenas um sítio de ligação a carboidratos, sendo denominada de monovalente, são incapazes de causar aglutinação de células ou de precipitar glicoconjugados. A lectina mais conhecida dessa classe é a Viena, obtida a partir do látex de *Hevea brasiliensis* (VAN DAMME et al., 1998).
- Hololectinas: apresentam dois ou mais sítios idênticos, sendo denominadas divalentes, pois podem fazer ligação a carboidratos, podendo também estabelecer ligações cruzadas entre células e glicoconjugados e, eventualmente, precipitando-os. Um exemplo dessa classe é a lectina de *Dioclea wilsonii* (RANGEL et al., 2011).
- Quimerolectinas: além dos domínios de ligação a carboidrato, apresentam um ou mais domínios independentes e de função biológica distinta, podendo desempenhar uma função enzimática ou outra. A lectina PPL2 é um exemplo, sendo extraída a partir de sementes de *Parkia platycephala*, que apresenta de forma independente um domínio ligante a quitina e outro com atividade endoquitinásica (CAVADA et al., 2006).

- Superlectinas: fazem parte do quarto e último grupo mais diversificado de lectinas, que por sua vez apresentam um incrível potencial, pois são proteínas que têm pelo menos dois domínios distintos de ligação a carboidratos (VAN DAMME et al., 1998). Um notório exemplo, é a lectina extraída do bulbo da *Tulipa gesneriana*, denominada TxLCI, que é constituída por dois domínios de ligação a carboidrato, reconhecendo manose e N-acetil-D-galactosamina, respectivamente; (MEAGHER et al., 2005 apud DE SOUSA, 2014).

Estão amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em seres unicelulares (IMBERT et al., 2004), animais (MOURA et al., 2006) e vegetais (LEITE et al., 2005). Em vegetais, as lectinas são frequentemente isoladas de sementes, principalmente das leguminosas (FERNANDES et al., 2011), de raízes (SOUZA et al., 2011), folhas (SILVA, et al, 2010), tubérculos (KAUR et al., 2006), cerne (SÁ et al., 2008), casca (COSTA et al, 2018) e sementes (SANTOS, et al., 2012). Esta ampla distribuição reflete uma multiplicidade de funções biológicas. As funções biológicas sugeridas para muitas lectinas são baseadas em suas propriedades gerais e localização em diferentes tecidos. A existência de locais de ligação para carboidratos específicos, a principal característica das lectinas, é um fator importante para a determinação de seu papel biológico (SANTOS et al, 2014).

### 2.1.2 Aplicações de lectinas de plantas

Diversas importâncias biológicas têm sido atribuídas as lectinas de diferentes tecidos das plantas (tabela 2). Nas plantas, tem se observado ação defensora contra microrganismos patogênicos e insetos, bem como participação em mecanismos de nodulação, estocagem e mobilização de proteínas e carboidratos de reserva além do alongamento da parede celular (KENNEDY et al., 1995; HIRSCH, 1999; ISIDRO et al., 2001; CARLINI; PAES et al., 2002; LIMPENS; BISSELING, 2003).

Tabela 2 - Atividades biológicas de lectinas em diferentes tecidos vegetais

<b>Estrutura vegetal</b>	<b>Atividade e/ou propriedades</b>
Sementes	Propriedades de agregação anticoagulante e antiplaquetária; coagulante, atividades mitogênicas, antibacterianas, antifúngicas e antitumorais.
Casca	Antifúngicas e inseticidas.
Cerne	Termiticida.
Folhas	Antiviral, antibacteriana e antifúngica.
Frutos	Mitogênica, antiviral e antibacteriana.
Rizomas	Antiproliferativa, imunoestimulatória, antiviral, antifúngica, antitumoral e atividade indutora de apoptose.

Fonte: Adaptado de SANTOS et al., 2014.

Além destas outras inúmeras atividades, muitas aplicações biológicas são encontradas como o reconhecimento, diferenciação e determinação de tipos celulares (DANGUY et al., 1998; FUNK; THOMPSON, 1998), isolamento e análise estrutural de oligossacarídeos e glicoconjugados (ENDO, 1996; HAYUNGA; SUMMER, 1986; XIE et al., 2009; YAMASHITA; OHKURA, 2014), envolvimento no processo de cicatrização (GONZÁLEZ et al., 2014), atividade antiproliferativa (SILVA et al., 2014), anti-inflamatória (LEITE et al., 2012), anti-parasitaria (CASTANHEIRA et al., 2015), antitumoral (ZHANG et al., 2015), antimutagênico e antioxidante (FRASSINETTI et al., 2015), imunomoduladora (PRASANNA; VENKATESH, 2015), antifúngica (CHIKALOVETS et al., 2015), antibacteriana (CARVALHO et al., 2015), antiviral (GORDTS et al., 2015) e inseticida (NAPOLEÃO et al., 2013).

### 2.1.3 Estratégias de purificação de lectinas

Para que as características, propriedades e atividades de uma determinada proteína possa ser confirmadas se faz necessário avaliá-la em sua forma pura, para que se possa confirmar o princípio ativo da atividade observada nas preparações anteriores (extrato e fração pré-purificada) (COSTA, 2018).

O processo de purificação de proteínas (lectinas, enzimas, etc.) é iniciado a partir uma preparação complexa, podendo ser denominada de extrato bruto, que pode

ser advindo de um órgão, tecido, célula, ou qualquer estrutura de onde a proteína de interesse venha estar (YAO et al., 2010). Para que haja obtenção de bons resultados no processo de purificação é necessário manter diversos cuidados, dos quais se destacam o controle da agitação magnética, que deve ser mantida numa velocidade constante, assim como estabilidade da temperatura e pH, devendo estes ser rigorosamente controlados e mantidos ao longo de todo o processo, evitando com isso perdas proteicas por desnaturação. Adicionalmente cuidados com os possíveis tampões de extração a ser usado, como a concentração de sais e polaridade dos solventes, garantindo com isso, um resultado confiável e de possível replicabilidade (STRYER, TYMOZKO; BERG, 2006).

No processo de extração de lectinas muitas vezes é utilizado o auxílio mecânico, para triturar, ou macerar o tecido a ser estudado, aumentando a área de contato do tecido com o solvente. Os extratos são feitos utilizando diversas soluções de extração, tais como tampões, soluções salinas ou mesmo água. Solução tampão de PBS foi empregada para extração da lectina do fungo, *Laetiporus sulphureus* (WANG et al., 2018). Em outro trabalho foi observado a extração de lectinas da leguminosa *Crotalaria spectabilis* R, por solução salina NaCl (OLIVEIRA, 2017), assim como tem se observado a extração de lectinas de *Moringa oleifera* a partir de água (CORIOLANO et al., 2018). Logo tem se observado que as soluções de extração podem ser as mais diversas possíveis, a depender da solubilidade e estabilidade que a biomolécula alvo tem ao solvente empregado.

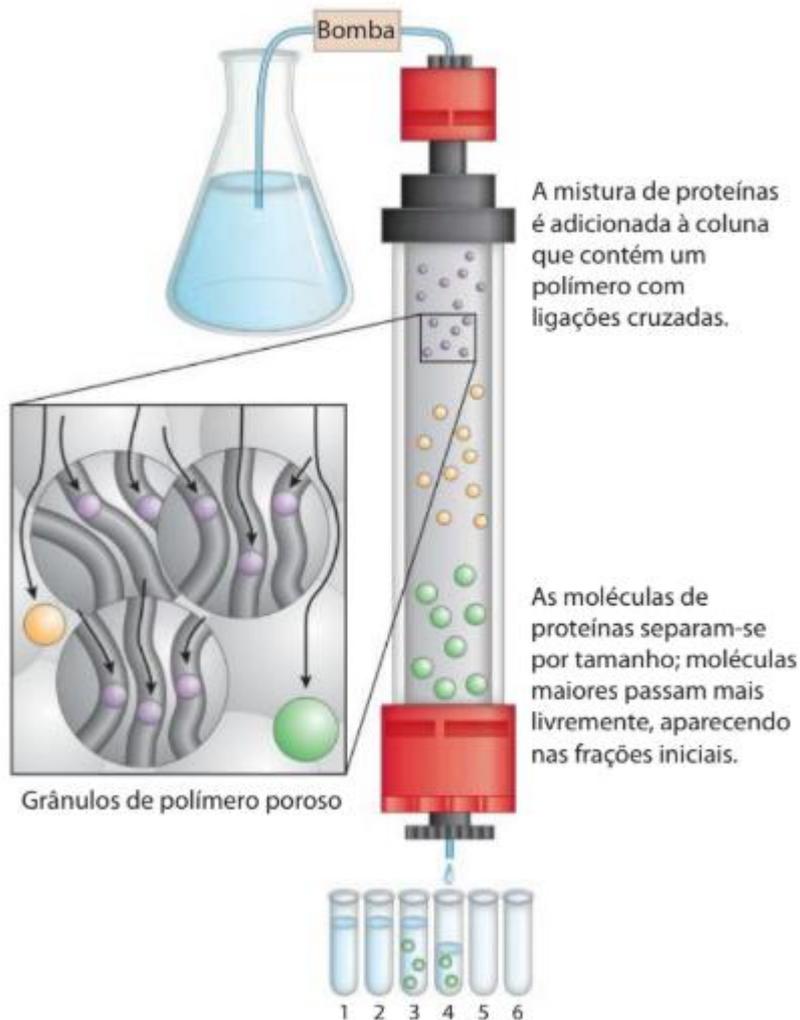
Para a preparação do extrato, o material é submetido à extração sob período de tempo e condições de temperatura pré-estabelecidas. Após o processo de extração, inicia-se uma nova etapa para tentar isolar a proteína de interesse. O fracionamento protéico tem por objetivo concentrar a proteína de interesse e eliminar a maior quantidade de contaminantes possível, otimizando assim as etapas posteriores. O fracionamento frequentemente utiliza sais ou solventes orgânicos. O fracionamento mais comumente utilizado para extração de lectinas, segundo a literatura, é através do uso ou a adição de sal, visto que a solubilidade de moléculas proteicas é reduzida em meio salino. O principal exemplo é o uso do sulfato de amônio, um sal altamente hidrofílico, que remove a camada de solvatação das proteínas fazendo com que as mesmas precipitem. Logo com a remoção da camada de solvatação há um aumento nas interações entre proteínas do meio aquoso, permitindo

a formação de um denso complexo de proteínas, provocando assim a precipitação dessas biomoléculas (PROCÓPIO et al., 2017). Esse processo de separação por meio de saturação salina de soluções é conhecido, pelo termo em inglês, *salting out*. As lectinas parcialmente purificadas pelo tratamento salino são geralmente submetidas ao processo de diálise em membranas semipermeáveis, método baseado na separação de moléculas por diferenças de massa molecular. As proteínas ficam retidas dentro da membrana, enquanto moléculas menores (como carboidratos ou sais), presentes na amostra passam para a solução solvente (THAKUR et al., 2007).

As lectinas podem ser purificadas à homogeneidade através de métodos cromatográficos que utilizam matrizes cuja escolha dependerá da especificidade a carboidratos (cromatografia de afinidade), carga líquida (cromatografia de troca iônica) ou tamanho molecular da proteína (cromatografia de gel filtração) (MOURA et al., 2006; SANTI-GADELHA et al., 2006; SUN et al., 2007; NASCIMENTO et al., 2012).

Dentre os métodos conhecidos e difundidos na atualidade para purificação de proteínas, a cromatografia líquida, está definida como uma boa técnica e de grande ênfase na purificação de proteínas. As cromatografias líquidas requerem sempre um grande cuidado para a longevidade da coluna, tendo em vista seu alto custo. No processo de empacotamento das colunas, a matriz deve ser previamente retirada do refrigerador, para que esta se mantenha em temperatura ambiente. Em seguida, calcula-se o volume exato e necessário da coluna, evitando com isso desperdícios da matriz. Após o volume ser previamente calculado, é indicado que o processo de empacotamento seja feito de forma lenta e gradual, sendo imprescindível a observação e o cuidado com a matriz, evitando choques fortes e ríspidos, uma vez que tais cuidados evitam o rompimento dos *bids*, sedimentação da matriz, formação de bolhas, rachadura da fase estacionária e criação de duas ou mais fases na coluna. Após a coluna estar completamente empacotada a mesma estará pronta para os procedimentos de uso, de acordo cada método. A cromatografia de gel filtração, também conhecida como cromatografia por exclusão molecular (Figura 4) tem como princípio separar as proteínas por diferença de massa molecular.

Figura 4 – Esquema representativo de uma cromatografia por exclusão molecular



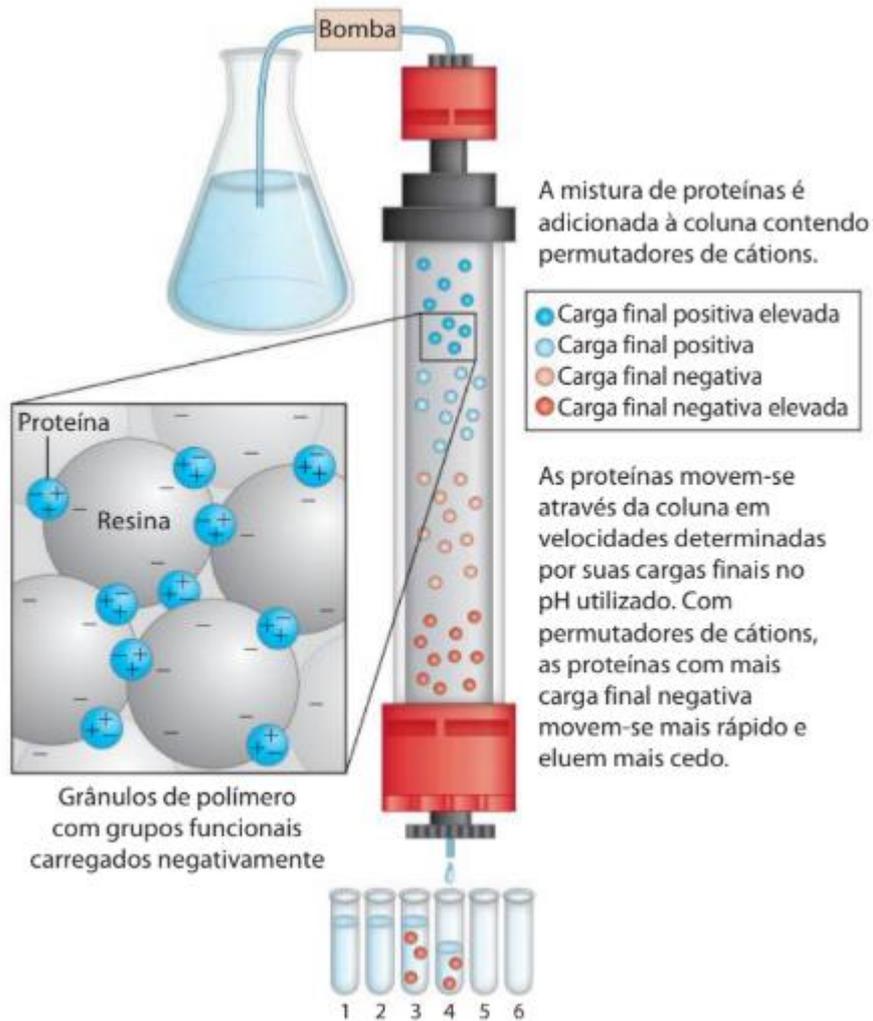
Fonte: adaptado de NELSON; COX, 2015.

As proteínas de alta massa molecular percorrem um caminho mais curto e são eluídas, passando pelos *bids* (esferas), mais rapidamente, porém as proteínas de baixa massa molecular penetram nas esferas de diâmetro específico presente na matriz polimérica da fase estacionária e tomam um caminho mais longo, sendo eluídas depois das proteínas de alta massa molecular (NELSON; COX, 2015). A fase estacionária de uma coluna de gel filtração pode variar de acordo com os polímeros a que são constituídas. Alguns cuidados são importantes para se obter uma melhor resolução das cromatografias de exclusão molecular, tais como a altura da coluna, tendo em vista que colunas com maior altura e menor espessura apresentam maiores resoluções na separação de proteínas. Outro fator imprescindível é o volume de amostra a ser aplicado, uma vez que quanto menor o volume a ser aplicado maior a

resolução e o poder de resolução da coluna, a literatura descreve que o volume a ser aplicado deve ser de 2 % do volume total da coluna. Contudo é necessário observar outro fator importante, que é a viscosidade das amostras a serem aplicadas, pois amostras com muita viscosidade, como mucos de animais ou extratos de plantas e fungos com muita cor e pigmentação, poderão obstruir e até mesmo manchar a matriz estacionária causando danos à mesma (NGOC et al., 2015; ODDEPALLY et al., 2013; ZHAO et al., 2015; NASCIMENTO et al., 2016; SANTOS, 2016). Tendo em vistas as cromatografias utilizadas para purificação de proteínas, a gel filtração se mostra de grande importância, devido ao seu potencial de separação de moléculas por sua massa molecular, que irá variar de acordo ao tamanho dos *bids* (poros) da fase estacionária, podendo esses ser maiores ou menores. Mas a coluna de gel de filtração é indicada principalmente pra amostras advindas de um processo de fracionamento, pois ainda que não atinja o êxito com apenas esse processo, a sua escolha influencia em grandes proporções a separação de proteínas e demais contaminantes, e vale salientar que o valor que as colunas de gel filtração ou sua matriz têm são mais acessíveis que outras matrizes de diferentes técnicas. A literatura tem retratado o grande uso de colunas de gel filtração, para purificação de lectinas em apenas um só passo, a exemplo da lectina purificada da semente de *Borreria hispida*, purificada a partir de uma matriz Sephadex G-100 (RUPACHANDRA et al., 2014). E a partir da junção de outras cromatografias, é descrito a purificação da lectina Lunati, a partir de uma leguminosa *Phaseolus lunatus billb* (WU et al., 2016).

Outro método de purificação muito utilizado para purificar lectinas tem sido a cromatografia por troca iônica (Figura 5), sendo esta técnica baseada na adsorção de proteínas em matrizes carregadas com cargas positivas ou negativas, seguidas de um fracionamento por meio de um gradiente salino e/ou de pH. Normalmente é utilizada na separação de proteínas, peptídeos, ácidos nucléicos e outras biomoléculas (MACALDOWIE et al., 1998; KHANGEMBAM; CHAKRABATI, 2015; BKHAIIRA et al., 2016; SANTOS, 2016).

Figura 5– Esquema representativo de uma cromatografia por troca iônica



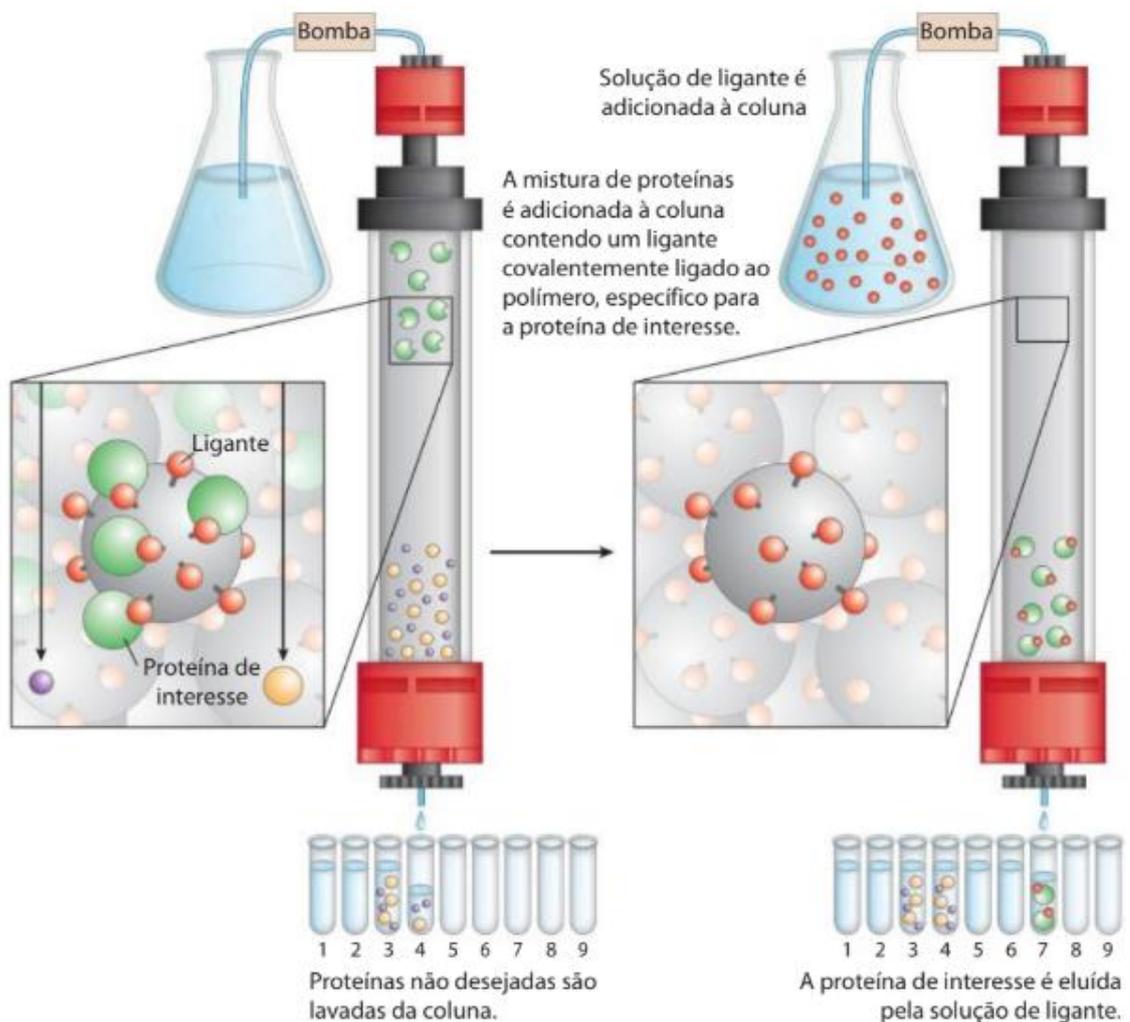
Fonte: adaptado de NELSON; COX, 2015.

Esta técnica consiste em uma resina (matriz), que pode ser derivada de compostos inorgânicos, resinas sintéticas ou polissacarídeos, são carregadas positiva, ou negativamente. Como em qualquer cromatografia, a coluna deve estar devidamente pronta para uso, para que as condições de aceitação da amostra sejam adequadas ao processo de adsorção em cargas opostas. No processo de purificação por esse método, proteínas de cargas contrárias a matriz são retidas, enquanto que as demais são eluídas durante a lavagem da coluna. A cromatografia de troca iônica tem sido muito utilizada na purificação de lectinas, devido às vantagens expressas pela técnica, método simples de utilização, com alto controle do processo, elevada capacidade e alto poder de resolução. É essencial a descrição desse método tendo em vista que nos últimos anos, a purificação de lectinas tem abordado essa técnica

em diversos trabalhos, Wu et al (2016), purificaram uma lectina da alga *Hizikia fusiformis*, com apenas um só passo cromatográfico. Trabalhos recentes fazem descrição de outra lectina purificada a partir de uma alga marinha vermelha denominada *Solieria filiformis*, com atividade antitumoral (CHAVES et al., 2018), e outro trabalho faz menção de VGL uma lectina que foi isolada de sementes de *Vatairea guianensis* por permuta iônica (cromatografia de troca iônica), seguida de cromatografia de afinidade, em matriz de goma de guar (MARQUES et al., 2017).

O método extensivamente utilizado na purificação de lectinas tem sido a cromatografia de afinidade (Figura 6) que consiste em uma fase estacionária com altíssima afinidade a molécula de interesse (NELSON; COX, 2015).

Figura 6 – Esquema representativo de uma cromatografia por afinidade



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 que essas moléculas sejam desligadas se faz necessário um novo eluente que possua alterações brandas no pH, na concentração de sal ou a utilização de uma molécula com maior afinidade a proteína ligada a ela (XIU et al., 2015; VASCONCELOS et al., 2015; SANTOS, 2016).

Muitos trabalhos destacam o uso da cromatografia de afinidade para a purificação de lectinas, sendo esta uma das proteínas com maior índice de purificação destacado na literatura por cromatografia de afinidade. Diversas lectinas foram isoladas por meio de cromatografia de afinidade, a exemplo da SteLL, extraída da folha de *Schinus terebinthifolius*, e WSMoL, isolada a partir de sementes de *Moringa oleífera*, ambas as lectinas purificadas com um único passo cromatográfico, utilizando matriz de quitina, em função de suas afinidades aos resíduos de N-acetilglicosamina (monossacarídeo constituinte da quitina), (GOMES et al., 2013. OLIVEIRA et al., 2016).

#### 2.1.4 Técnicas de caracterização de lectinas

As formas de caracterizações visam geralmente o estudo de estabilidade térmica e temperatura ótima, resistência a variações de pH, dependência a íons metálicos inorgânicos, composição estrutural, tipos e natureza de interações estabelecidas, número e tipos de domínios de ligações. Para determinação dessas propriedades diversas técnicas de caracterização de proteínas são usadas, dentre elas destacam-se: Eletroforese uni e bidimensional, degradação de Edman (técnica usada para determinar a sequência de estruturas primárias de proteínas por meio de hidrólise de aminoácidos N-terminais) espectrometria de massa (técnica empregada na determinação de massa de biomoléculas, composição de estruturas primárias de proteínas, número de monômeros constituintes) fluorescência, dicróismo circular – CD, cristalografia (técnica empregada para determinação de interações intra/intercadeias em proteínas, ângulos de ligação e composição de aminoácidos presentes em domínios de ligação e sítios catalíticos em enzimas) (NELSON; COX, 2015; ITO, 2004).

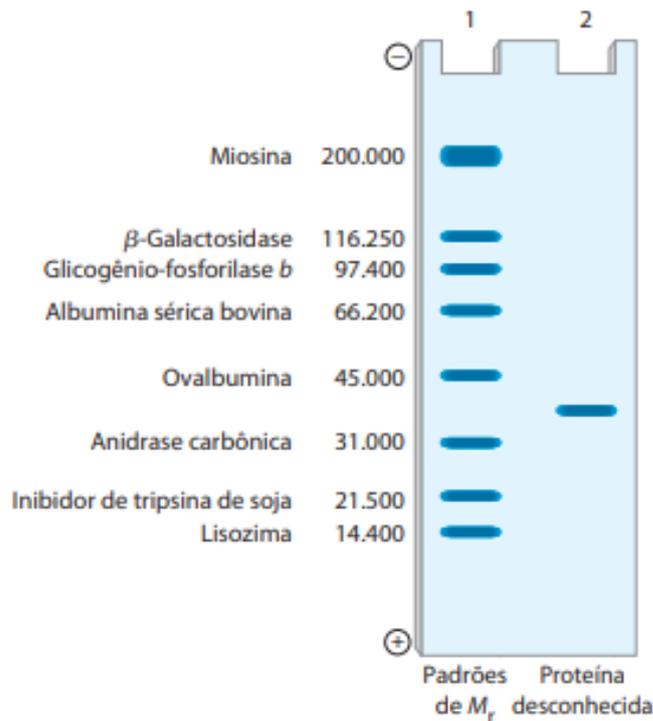
Abaixo, serão descritas as técnicas mais utilizadas para caracterização de proteínas.

#### 2.1.4.1 Eletroforese

Em laboratórios de bioquímica a eletroforese é uma técnica usada para avaliar o grau de pureza de uma amostra, observar o perfil proteico, quantificar a massa molecular de proteínas, determinar o número de subunidades presentes em proteínas e o seu ponto isoelétrico. A eletroforese unidimensional faz-se o uso de um gel de poliacrilamida formado por ligações cruzadas, onde o gel reticulado de poliacrilamida atua como uma peneira, retardando e separando as proteínas de uma preparação específica proteica em razão da massa molecular dos componentes. Sendo que as proteínas migram pelo gel em função de um potencial elétrico (E) fornecida por um campo elétrico (NELSON; COX, 2015).

A mobilidade das proteínas pelo gel depende de fatores como: a velocidade, potencial elétrico, carga final (Z) e coeficiente de fricção. Portanto, é possível estimar a migração da molécula pelo gel, a migração pode ser calculada pelas seguintes razões: velocidade/Potencial elétrico ou Carga final/coeficiente de fricção (NELSON; COX, 2015). Para estimar a massa molecular dos componentes proteicos de uma amostra é utilizado um padrão de massa molecular composto por proteínas de massa molecular conhecida para determinar a massa molecular por meio de comparações de posições dos componentes do padrão e das amostras desconhecidas, fazendo assim um cálculo estimativo da massa molecular (Figura 7) (NELSON; COX, 2015).

Figura 7 – Cálculo estimativo da massa molecular de proteínas.



Fonte: Adaptado de NELSON; COX, 2015.

#### 2.1.4.2 Efeito do pH na atividade de lectinas

Lectinas assim como as demais proteínas apresentam pH referente a sua atividade máxima e uma faixa variante de pH de estabilidade que está correlacionado a sua estrutura nativa. Os aminoácidos que compõe proteínas possuem diferentes polaridades em função do pH do meio. O potencial hidrogeniônico (pH) do meio reacional determina a carga líquida de aminoácidos presente na sequência primária de peptídeos e proteínas influenciando diretamente na conformação nativa de proteínas. O aspartato e o glutamato, por exemplo, possuem os seus grupamentos R polares (cadeia lateral) carregados negativamente em pH fisiológico (7,0 – 7,4), pois o grupamento carboxila de suas cadeias laterais sofrem ionização com a desprotonação da hidroxila terminal conferindo assim uma carga líquida negativa em pH fisiológicos (CAMPBELL, 2016).

Os aminoácidos são moléculas anfóteras, possuem a capacidade de se estabelecerem nas formas catiônicas e aniônicas a depender do pH que estão

inseridos, que por sua vez são determinantes nos tipos de interações que formam as estruturas proteicas mais elevadas. Também sabe-se que, carbonos alfas (C- $\alpha$ ) de aminoácidos são responsáveis pela flexibilidade de proteínas, possibilitando a interação entre os grupamentos polares que formam a sua estrutura primária permitindo que proteínas alcancem estruturas tridimensionais e suas funções em organismos vivos. Logo, com a variação de pH do meio, alteração da carga líquida dos aminoácidos podem provocar o rompimento de diversas interações que mantêm a estrutura nativa de proteínas, induzindo a desnaturação de proteínas (NELSON; COX, 2015).

As lectinas possuem a capacidade de resistir a variações de pH consideráveis, a exemplo da lectina extraída da recolha de *Fenneropenaeus indicus* - IFL (camarão), que manteve atividade hemaglutinante na faixa de pH de 4 – 10, sendo que a faixa de pH de máxima atividade foi entre 6 e 8 (CHATTERJEE et al., 2017). Na literatura há relatos de lectinas de origem vegetal e animal que apresentam resistência a variações de pH, como por exemplo a lectina extraída da cebola (*Allium cepa*) que manteve sua atividade na faixa de pH entre 2 – 12,0 e a lectina extraída da pele *Andrias davidianus* (espécie de salamandra) que se manteve estável na faixa de pH variante de 3 a 9,0 (PRASANNA et al., 2015. QU et al., 2015).

#### 2.1.4.3 Efeito da temperatura na atividade de lectinas

A temperatura é uma grandeza física que determina o estado físico da matéria e o nível de energia interna em sistemas químicos e biológicos. A quantidade de calor fornecida em um sistema provoca um aumento no grau de agitação das moléculas em função do aumento da energia cinética (ITO, 2004). O aumento da energia cinética favorece as reações químicas, pois a temperatura influencia na constante de velocidade de uma reação química. O aumento da temperatura pode romper as interações fracas que mantêm a estrutura nativa de proteínas, desfazendo assim a estrutura tridimensional de proteínas. Diversas proteínas isoladas de organismo de extremófilos apresentam termoestabilidade em temperaturas acima de 70°C em função da sua rigidez estrutural e algumas modificações estruturais pós-síntese, a exemplo da metilação dos resíduos de lisina (Lys) na sequência primária dessas

proteínas e de mutagênese em regiões específicas, porém não são os fatores determinantes de termoestabilidade das proteínas expressas pela maioria dos hipertermofílicos (SCANDURRA et al., 1998). Pesquisadores de diversas partes do mundo tentam compreender como as proteínas termofílicas são estabilizadas. Estudos indicam que tal estabilização ocorre durante o empacotamento das cadeias hidrofóbicas das extremidades, onde o aumento da estabilidade dessas proteínas é inversamente proporcional a quantidade de centros hidrofóbicos expostos, também foi observado o aumento de forças de Van der Waals na estrutura nativa dessas macromoléculas influencia em sua estabilidade térmica (CHEN et al., 2000).

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

## **2.2 A Importância da Investigação de Produtos Naturais**

As plantas constituem uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos. Os produtos naturais são alvo então de diversas pesquisas pois mostram-se contendo uma grande diversidade em termos de estrutura e de propriedades físico-químicas e biológicas. Apesar do aumento de estudos nessa área, os dados disponíveis revelam que apenas de 15 a 17% das plantas foram estudadas quanto ao seu potencial medicinal (SIMÕES, 2004).

O conhecimento sobre plantas medicinais simboliza muitas vezes, o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. De maneira direta e indireta, esse tipo de cultura medicinal desperta o interesse de pesquisadores em estudos envolvendo áreas multidisciplinares, tais como, botânica, farmacologia e fitoquímica, que enriquecem os conhecimentos sobre a inesgotável fonte medicinal natural (MACIEL et al., 2002).

No contexto histórico, a medicina popular contribui com inúmeras descobertas que devem sempre ser respaldadas pelo conhecimento científico, contribuindo para o uso racional de espécies medicinais e a conscientização quanto a sua toxicidade. Através de diferentes métodos, as plantas são transformadas em medicamentos e ao serem utilizadas como tal, deve-se dar atenção as plantas consideradas tóxicas, ou seja, aquelas que podem provocar a morte ou paralisia de um animal, doenças em crianças, náuseas ou perda de memória em adultos ou qualquer outro efeito nocivo e indesejado. Mesmo estas devem ser estudadas, pois podem conter princípios medicamentosos importantes, devendo determinar sua dose efetiva (GONSALVES, 1997, BARG, 2004).

## **2.3 Espécie Vegetal em Estudo**

### **2.3.1 Gênero *Jatropha***

O Gênero *Jatropha*, está inserido na família Euphorbiaceae. Esta família compreende 290 gêneros e aproximadamente 7500 espécies, distribuídas em todo o mundo, principalmente nas regiões tropicais. Os maiores centros de dispersão encontram-se nas Américas e na África. No Brasil, é distribuída em todas as regiões, exceto nos estados de Roraima e Espírito Santo, como mostrado na figura 8. (JOLY, 1985; LEAL e AGRA, 2005).

São plantas de hábito variado, existindo na forma de ervas, subarbustos, árvores e trepadeiras. As espécies podem ser monóicas (planta que produzem flores masculinos e femininos ou seja hemafródita) ou dióicas (plantas que produzem flores masculinos ou femininos em sua estrutura) incluindo árvores, arbustos e ervas. Sua importância econômica inclui uma gama diversificada de utilidades tais como, seu uso medicinal (cicatrizante, purgante, moluscicida, analgésico, antitussígeno, antimicrobiano e anticoagulante), ornamental e produção de cercas-vivas (JOLY, 1985; LEAL e AGRA, 2005).

Figura 8 – Distribuição geográfica do gênero *Jatropha* no Brasil



Fonte: disponível em: <http://servicos.jbrj.gov.br/flora/search/Jatropha>

Espécies do gênero *Jatropha* são conhecidas por serem muito tóxicas e irritantes e a atividade purgativa do óleo de suas sementes lembra a atividade semelhante mostrada por ésteres diterpenos presentes no óleo de sementes de muitas outras espécies de Euphorbiaceae. Ésteres diterpenos irritantes foram extraídos, isolados e caracterizados do óleo das sementes de quatro espécies de *Jatropha*- *J.podagrica*, *J. multifida*, *J. curcas* e *J. gossypifolia* (ADOLF, OPFERKUCH, & HECKER, 1984).

Nas espécies deste gênero (Figura 9) constatou-se a presença de ricina, uma toxalbumina que causa vômitos, diarreia, desidratação, choque e danos nos rins e fígado, responsável por casos de intoxicação relatados. (LEVIN, et al, 2000). O óleo de sementes de *Jatropha curcas* L., *J. mollissima* L., e *J. podagrica* Hook foram avaliados, os quais apresentaram em sua composição ácido palmítico, ácido oléico e ácido linoléico. As sementes de *J. podagrica* apresentaram o mais elevado teor de óleo, 46% (TEIXEIRA, 1987). As proteínas de *Jatropha* possuem propriedades nutricionais e biomédicas interessantes. O alto conteúdo de proteínas com digestibilidade e a composição de aminoácidos destas proteínas fazem com que haja

a possibilidade de utilizá-las como fonte para incorporação em dietas de ruminantes e animais monogástricos, incluindo peixes. Uma particular proteína bioativa, a curcina, tem potencial para ser utilizada com sucesso como imunocombinado na quimioterapia. Muitos peptídeos cíclicos de sementes de *Jatropha* possuem importância clínica e mostraram potencial para uso farmacêutico (DEVAPPA et al, 2010).

Figura 9 – Espécies do gênero *Jatropha*



*J. gossypifolia*

*J. podagrica*

*J. multifida*

Fonte: LEAL e AGRA, 2005.

### 2.3.2 *Jatropha multifida* L.

A *Jatropha multifida* L. (MALPIGHIALES: EUPHORBIACEAE) é conhecida pelo sinônimo *Adenoropium multifidum* ou pelos nomes populares Planta-coral, Coral, Flor-de-coral, Flor-de-sangue, Bálsamo, Merthiolate (SMITH; DOWNS; KLEIN; 1998).

As flores são consideradas pequenas, de cor vermelho-brilhantes, e agrupadas em cachos; a folha tem de 10 a 20 cm de largura e divididas em segmentos ou lóbulos estreitos, afilados, longos e podem ter as extremidades lisas ou dentadas; os frutos são amarelos e normalmente contém três sementes. Apresenta seiva abundante leitosa ou incolor e o contato com ela pode causar dermatite (BUCH, ARANTES, CAMPELO, 2008).

Foi relatada sua presença no noroeste do estado do Paraná, Brasil, onde moradores das cidades de Jesuítas e Bandeirantes utilizam a planta como cicatrizante de feridas (BUCH, ARANTES, CAMPELO, 2008). Suas folhas podem ser vistas na figura 10.

Figura 10 - Folhas de *Jatropha multifida*



Fonte: autora, 2019.

Em um estudo realizado com extrato de raiz da *J. multifida* foi demonstrada a inibição de infecções causadas por *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* em concentração de 200  $\mu\text{g}/\text{disco}$  (AIYELAAGBE, 2001) e também foram encontradas substâncias imunomoduladoras e tóxicas na composição de seu exudato e sementes, respectivamente (SAMPLIPTO; WILLEM; RUDI, 1989, LEVIN et al., 2000). A seiva incolor proveniente da folha é aplicada diretamente sobre a lesão e em alguns casos é ingerida para tratamento de úlceras gastrointestinais. (BUCH, ARANTES, CAMPELO, 2008).

A presença de alcalóides, flavonóides, taninos esteróides e fenóis foram detectados em ambos os extratos brutos de metanol e acetato de etila através de cromatografia em camada delgada (RAMPADARATH et al., 2014).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

- Identificar, purificar e caracterizar uma lectina das folhas de *Jatropha multifida* (merthiolate).

#### 3.2 Objetivos específicos

- Extrair proteínas de folhas de *J. multifida*;
- Avaliar qual o melhor meio de extração entre as soluções de Acetato de sódio 50 mM pH 5,0, NaCl 0,15 M, Tris HCl 50 mM pH 8,0 e fosfato de sódio 50 mM pH 7,0.
- Avaliar a presença de lectina nos extratos obtidos de folhas de *J. multifida*;
- Isolar a lectina de folhas de *J. multifida*;
- Determinar a massa molecular aparente da lectina por meio de eletroforese em gel por poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE);
- Caracterizar quanto ao efeito de carboidratos, glicoproteína, íons, pH e temperatura na atividade hemaglutinante da lectina de *Jatropha multifida*.

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1 Obtenção do material**

No presente estudo foram utilizadas as folhas da *Jatropha multifida*, popularmente conhecida como merthiolate, coletadas no campus CECA, Centro de Ciências Agrárias – UFAL, no município de Rio Largo, Alagoas. As folhas foram submetidas à secagem a 30 °C, por um período de 15 dias, trituradas em liquidificador industrial até obtenção do pó e acondicionado no freezer a – 20 °C.

### **4.2 Preparo do extrato bruto**

Para a extração das proteínas presentes no pó das folhas de *J. multifida*, foram testadas diferentes soluções extratoras na proporção de 1:10 (m/v): Tris-HCl 50 mM pH 8,0; tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,2, NaCl 0,15 M e acetato de sódio 50 mM pH 5,0 submetidos a agitação constante (600 rpm), durante 16 horas, à 4 °C. Após esse tempo, os extratos foram filtrados em papel de filtro e armazenados em freezer à -20 °C.

### **4.3 Precipitações do extrato bruto com sulfato de amônio**

O fracionamento, utilizando o extrato de Tris-HCl 50mM pH 8,0, foi realizado com frações crescentes de sulfato de amônio em cinco ciclo de precipitação em concentração diferentes (0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80% e 80-100%). A cada adição de sal a amostra ocorreu em agitação constante em banho de gelo. Após cada uma das etapas de adição de sal a amostra permaneceu a 4 °C durante 1 hora seguida de centrifugação a 15.000 xg por 15 minutos a 4 °C em uma centrífuga refrigerada (Centrifuges Hitachi, série RXII). Ao final de cada centrifugação foi formado um precipitado e um sobrenadante, no qual o precipitado foi ressuspenso em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0, enquanto o sobrenadante foi retirado e usado para os novos ciclos de precipitação.

#### 4.4 Cromatografia em matriz de quitina

A fração de maior atividade específica advinda do fracionamento salino (Precipitado 0-20%) foi aplicada (600  $\mu$ L) em uma cromatografia de afinidade (7,5 cm x 1,5 cm) em matriz de quitina (Figura 11) equilibrada com Tris-HCl 50 mM pH 8,0 (40 mL) seguida por 30 mL de Tris-HCl 50 mM pH 8,0 contendo NaCl 50 mM, eluída com ácido acético 0,5 M (30 mL) e, por fim, 30 mL de ácido acético 1,0 M. As frações foram coletadas em alíquotas de 2 mL em 65 tubos falcon e a leitura de absorbância foi realizada em espectrofotômetro (Varian Cary 50) a 280 nm. Ao final, os picos proteicos ativos foram dialisados utilizando membranas semipermeáveis (poros de 12 kDa e diâmetro de 2,5 cm) contra Tris-HCl 50 mM pH 8,0 por 6 horas para a remoção do ácido acético e avaliadas quanto à atividade hemaglutinante (AH) e dosagem proteica.

Figura 11 - Coluna Cromatográfica de Quitina, com amostra de *Jatropha multifida*.



Fonte: autora, 2019.

#### 4.5 Teste de hemaglutinação

O ensaio de atividade hemaglutinante (AH) foi realizado em placas de microtitulação, de acordo com a metodologia descrita por Paiva e Coelho (1992). Alíquota (50  $\mu$ L) da amostra foi diluída serialmente em NaCl 0,15M antes da adição de 50  $\mu$ L de suspensão (2,5% v/v) de eritrócitos de coelho tratados com glutaraldeído.

A AH (título<sup>-1</sup>) foi expressa como o inverso da maior diluição da amostra que promove hemaglutinação (Figura 2). A atividade específica (AHE) foi definida pela razão entre o título e a concentração proteica (mg/mL). A coleta de eritrócitos foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação com animais (processo 23076.033782/2015-70).

#### **4.6 Determinação da Concentração de Proteínas**

As diferentes amostras obtidas durante as etapas de extração, precipitação e cromatografias foram quantificadas pelo método de Bradford (1976), usando albumina de soro bovino como padrão (faixa de concentração de 1 a 0,01 mg/mL). Para isso foram tomados 10 µL das amostras diluídas (1: 10), adicionados 190 µL de reagente de Bradford. Posteriormente, as amostras foram incubadas por 5 minutos e a absorbância foi determinada a 595 nm.

#### **4.7 Eletroforese SDS-PAGE**

Com o intuito de avaliar o grau de pureza proteica, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 10%, em presença de dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE), de acordo com a metodologia descrita por Laemmli (1970). Os géis foram preparados sob condições não redutoras e redutora em presença de ditioneitol (DTT). A coloração foi realizada com 0,4 g de nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>) diluído em 2 mL de água deionizada acompanhada da adição da solução B (126 µL de NaOH 10 M + 1,250 mL de NH<sub>4</sub>OH + 46,5 mL de água), permanecendo por 15 minutos. Em seguida, o gel foi incubado com água e a solução C ( 25 µL de ácido cítrico + 25 µL de formaldeído + 50 mL de água deionizada). Padrões de massa molecular (12–225 kDa, Sigma) também foram submetidos à eletroforese para a determinação da massa molecular aparente.

#### **4.8 Dosagem de fenóis**

O conteúdo de fenol do extrato bruto, fracionamento e da lectina das folhas de *J. multifida* foi determinado usando o método de Folin-Ciocalteu com base na redução de reagente ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico em meio alcalino (MORAIS et al., 1999). Resumidamente, 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu diluído 1:10 em água

destilada e 2 mL de carbonato de sódio a 75 g/L foram adicionados a 0,5 mL das amostras e as soluções foram incubadas a 50 °C por 5 minutos. Após resfriamento durante 30 minutos, 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<sup>-1</sup>).

#### **4.9 Teste de inibição da AH por carboidratos e glicoproteína**

A inibição da AH foi avaliada utilizando soluções de açúcares na concentração de 0,2 M. Os açúcares utilizados neste procedimento foram: D – Galactose, D – Glicose, D – Frutose, D – Arabinose, D – Lactose, Sacarose, N-acetilglicosamina e 1 mg/mL da glicoproteína caseína. A metodologia e a escolha dos açúcares deram-se de acordo com Napoleão et al., (2011), uma vez que são os carboidratos frequentemente escolhidos nessa etapa investigatória.

Alíquotas de 50 µL da lectina diluída serialmente foram submetidas à incubação inicial em solução de carboidrato dissolvidos em NaCl 0,15 M durante 15 minutos. Em seguida, foram adicionados 50 µL de suspensão de eritrócitos (2,5 % v/v) nos poços de microtitulação e incubadas por 45 minutos.

#### **4.10 Avaliação do efeito da temperatura e do pH na AH**

O teste de estabilidade térmica foi feito mantendo alíquotas de 200 µL da amostra em tubos de 1,5 mL, a temperaturas que variaram gradativamente de 30 a 100 °C, em banho maria com água, durante 60 minutos. Após esse período as amostras foram centrifugadas (15.000 g, 5 minutos, 25°C) para remover precipitados, caso fosse formado, e em seguida foi realizado a atividade hemaglutinante do sobrenadante e quantificado em razão do título.

O ensaio para avaliar a estabilidade da lectina purificada das folhas de *J. multifida* em diferentes valores de pH foi realizado com alíquotas de 1000 µL que foram colocadas em membranas semipermeáveis (poros de 12 kDa e diâmetro de 2,5 cm) para dialisar por 4 horas, com trocas a cada hora, contra vários tampões com pH variando de 3 a 12: Tampão Citrato-fosfato 100 mM (pH 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 a 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 AH. Todos os ensaios foram feitos em triplicata.

#### **4.11 Avaliação do efeito do EDTA e de íons divalentes sobre AH**

A influência de cátions divalentes ( $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ ) e do EDTA (agente quelante) para a atividade hemaglutinante foi determinada conforme adaptações do método de PAJIC et al. (2002). Alíquotas de 1000  $\mu\text{L}$  da proteína foram colocadas em membranas semipermeáveis com poros de 12 kDa, apresentando diâmetro de 2,5 cm, e dialisadas por 4 horas, com troca a cada hora contra 5 mM de EDTA e as soluções de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  a 10 mM. Alíquotas foram retiradas e avaliadas a atividade hemaglutinante.

### **5. RESULTADOS E DISCUSSÕES**

#### **5.1 Extrato Bruto**

Na tentativa de identificar a presença de lectina nas folhas de *J. multifida* e avaliar qual o melhor meio para a extração, observou-se que a melhor solução de extração proteica foi o tampão Tris – HCl, pois o extrato bruto preparado com esse tampão apresentou uma maior atividade hemaglutinante específica (162,44), sendo portanto escolhido para dar prosseguimento à purificação (Tabela 3).

Outras lectinas também foram extraídas utilizando o tampão Tris – HCl 50 mM pH 8,0, como a GaBL, isolada da casca de *G. americana* (COSTA et al., 2018) e a TBFL, presente na fração de sementes de *P. acutifolius* (FERRIZ – MARTÍNEZ et al., 2015).

Tabela 3 – Teor de proteínas, atividade hemaglutinante (AH) e atividade hemaglutinante específica (AHE) de extratos de folhas de *J. multifida* em diferentes soluções.

Soluções de extração	Proteína solúvel (mg/mL)	AH (título)	AHE
Acetato de sódio 50 mM pH 5,0	2,130	256	120,19
NaCl 0,15M	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	92,08

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

Fonte: elaborado pela autora, 2019.

## 5.2 Fracionamento Salino

Ao realizar o fracionamento proteico com intuito de purificação da lectina, a única fração que apresentou maior atividade hemaglutinante específica – AHE foi a fração 20%, expressando AHE igual a 556,98, maior que do extrato (Tabela 3). Esse valor maior indica a efetividade do método em concentrar em menor volume uma maior quantidade da proteína de interesse.

Podemos constatar diante dos resultados expressos que o fracionamento salino com sulfato de amônio é promissor, visto que foi possível obter com esse método, uma pré-purificação e a concentração da lectina em única fração. Outros trabalhos como Hiremath et al. (2020) e Costa (2018), também obtiveram êxito no fracionamento salino de lectinas com rendimento de 60% e 50%, respectivamente, nessa etapa. O rendimento obtido nessa etapa no presente estudo foi de 40%.

Extrato e a F 20% apresentaram conteúdo de fenol de 8,139 µg/mL e 7,709 µg/mL respectivamente. Apesar do conteúdo de fenóis também continuar elevado no fracionamento, após o procedimento cromatográfico que ocorreu em seguida houve eliminação total desses metabólitos.

Tabela 4 – Fracionamento do extrato bruto com Sulfato de Amônio - AHE: Atividade Hemaglutinante Específica.

<b>Amostras</b>	<b>Proteína (mg/mL)</b>	<b>Proteínas Totais (mg)</b>	<b>AHE</b>
Extrato	3,152	31,520	162,44
F1 – 0-20% (Precipitado)	3,677	3,677	556,98
F 20% (Sobrenadante)	0,714	6,926	-
F2 – 20-40% (Precipitado)	3,668	3,668	-
F 40% (Sobrenadante)	0,631	6,121	-
F3 – 40-60% (Precipitado)	4,362	4,362	-
F 60% (Sobrenadante)	0,260	2,600	-
F4 – 60-80% (Precipitado)	0,521	0,521	-
F 80% (Sobrenadante)	0,082	0,820	-

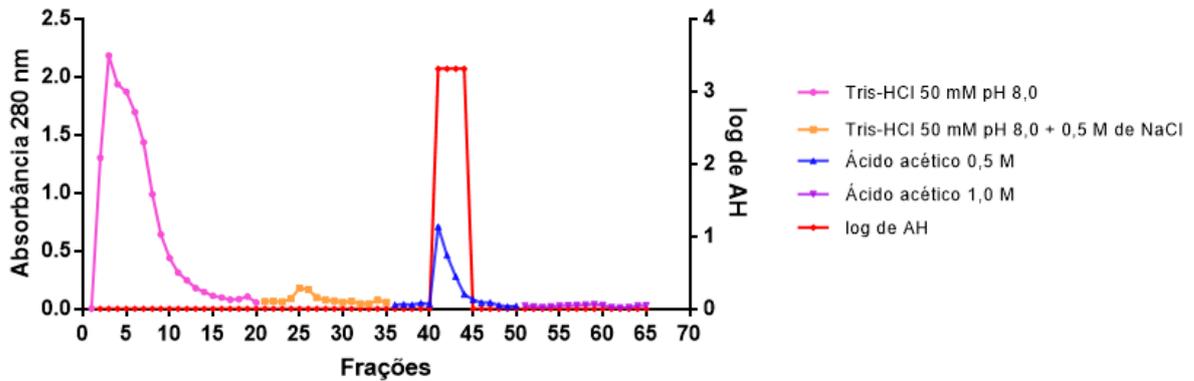
Fonte: elaborado pela autora, 2019.

### 5.3 Cromatografia em coluna de quitina

A amostra de lectina (F0-20%), quando submetida à cromatografia em coluna de quitina (Figura 12), apresentou um único pico proteico ativo (AHE de 10.240) eluído com ácido acético 0,5 M, o que indica a eficiência da técnica cromatográfica empregada. Os picos eluídos anteriormente ao que foi obtido em ácido acético 0,5 M, com o tampão Tris-HCl na ausência e presença de sal, eram compostos não lectínicos, assim confirmando que a lectina teria sido adsorvida na matriz.

Outras lectinas de origem vegetal foram isoladas usando apenas um passo cromatográfico, por cromatografia de afinidade com matriz de quitina, a exemplos das lectinas: PeRoL, isolada da raiz de *Portulaca elatior*, PgTeL, extraída da sarcotesta das sementes de *Punica granatum* e SteLL, isolada de folhas de *Schinus terebinthifolius* (SILVA et al., 2019; SILVA et al., 2016; GOMES et al., 2013).

Figura 12 - Perfil cromatográfico da F 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 absorvância e AH.



Fonte: elaborado pela autora, 2019.

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.

Tabela 5: Purificação da lectina das folhas de *J. multifida*.

Amostra	Volume (mL)	Proteínas (mg/mL)	Proteína total (mg)	AH	AHE	Fator de purificação	Rendimento (%)
EB	50	3,152	157,600	512	162,44	1	100
F 20%	5	3,677	18,385	2048	556,98	3,430	40
JamuLL	50	0,05	2,500	512	10.240	63,039	100

AHE: atividade hemaglutinante específica – relação entre AH da etapa e proteínas (mg/mL); Fator de purificação: relação entre AHE da etapa e a AHE do extrato; Rendimento: relação entre a AH total da etapa e a AH total do extrato.

Fonte: elaborado pela autora, 2020.

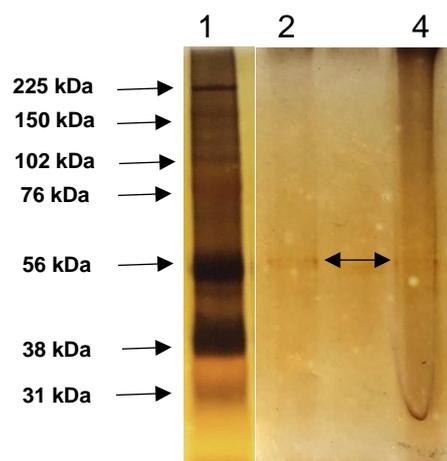
Analisando a tabela 5, podemos verificar que a partir de 5 g do pó de folhas secas foi possível extrair 2,5 mg de JamuLL com rendimento de 100%. Além disso, ainda observando a tabela, é possível observar um aumento na atividade específica da lectina desde o extrato até o material purificado, indicando efetividade do método de isolamento. Houve também elevação no rendimento obtido com a cromatografia, quando comparado ao rendimento da fração, e eliminação total dos fenóis. Segundo Jakobek (2015), compostos como os taninos são abundantes em tecidos vegetais e podem formar complexos com proteínas, estes solúveis ou insolúveis, interferindo em sua atividade biológica e resulta em um falso positivo. Com essa eliminação dos fenóis, a lectina pode exercer a atividade hemaglutinante sem interferências.

As frações do pico proteico ativo foram reunidas e dialisadas contra o tampão de extração por 6 horas e denominada por JamuLL (lectina das folhas de *Jatropha multifida*).

#### 5.4 Eletroforese SDS-PAGE

A lectina ao ser submetida a eletroforese em condições desnaturantes e não redutora apresenta uma única banda de 56 kDa, canaleta 2 (Figura 13), indicando a purificação da proteína.

Figura 13 - Eletroforese com gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 10 % coradas com nitrato de prata – 1: marcador de massa molecular; 2: Lectina em condições desnaturante e não redutora; 4: Lectina em condição desnaturante e redutora com ditiotreitol.



Fonte: autora, 2020.

Ao submeter a amostra a eletroforese em condições desnaturantes e redutoras (ditiotreitól - DTT), caneleira 4 (Figura 13), observou-se uma única banda na mesma altura da detectada em condições não-redutoras, indicando que a lectina não apresenta subunidades unidas por ligação dissulfeto.

Outras lectinas apresentaram massas moleculares semelhantes como a PDL (lectina de *Parkia discolor*), que apresentou uma única banda de 58 kDa, e a SejaBL (lectina de *Sebastiania jacobinensis*), com massa aparente de 52 kDa na ausência de redutor e duas subunidades com a mesma massa molecular de 24 kDa e outro fragmento de menos de 6 kDa (CAVADA et al., 2000; VAZ et al., 2010).

### **5.5. Teste de inibição da AH por carboidratos e glicoproteína**

A fim de caracterizar a lectina de folhas de *J. multifida* quanto a especificidade, a AH de JamuLL foi avaliada frente alguns carboidratos e glicoproteína (tabela 6). 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).

A AH de JamuLL foi inibida parcialmente apenas pela glicoproteína caseína (Tabela 6), o que indica que os locais de ligação a carboidratos desta lectina interagem melhor com os oligossacarídeos da glicoproteína do que com monossacarídeos ou dissacarídeos. Lectinas com locais de ligação de carboidratos de um tamanho estendido podem ligar preferencialmente a glicoproteínas, de modo que as porções de açúcar dos glicoconjugados se organizem em uma geometria mais favorável para interação lectina-açúcar, enquanto mono e dissacarídeos não se encaixam bem no local de ligação, resultando em um baixo afinidade da lectina para açúcares simples (SILVA et al., 2016). Comportamento semelhante foi obtido por Silva e colaboradores (2016) que foi inibida por caseína e ovalbumina, mas não pelos monossacarídeos testados e mesmo sendo isolada utilizando matriz de quitina sua atividade não foi inibida por N-acetilglicosamina.

Tabela 6 - Teste de inibição da atividade hemaglutinante de JamuLL por carboidratos e glicoproteína.

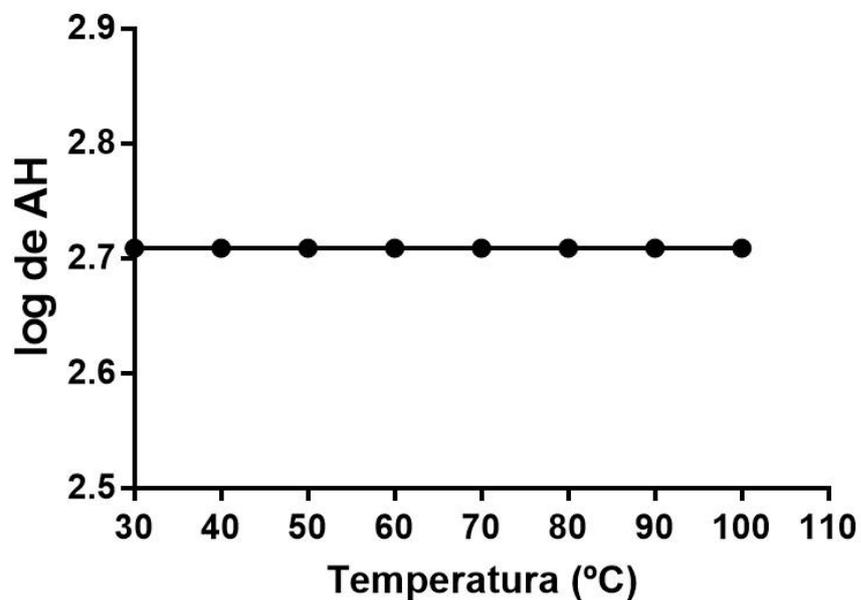
Ligante	AH - JamuLL
Controle Negativo	512
Lactose	512
Sacarose	512
Frutose	512
Galactose	512
Arabinose	512
Glicose	512
N-Acetilglicosamina	512
Caseína	8

Fonte: elaborado pela autora, 2020

### 5.6. Efeito da temperatura e do pH na AH

JamuLL foi aquecida por 60 minutos em faixa de temperatura que variou de 30 a 100 °C e manteve sua AH inalterada em todo o intervalo, como mostra a figura 14, demonstrando alta termoestabilidade.

Figura 14 - Efeito da temperatura na AH.



Fonte: elaborado pela autora, 2020.

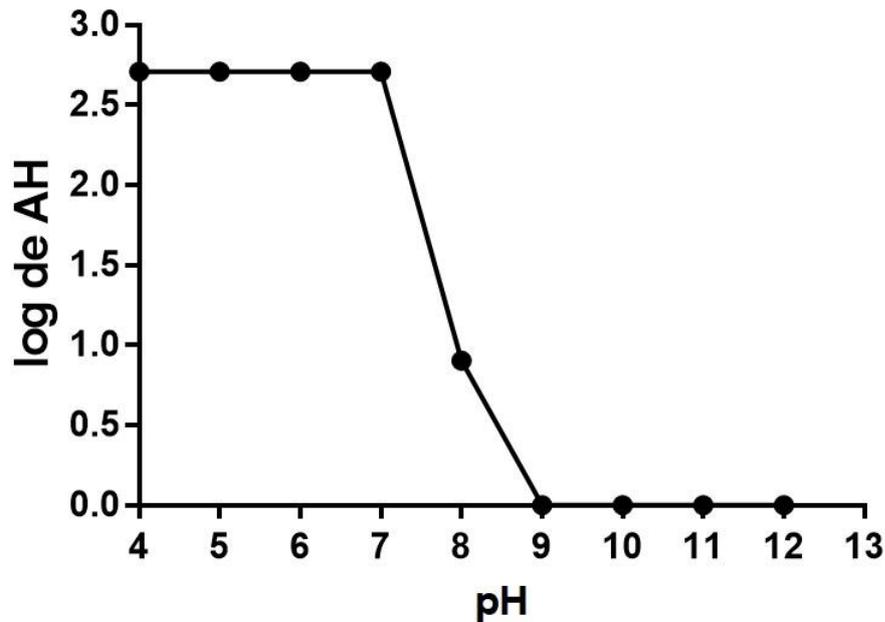
Essa resistência a altas temperaturas é comumente relatada em lectinas de plantas. Por exemplo, a lectina de *Calliandra surinamensis* manteve a atividade após aquecimento em todas as temperaturas testadas (30 – 100 °C) (PROCÓPIO et al., 2017). Outra lectina termoestável em altas temperaturas foi a de sementes de *Apuleia leiocarpa* (ApulSL), cuja atividade hemaglutinante foi preservada após aquecimento a 100 °C por 2 horas (CARVALHO et al., 2015). No entanto, algumas lectinas não são estáveis em altas temperaturas. Por exemplo, a lectina de sementes de *Parkia panurensis* manteve alta atividade hemaglutinante até uma temperatura de 40 °C após incubação por 1 hora. No entanto, perdeu metade de sua atividade a 50 °C e, em seguida, perdeu completamente sua atividade quando expostas a temperaturas iguais ou superiores a 70 °C (CAVADA et al., 2020).

A termoestabilidade de uma proteína pode variar de acordo com o grau de dependência da estrutura da proteína em ligações de hidrogênio, presença de glicosilação, bem como complexidade de sua estrutura terciária (PROCÓPIO et al., 2017).

A atividade de JamuLL foi maior na faixa de pH 4 a 7 (512), diminuindo consideravelmente em pH 8 (8) e sendo inativa em pH igual ou maior a 9, revelando que a lectina é mais ativa em pH ácido (figura 15). A PeRoL demonstrou um comportamento semelhante de estabilidade de pH, sendo sua AH estável em faixa de pH 4 a 8 e perdendo sua atividade total em pH alcalinos (pH  $\geq$  9). Outra lectina de natureza ácida é a Ddel que apresentou maior atividade na faixa de pH 5 – 6 e diminuindo consideravelmente em faixa de pH 9 – 10. Por outro lado, a lectina da semente de *Platypodium elegans* apresentou maiores valores de AH em pH básico (pH 9 – 10) (DA SILVA et al., 2019; TORRES et al. 2019; ARARIPE et al. 2017).

A atividade da molécula pode ser afetada por mudanças em qualquer nível da estrutura da proteína. Em sua conformação biologicamente ativa as cadeias de proteínas se dobram espontaneamente, na maioria das vezes com os resíduos hidrofóbicos no interior da proteína e os resíduos carregados na superfície. Quando um polipeptídeo perde seu nível de estrutura nativa, perdendo a atividade biológica, ocorre a desnaturação da proteína. A estabilidade da estrutura nativa é facilmente perturbada mesmo por mudanças ambientais sutis na tensão de cisalhamento, temperatura, pH, força iônica ou uma combinação dos mesmos (TORRES et al. 2019).

Figura 15 - Efeito do pH na AH.



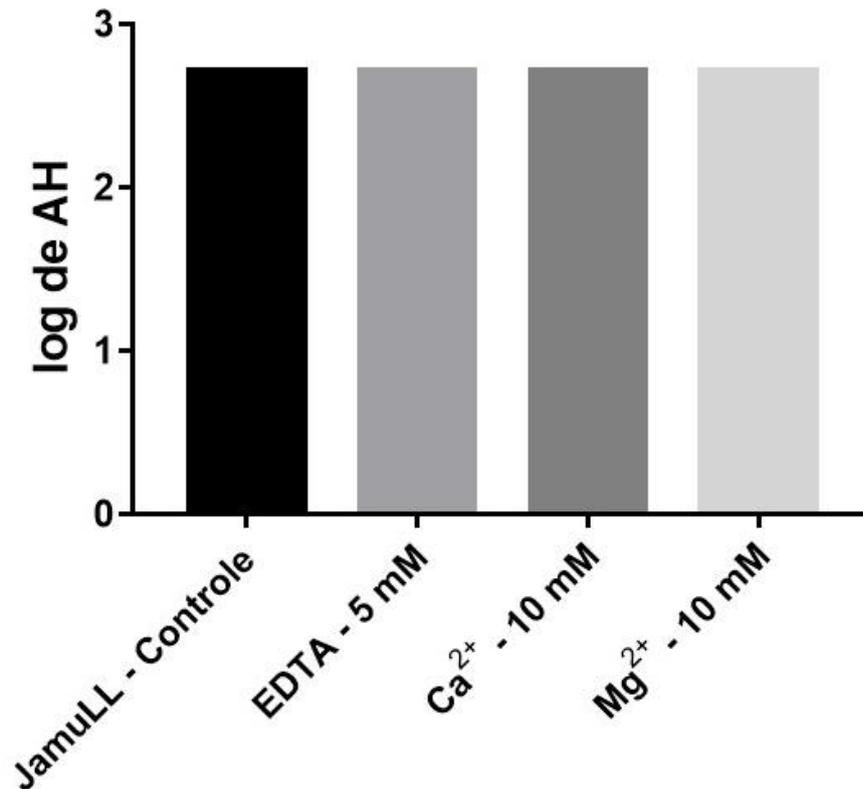
Fonte: elaborado pela autora, 2020.

JamuLL mostrou-se ativa em temperaturas e pH próximos aos encontrados no corpo humano (37 °C, pH 6,5-7,5), que é desejável para uso potencial no tratamento de doenças infecciosas humanas (GOMES et al., 2013).

### 5.7 Efeito do EDTA e íons divalentes na AH

EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) é um quelante de íon metálico que influencia as características de estabilização e ligação de uma proteína, inibindo a atividade da protease e outras proteínas dependentes de íons, bem como removendo os cátions divalentes interferentes. A eliminação de íons metálicos ligados a proteínas também pode influenciar a estabilidade e a atividade junto com as características de ligação (SINGH et al., 2020). No entanto, a incubação de JamuLL com EDTA não alterou sua AH (figura 16), indicando que a lectina não é dependente de íons metálicos, bem como de EDTA. A atividade hemaglutinante de lectinas de *Machaerium acutifolium* e *Euphorbia antiquorum* permaneceram inalteradas pelo EDTA (SANTOS et al., 2019; SIRITAPETAWEET et al., 2018). Em contrapartida, a AHL perdeu completamente sua atividade ao ser tratada com EDTA (ZENG et al., 2019).

Figura 16 - Efeito do EDTA e de íons divalentes na AH.



Fonte: elaborado pela autora, 2020.

Considerando que muitas lectinas são dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$  e outros íons divalentes, a AH de JamuLL foi avaliada em presença de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ . No entanto, não foi observada alteração da AH na presença de íons de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ . Isso indica que os íons metálicos não são necessários para a ligação e estabilização da JamuLL. Lectina independente de íons metálicos foi relatada por Siritapetawee e colaboradores (2018), EanH mostrou que a atividade era a mesma na presença e ausência de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$ . Já a EMtL6 apresenta dependência por  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$  (OSMAN et al., 2016).

Segundo Singh e colaboradores (2020), a necessidade de íons metálicos desempenha um papel vital na estabilidade estrutural e nas especificidades do açúcar das lectinas. Assim, os íons metálicos resultam 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 dos íons metálicos ligados à lectina pode influenciar a capacidade de ligação das lectinas ao açúcar. A desmetalização da lectina pode influenciar sua alça de ligação a íons, o que leva a grandes mudanças

conformacionais, coisa que não ocorreu com a JamuLL. Isso mostra que a lectina pode apresentar atividade em diferentes condições do meio - com ou sem metais, em diferentes temperaturas e numa faixa considerável de pH – demonstrando elevado potencial biotecnológico.

## 6. CONCLUSÕES

- ✓ Nesse estudo foi possível detectar, isolar e caracterizar uma lectina a partir das folhas de *Jatropha multifida*, utilizando tampão Tris-HCl 50 mM como melhor extrator e um único procedimento cromatográfico através de coluna de quitina.
- ✓ O isolamento da JamuLL foi confirmado através de eletroforese SDS-PAGE em condições redutoras e não redutoras sendo possível verificar que é uma proteína de massa molecular aparente de 56 kDa;
- ✓ Lectina das folhas de *J. multifida* apresentou especificidade de ligação à caseína e foi igualmente estável no intervalo de temperatura de 30 °C a 100 °C, e demonstrou alta atividade em faixa de pH 4 a 7 e caráter ácido-neutro, perdendo sua atividade frente a soluções alcalinas;
- ✓ Após o tratamento com EDTA, íon cálcio e íon magnésio, a atividade hemaglutinante de JamuLL foi inalterada mostrando ser uma biomolécula de elevado potencial biotecnológico.

## REFERÊNCIAS

ADOLF, W.; OPFERKUCH, H. J.; HECKER, E. Irritant Phorbol Derivatives from four *Jatropha* species. **Phytochemistry**. 23 (1), pp. 129-132. 1984.

AGBAN, Amégninou et al. Evaluation du potentiel antimicrobien et de la toxicité des extraits de *Jatropha multifida* Linn, (Euphorbiaceae). *Journal of Applied Biosciences*, v. 151, p. 15550-15558.

AIYELAAGBE, O. O. Antibacterial activity of *Jatropha multifida* roots. **Fitoterapia**, v. 72, p. 544-546, 2001.

ALBORÉS, S.; MORA, P.; BUSTAMANTE, M.J.; CERDEIRAS, M.P.; FRANCO FRAGUAS, L. Purification and applications of a lectin from the mushroom *Gymnopilus spectabilis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, pp. 2081-2090, 2014.

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.

BARG, G.B. **Plantas Tóxicas. Curso de Fitoterapia**, IBGE, p. 19, 2004.

BAYER, H.; EY, N.; WATTENBERG, A.; VOSS, C.; BERGER, M. R. Purification and characterization of riproximin from *Ximenia americana* fruit kernels. **Protein Expression and Purification**, v. 82, p. 97-105, 2012

BKHAIRIA, I. 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.

BRADBERRY, S. Ricin and Abrin. **Medicine**, v. 35, p. 576-577, 2007.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities for proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, San Diego/ USA, 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. *Pesquisa-Dermatologia. Ver. Bras. Farm.*, 89(2): p.142-145, 2008.

CAGLIARI, R., KREMER, F. S., PINTO, L. DA S. Bauhinia lectins: Biochemical properties and biotechnological applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 119, p. 811–820, 2018.

CAMPBELL, M. K.; FARRELL, S. O. **Bioquímica**. São Paulo: Cengage Learning, 2016.

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

CARVALHO, E. V. M. M., BEZERRA, R. F., BEZERRA, R. S., ARAÚJO, J. M. de, SANTOS, A. J. G., CORREIA, M. T. S., COELHO, L. C. B. B. Detection of the first lectin with antimicrobial activity present in serum of the Amazonian fish tambaqui *Colossoma macropomum*. **Fisheries Science**, v. 79, p. 879-887, 2012.

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.

CASTANHEIRA, L. et al. Insights into anti-parasitism induced by a C-type lectin from *Bothrops pauloensis* venom on *Toxoplasma gondii*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 74, p. 568–574, 2015.

CAVADA, Benildo S. et al. Purification, chemical, and immunochemical properties of a new lectin from Mimosoideae (*Parkia discolor*). 2000.

CAVADA, B. S.; MORENO, F.B.; DA ROCHA, B. A.; DE AZEVEDO, W. F. JR.; CASTELLÓN, R. E.; GOERSCH, G. V.; NAGANO, C. S.; DE SOUZA E. P.; NASCIMENTO, K. S.; RADIS-BAPTISTA, G.; DELATORRE, P.; LEROY, Y.; TOYAMA, M. H.; PINTO, V. P.; SAMPAIO, A. H.; BARETTINO, D.; DEBRAY, H.; CALVETE, J. J.; SANZ, L. cDNA cloning and 1.75 Å crystal structure determination of PPL2, an endochitinase and N-acetylglucosamine-binding hemagglutinin from *Parkia platycephala* seeds. **The FEBS journal**, v. 273, n. 17, p. 3962-3974, 2006.

CAVADA, B. S.; BARI, A. U.; PINTO JUNIOR, V. R.; LOSSIO, C. F.; SILVA, M. T. L.; SOUZA, L. A. G.; OLIVEIRA, M. V.; SOUZA FILHO, C. H. D.; CORREIA, S. E. G.; VITAL, A. P. M. S.; LIMA, L. D.; OSTERNE, V. J. S.; NASCIMENTO, K. S. Purification and partial characterization of a new lectin from *Parkia panurensis* Benth. ex H. C. Hopkins seeds (Leguminosae family; Mimosoideae subfamily) and evaluation of its biological effects. **International journal of biological Macromolecules**, 2020.

CAVADA, Benildo Sousa et al. Comprehensive review on Caesalpinioideae lectins: From purification to biological activities. **International journal of biological macromolecules**, 2020.

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

CHAVES, Renata Pinheiro et al. Structural characterization of two isolectins from the marine red alga *Solieria filiformis* (Kützing) PW Gabrielson and their anticancer effect on MCF-7 breast cancer cells. **International journal of biological macromolecules**, v. 107, p. 1320-1329, 2018.

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

CHIKALOVETS, I. V. et al. A lectin with antifungal activity from the mussel *Crenomytilus grayanus*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 42(2), p. 503–507, 2015.

CORIOLOANO, M. C.; BRITO, J. S.; PATRIOTA, L. L. S.; SOARES, A. K. A.; LORENA, V. M. B.; PAIVA, P. M. G.; NAPOLEÃO, T. H.; COELHO, L. C. B. B.; MELO, C. M. L.; Immunomodulatory effects of the water-soluble lectin from *Moringa oleifera* seeds (WSMoL) on human peripheral blood mononuclear cells (PBMC). **Protein Peptide Lett.**, 25 (2018), pp. 295-301.

CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G. Lectins, carbohydrate recognition molecules: are they toxic In Recent **Trends in Toxicology**; Siddique, Y. H., Ed.; Transworld Research Network: Kerala, India; Vol. 37, pp 47-59. 2008.

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

COSTA, R. B. C.; CAMPANA, P. T.; CHAMBERGO, F. S.; NAPOLEÃO, T. H.; PAIVA, P. M. G.; PEREIRA, H. J. V.; OLIVA, M. L. V.; GOMES, F. S. Purification and characterization of a lectin with refolding ability from *Genipa americana* bark. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 119 P. 517–523, 2018.

DANGUY, A. et al. Applications of lectins and neoglycoconjugates in histology and pathology. **Acta Anatomica**, v. 161, p. 206-218, 1998.

DA SILVA, José Dayvid Ferreira 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, 2019.

DEVAPPA, R. K.; MAKKAR, H. P.; BECKER, K. Nutritional, biochemical, and pharmaceutical potential of proteins and peptides from *Jatropha*: **Review. J Agric Food Chem** , 58 n. 11, pp. 6543-6555. 2010.

ENDO, T. Fractionation of glycoprotein-derived oligosaccharides by affinity chromatography using immobilized lectin columns. **Journal of Chromatography A**, v.720, p. 251-261, 1996.

FALODUN, A., IMIEJE, V., ERHARUYI, O., JOYA, A., LANGERC, P., JACOB, M., KHAND, S., ABALDRYB, M., HAMANN, M. Isolation of antileishmanial, antimalarial and antimicrobial metabolites from *Jatropha multifida*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, 4, 374–378, 2014.

FERNANDES, A. V.; RAMOS, M. V.; GONÇALVES, J. F.C.; MARANHÃO, P. A. C.; CHEVREUIL, L. R.; SOUZA, L. A. G. Seeds of Amazonian Fabaceae as a source of new lectins. **Braz. J. Plant Physiol.**, 23(3): 237-244, 2011.

FERRIZ-MARTÍNEZ, R.; GARCÍA-GARCÍA, K.; TORRES-ARTEAGA, I.; RODRIGUEZ-MENDEZ, A.J.; DE JESÚS GUERRERO-CARRILLO, M.; MORENO-CELIS, U.; ÁNGELES-ZARAGOZA, M.V.; BLANCO-LABRA, A.; GALLEGOS-CORONA, M.A.; ROBLES-ÁLVAREZ, J.P.; et al. Tolerability assessment of a lectin

fraction from Tepary bean seeds (*Phaseolus acutifolius*) orally administered to rats. **Toxicol. Rep.** 2015, 2, 63–69.

FONTENELLE, T. P. C., LIMA, G. C., MESQUITA, J. X., DE SOUZA LOPES, J. L., DE BRITO, T. V., JÚNIOR, F. D. C. V., & FREITAS, A. L. P. Lectin obtained from the red seaweed *Bryothamnion triquetrum*: Secondary structure and anti-inflammatory activity in mice. **International journal of biological macromolecules**, 112, 1122-1130, 2018.

FRASSINETTI, S. et al. Antimutagenic and Antioxidant Activity of a Selected Lectin-free Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Two Cell-based Models. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 70(1), p. 35–41, 2015

FUNK, P.E.; THOMPSON. Identification of a lectin that induces cell death in developing chicken B cells. **Cellular Immunology**, v.186, n.1, p. 75-81, 1998.

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

GOMES, F. S. et al. Saprophytic, symbiotic and parasitic bacteria: Importance to environment, biotechnological applications and biocontrol. **Adv Res**, v. 2, n. 5, p. 250-265, 2014.

GONSALVES, P.E. **Medicinas Alternativas: os tratamentos não convencionais**. 2 ed. São Paulo: IBRASA, 1997.

GONZÁLEZ, G. E. et al. Galectin-3 is essential for early wound healing and ventricular remodeling after myocardial infarction in mice. **International Journal of Cardiology**, v. 176(3), p. 1423–1425, 2014.

GORDTS, S. C. et al. NICTABA and UDA, two GlcNAc-binding lectins with unique antiviral activity profiles. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70 (6), p. 1674–1685, 2015.

HAYUNGA, E.G.; SUMMER, M.P. Characterization of surface glycoprotein on *Schistosoma mansoni* adult worms by lectin affinity chromatography. **Journal of Parasitology**, v. 72, p. 283-291, 1986.

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.

HIRSCH, A.M. Role of lectins (and rhizobial exopolysaccharides) in legume nodulation **Current Opinion in Plant Biology**, v. 2, p. 320-326, 1999.

IMBERT, A.; WIMMEROVÁ, M.; MITCHELL, E. P.; GILBOA-GARBER, N. Structures of the lectins from *Pseudomonas aeruginosa*: insights into the molecular basis for host glycan recognition. **Microbes and Infection**, v. 6, n. 2, p. 221-228, 2004.

ISIDRO, R. et al. Ação de lectina de sementes de *Canavalia brasiliensis* Mart. sobre o comportamento da saúva do Nordeste (*Atta opaciceps* Borgmeier, 1939). **Revista de la Facultad de Agronomía**, v. 27, p. 77-89, 2001.

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

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

JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 7 ed. São Paulo: Nacional. 1985.

KAUR, M.; SINGH, K.; RUP, P. J.; SAXENA, A. K.; KHAN, R. H.; ASHRAF, M. T.; KAMBOJ, S. S.; SINGH, J. **A tuber lectin from *Arisaema helleborifolium* Schott with antiinsect activity against melon fruit fly, *Bactrocera cucurbitae***

**(Coquillet)** and anti-cancer effect on human cancer cell. Archives of Biochemistry and Biophysics, v. 445, p. 156 -165, 2006.

KENNEDY, J. F. et al. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 26, p. 219-30, 1995.

KHANGEMBAM, B. K.; CHAKRABARTI, R. Trypsin from the digestive system of carp *Cirrhinus mrigala*: Purification, characterization and its potential application. **Food chemistry**, v. 175, p. 386-394, 2015.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. 227, 680-685. 1970.

LEAL, C.K.A.; AGRA, M.F. Estudo farmacobotânico das folhas de *Jatropha molíssima* (Pohl) Baill e *Jatropha ribifolia* (Pohl) Baill. **Ata Farmacêutica Bonaerence**, v.24, n.1, p. 513, 2005

LEITE, Y. F. M. M.; SILVA, L. M. C. M.; AMORIM, R. C. N.; FREIRE, E.A.; MELO, J. D. M.; GRANGEIRO, T. B.; BENEVIDES, N. M. B. **Purification of a lectin from the marine red alga *Gracilaria ornata* and its effect on the development of the cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae)**. Biochimica et Biophysica Acta, v. 1724, p. 137-145, 2005.

LEITE, J. F. M. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of a lectin-like substance from *Clitoria fairchildiana* R. Howard seeds. **Molecules**, v. 17(3), p. 3277–3290, 2012.

LEVIN, Y.; SHERER, Y.; BIBI, H.; SCHLESINGER, M.; HAY, E. Rare *Jatropha multifida* intoxication in two children. **Selected Topics: Toxicology**. 19, pp. 173-175. 2000.

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.

LIMPENS, E.; BISSELING, T. Signaling in symbiosis. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, p. 343-350, 2003.

LOSSIO, C.F.; MOREIRA, C.G.; AMORIM, R.M.F.; NOBRE, C.S.; SILVA, M.T.L.; NETO, C.C.; PINTO-JUNIOR, V.R.; SILVA, I.B.; CAMPOS, J.; ASSREUY, A.M.S.; et al. Lectin from *Canavalia villosa* seeds: A glucose/mannose-specific protein and a new tool for inflammation studies. **Int. J. Biol. Macromol.** 2017, 105, 272–280

MACALDOWIE, C. N.; MACKELLAR, A.; HUNTLEY, J. F. The isolation and purification of a dual specific mast cell-derived protease from parasitised caprine jejunal tissue. **Research in veterinary science**, v. 64, n. 1, p. 17-24, 1998.

MACEDO, M. L. R., OLIVEIRA, C. F. R., OLIVEIRA, C. T. Insecticidal activity of plant lectins and potential application in crop protection. **Molecules**, v. 20, n. 2, p. 2014-2033, 2015.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA, V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quim Nova**, Rio de Janeiro, v. 25, no 3, p. 429-438, 2002.

MARQUES, Gabriela FO et al. Contribution of the carbohydrate-binding ability of *Vatairea guianensis* lectin to induce edematogenic activity. **Biochimie**, v. 140, p. 5865, 2017.

MEAGHER, J. L.; WINTER, H. C.; EZELL, P.; GOLDSTEIN, I. J.; STUCKEY, J. A. **Glycobiology**, v. 15, n. 10, p. 1033-1042, 2005.

MORAIS, Sérgio AL et al. Studies on polyphenols and lignin of *Astronium urundeuva* wood. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 10, n. 6, p. 447-452, 1999.

MOURA, R. M.; QUEIROZ, A. F.S.; FOOK, J. M.; DIAS, A. S.; MONTEIRO, N. K.; RIBEIRO, J. K.; MOURA, G. E.; MACEDO, L. L.; SANTOS, E. A.; SALES, M. P. **CvL, a lectin from the marine sponge *Cliona varians*: Isolation, characterization and its effects on pathogenic bacteria and *Leishmania promastigotes*. Comparative Biochemistry and Physiology A**, v. 145, n. 4, p. 517-523, 2006.

NGOC, Duan Pham 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.

NAPOLEÃO, T. H. et al. Termiticidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* against *Nasutitermes corniger* and its mechanisms. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, n. 1, p. 52-59, 2011.

NAPOLEÃO, T. H., DO REGO BELMONTE, B., PONTUAL, E. V., DE ALBUQUERQUE, L. P., SÁ, R. A., PAIVA, L. M., ... & PAIVA, P. M. G. Deleterious effects of *Myracrodruon urundeuva* leaf extract and lectin on the maize weevil, *Sitophilus zeamais* (Coleoptera, Curculionidae). **Journal of stored products research**, 54, 26-33. 2013.

NASCIMENTO, K. S. et al. **An overview of lectins purification strategies**. v. 25, n. 11, p. 527-541, 2012.

NASCIMENTO, A. K. C. et al. Produção simultânea de-fructofuranosidase e fructooligossacarídeos por *Penicillium citreonigrum* URM 4459. **ENZITEC 2016-XXII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática**, p. 1-4, 2016.

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

NUNES, E.S.; ARANDA-SOUZA, M.A.; VAZ, A.F.M.; SANTANA, G.M.S.; GOMES, F.S.; COELHO, L.C.B.B.; PAIVA, P.M.G.; LIRA-DA-SILVA, R.M.; SILVA-LUCCA, R.A.; OLIVA, M.L.V.; GUARNIERI, M.C.; CORREIA, M.T.S. Purification of a lectin with antibacterial activity from *Bothrops leucurus* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 159, pp. 57-63, 2011.

ODDEPALLY, R.; SRIRAM, G.; GURUPRASAD, L.. Purification and characterization of a stable Kunitz trypsin inhibitor from *Trigonella foenum-graecum* (fenugreek) seeds. **Phytochemistry**, v. 96, p. 26-36, 2013.

OHIZUMI, Y.; GAIDAMASHVILI, M.; OHWADA, S.; MATSUDA, K.; KOMINAMI, J.; NAKAMURA-TSURUTA, S.; HIRABAYASHI, J.; NAGANUMA, T.; OGAWA, T.; MURAMOTO, K.; Mannose-binding lectin from yam (*Dioscorea batatas*) tubers with insecticidal properties against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, n. 7, p. 2896-2902, 2009.

OLIVEIRA, A. C. D. et al. **Os dez anos da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) e os principais entraves da cadeia produtiva de extratos vegetais e medicamentos fitoterápicos no Brasil**. 2016.

OLIVEIRA, W. R. **Lectinas de *Crotalaria spectabilis* R.: isolamento, purificação e atividade aglutinante em *Leptospira biflexa* (saprófita) e *L. interrogans* (patogênica)**. 2017.

OLIVEIRA, J. F. C. de, **Lectinas vegetais: de moléculas de defesa de plantas às suas diversas aplicações biotecnológicas**. 2018.

OLSNES, S. The history of ricin, abrin and related toxins. **Toxicon**, v. 44, p. 361-370, 2004.

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.

OSTERNE, V. J. S. **Estudos de estrutura-função da lectina de sementes de *Canavalia virosa* com atividade inflamatória e citotóxica: uma potencial ferramenta anticâncer**. 93 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia de Recursos Naturais) – Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, Universidade Federal do Ceará, 2016.

PAES, J.B. et al. Resistência das madeiras de aroeira (*Myracrodruon urundeuva*), cássia (*Senna siamea*) e ipê (*Tabebuia impetiginosa*) a fungos e cupins xilófagos em condições de laboratório. **Floresta e Ambiente**, v. 9, p. 135-144, 2002.

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

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.

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

PAJIC, Ivana et al. A novel lectin from the sponge *Haliclona cratera*: isolation, characterization and biological activity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 132, n. 2, p. 213-221, 2002.

PALHARINI, J. G., RICHTER, A. C., SILVA, M. F., FERREIRA, F. B., PIROVANI, C. P., NAVES, K. S., & SANTIAGO, F. M. Eutirucallin: a lectin with antitumor and antimicrobial properties. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, 7, 136, 2017.

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

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.

PROCÓPIO, Thamara Figueiredo et al. CasuL: A new lectin isolated from *Calliandra surinamensis* leaf pinnulae with cytotoxicity to cancer cells, antimicrobial activity and antibiofilm effect. **International journal of biological macromolecules**, v. 98, p. 419-429, 2017.

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

RAMPADARATH, S., PUCHOOA D., MALA RANGHOO-SANMUKHIYA, V. Antimicrobial, phytochemical and larvicidal properties of *Jatropha multifida* Linn. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 7(1), 380-383, 2014.

RANGEL, T. B.; ASSREUY, A. M.; PIRES, A. D. E. F.; CARVALHO, A. U.; BENEVIDES, R. G.; SIMÕES, R. D. A. C.; SILVA, H. C.; BEZERRA, M. J.; NASCIMENTO, A. S.; NASCIMENTO, K. S.; NAGANO, C. S.; SAMPAIO, A. H.; DELATORRE, P.; ROCHA, B. A.; FERNANDES, P. M.; CAVADA, B. S. Crystallization and characterization of an inflammatory lectin purified from the seeds of *Dioclea wilsonii*. *Molecules*, v. 16, n. 6, p. 5087-5103, 2011.

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.

SÁ, R. A.; NAPOLEÃO, T.H.; SANTOS, N. D. L.; GOMES, F. S.; ALBUQUERQUE, A. C.; XAVIER, H. S.; COELHO, L. C. B. B.; BIEBER, L. W.; PAIVA, P. M. G. **Induction of mortality on *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae) by *Myracrodruon urundeuva* heartwood lectin.** *International Biodeterioration and Biodegradation*, v. 62, p. 460- 464, 2008.

SAMLIPTO, K.; et al. **Multifidol and multifiol glucoside from the látex of *Jatropha multifida*.** *Phytochemistry*, v.28, n.9, p.2439-2441, 1989.

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

SANTOS, N. D.; DE MOURA, K. S.; NAPOLEÃO, T. H.; SANTOS, G. K.; COELHO, L. C.; NAVARRO, D. M.; PAIVA, P. M.; Oviposition-stimulant and ovicidal activities of *Moringa oleifera* lectin on *Aedes aegypti*. *PLoS One*, v. 7, n. 9, p. e44840, 2012.

SANTOS, A. F. S.; NAPOLEÃO, T. H.; BEZERRA, R. F.; CARVALHO, E. V. M. M.; CORREIA, M. T. S.; PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. B. B. *Advances in Medicine and Biology*, L. V. Berhardt (Ed.), **Nova Publishers Inc**, New York, 63, 33. 2013.

SANTOS, A. F. S.; DA SILVA, M. D. C.; NAPOLEÃO, T. H.; PAIVA, P. M. G.; CORREIA, M. T. S. COELHO, C. B. B. Lectins: Function, structure, biological properties and potential applications. **Current topics in Peptide & Protein Reseach**. Vol. 15, 2014.

SANTOS, C. W. V. **Purificação e caracterização de tripsina a partir do secpilórico do Pacamã (*Lophiosilurus alexandri*)**. Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia. Maceió, 2016.

SANTOS, Ana LE et al. Purification and biophysical characterization of a mannose/N-acetyl-d-glucosamine-specific lectin from *Machaerium acutifolium* and its effect on inhibition of orofacial pain via TRPV1 receptor. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 664, p. 149-156, 2019.

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

SHARMA, M., VISHWANATHREDDY, H., SINDHURA, B. R., KAMALANATHAN A. S., SWAMY, B. M., INAMDAR, S.R. Purification, characterization and biological significance of mannose binding lectin from *Dioscorea bulbifera* bulbils. **International Journal of Biological Macromolecules**, 102, 1146-115, 2017.

SHARON, N.; LIS, H. Lectins: Cell-Agglutinating and Sugar-Specific Proteins. **Science**, v. 177, p. 949-959, 1972.

SILVA, Cynarha Dasy Cardoso. **Purificação e caracterização parcial de uma lectina presente no soro do peixe tilápia (*Oreochromis niloticus*): atividade imunomodulatória em esplenócitos de camundongos**. Tese de doutorado do programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas. 2012.

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, M. C.; CORRÊA, A.D.; SANTOS, C.D.; MARCOS, F. C. A.; ABREU C.M. P. **Extração da lectina da folha de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e o efeito de cátions divalentes na atividade hemaglutinante**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, p. 103-107, 2010.

SILVA, P. 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*, 27, 695-702, 2016.

SILVA, R. J. A. **Isolamento e caracterização de uma nova lectina da casca de *Schinus terebinthifolius* (aroeira-da-praia).** Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Química e Biotecnologia. 2018.

SIMIÕES, C.M.O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 5 ed. Florianópolis: UFSC, 2004.

SINGH, R.S.; KAUR, H.P.; KENNEDY, J.F.; Modulation of immunocyte functions by a mucin-specific lectin from *Aspergillus gorakhpurensis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 101, p. 172-178, 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.

SIRITAPETAWE, Jaruwan et al. Isolation and characterization of a galactose-specific lectin (EanH) with antimicrobial activity from *Euphorbia antiquorum* L. latex. **International journal of biological macromolecules**, v. 120, p. 1846-1854, 2018.

SMITH, L. B., DOWNS, R. S., KLEIN, R. M. **Flora Illustrada Catarinense.** Itajaí, p.265-266, 1988.

SOUZA, J.D.; SILVA, M. B.R.; ARGOLO, A. C.C.; NAPOLEÃO, T. H.; SÁ, R. A.; CORREIA, M. T.S.; PAIVA, P. M.G.; SILVA, M. D.C.; COELHO, L.C.B.B. **A new *Bauhinia monandra* galactose-specific lectin purified in milligram quantities from secondary roots with antifungal and termiticidal activities.** *International Biodeterioration & Biodegradation* 65, 696 -702, 2011.

STRYER, L.; BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L. **Biochemistry: International Edition.** 2006.

SUN, Zongyao; LIU, Yungang. Adaptive state-feedback stabilization for a class of high-order nonlinear uncertain systems. **Automatica**, v. 43, n. 10, p. 1772-1783, 2007.

TAKADA, A.; FUJIOKA, K.; TSUIJI, M.; MORIKAWA, A.; HIGASHI, N.; EBIHARA, H.; KOBASA, D.; FELDMANN, H.; IRIMURA, T.; KAWAOKA, Y. Human macrophage c-type lectin specific for galactose and n-acetylgalactosamine promotes filovirus entry. **J. Virol**, v. 78, p. 2943–2947, 2004.

TSANEVA, Mariya; VAN DAMME, Els JM. 130 years of Plant Lectin Research. **Glycoconjugate Journal**, p. 1-19, 2020.

TEIXEIRA, J. P. **Teor e composição do óleo de sementes de *Jatropha* spp.** Campinas: Bragantina. 1987.

THAKUR, Randhir PS et al. Apparatus for cyclical deposition of thin films. U.S. Patent n. 7,175,713, 13 fev. 2007.

TORRES, Michelly Élen Leal Menezes et al. DdeL, a novel thermostable lectin from *Dypsis decaryi* seeds: Biological properties. **Process Biochemistry**, v. 86, p. 169-176, 2019.

VAN DAMME, E. J. M.; PEUMANS, W. J.; BARRE, A.; ROUGÉ, P. Plant Lectin: A composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **Cr Rev Plant Sci**, v. 17, p. 575-692, 1998.

VASCONCELOS-FILHO, Francisco Sérgio Lopes et al. Natural History and Biological Aspects of Dipsadidae snakes: *P. olfersii*, *P. patagoniensis* and *P. nattereri*. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 9, n. 3, p. 386-399, 2015.

VAZ, A.F.M.; COSTA, R.M.P.B.; MELO, A.M.M.A.; OLIVA, M.L.V.; SANTANA, L.A.; SILVA-LUCCA, R.A.; COELHO, L. C. B. B.; CORREIA, M. T. S. Biocontrol of *Fusarium* species by a novel lectin with low ecotoxicity isolated from *Sebastiania jacobinensis*. **Food Chemistry**, v. 119, p. 1507-1513, 2010.

WANG, Y. et al. Extraction, purification and physicochemical properties of a novel lectin from *Laetiporus sulphureus* mushroom. **LWT**, 2018.

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.

XIE, M. et al. Lectin-modified trifunctional nanobiosensors for mapping cell surface glycoconjugates. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, p. 1311-1317, 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.

YAMASHITA, K.; OHKURA, T. Determination of Glycan Motifs Using Serial Lectin Affinity Chromatography. **Lectins**, v. 1200, p. 79–92, 2014.

YAO, Q., WU, C., LUO, P., XIANG, X., LIU, J., MOU, L.; BAO, J. **ProcessBiochem.**, 45, 1477.2010

ZENG, Qiyan et al. Purification and characterization of a novel immunomodulatory lectin from *Artocarpus hypargyreus* Hance. **International immunopharmacology**, v. 71, p. 285-294, 2019.

ZHAO, M.; WU, F.; XU, P.. 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.

ZHANG, C. et al. *Momordica Charantia* lectin exhibits antitumor activity towards hepatocellular carcinoma. **Investigational New Drugs**, v. 33(1), p. 1–11, 2015.

ZHANG, J.S.; ZHANG, Y.; LI S., AHMED, A., TANG, G.H., YIN, S. Cytotoxic macrocyclic diterpenoids from *Jatropha multifida*. **Bioorganic chemistry**, 80, 511-518, 2018.