



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS - ICF
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR

STELLA FREITAS DE QUEIROZ

**IDENTIFICAÇÃO, ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA LECTINA
DE ENTRECASCAS DE *Abarema cochliacarpus* (GOMES 1803) BARNEBY &
GRIMES 1996**

Maceió-AL
2020

STELLA FREITAS DE QUEIROZ

**IDENTIFICAÇÃO, ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA LECTINA
DE ENTRECASCAS DE *Abarema cochliacarpus* (GOMES 1803) BARNEBY &
GRIMES 1996**

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

Orientador: Prof. Dr. Francis Soares Gomes
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Luiza Vilela
Oliva

Maceió-AL

2020

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

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

Q3i Queiroz, Stella Freitas de.

Identificação, isolamento e caracterização parcial da lectina de entrecascas de *Abarema cochliacarpus* (Gomes 1803) Barneby & Grimes 1996 / Stella Freitas de Queiroz. – 2020.

65 f. : il.

Orientador: Francis Soares Gomes.

Co-orientadora: Maria Luiza Vilela Oliva.

Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Biologia Molecular) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Farmacêuticas. Maceió, 2020.

Bibliografia: f. 55-65.

1. Plantas medicinais. 2. *Abarema cochliacarpus*. 3. Lectina. I. Título.

CDU: 547.953:633.88

AGRADECIMENTOS

A Deus, que permitiu que tudo isso acontecesse. Ele é o maior Mestre que alguém pode ter. Agradeço a Ele por toda força que colocou no meu coração, fazendo com que eu conseguisse chegar até o fim.

Ao meu pai, Joselito de Queiroz Silva, e à minha mãe, Maria das Dores Freitas de Queiroz, pelo esforço e dedicação em colocar a minha educação e a de minha irmã, Karina, em primeiro lugar. Dedico a vocês, com muito amor, este trabalho.

Ao meu esposo, Otoniel Fragoso, por ser paciente, compreensivo e atencioso comigo, compartilhando todos os meus momentos de ansiedade, preocupação, alegrias e vitórias. Você é minha paz em meio às turbulências da vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Francis Soares Gomes, pelo auxílio nos momentos mais complexos e difíceis deste trabalho, pelo companheirismo, paciência e principalmente por inspirar calma. Tenho extremo orgulho em tê-lo como professor orientador. Gratidão. À Prof^a. Dr^a. Maria Luiza Vilela Oliva pela co-orientação pertinente a este projeto.

Aos meus pais de laboratório, Ricardo e Monizy, pela amizade, carinho, conversas, xícaras de café, taças de vinho e todos os momentos especiais compartilhados. Vocês foram fundamentais para a concretização deste trabalho.

À Anyelly, que considero como minha irmã de laboratório. Sua amizade eu quero levar para o resto da vida, você foi e é muito importante nessa caminhada.

A todos os colegas do Laboratório de Metabolismo e Proteômica, em especial Andréa, Alexsandra, Cledson, Tatielle, Dávida, Fabiana, Lais e Júlia. O que vocês já fizeram por mim eu tenho guardado pra sempre.

Aos professores maravilhosos Hugo Juarez e Edma Miranda, que, com toda sabedoria e humildade, são grandes companheiros nos momentos que mais precisamos.

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

Aos meus amigos da vida que me dão tanto orgulho pelas conquistas alcançadas e principalmente pelo que são. Quem é, sabe e sente.

A CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão de suporte financeiro.

“Cada descoberta nova da ciência é uma porta nova pela qual encontro mais uma vez Deus, o autor dela.”

Albert Einstein

RESUMO

Diversas plantas são utilizadas pelo homem para o uso terapêutico e propagadas ao longo das gerações. Atualmente há um crescimento em pesquisas buscando identificar e isolar substâncias ativas presentes nesses organismos visando a criação de novos fármacos. A produção dos princípios ativos desses organismos está relacionada ao seu mecanismo de defesa contra agentes externos. Essas substâncias são normalmente classificadas em metabólitos primários e secundários. As lectinas são proteínas do metabolismo primário que podem assumir diversos papéis biológicos, incluindo atividades antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória, antitumoral e cicatrizante. Essas atividades estão relacionadas à capacidade que as lectinas têm de se ligarem a carboidratos presentes na superfície celular de organismos alvos, impedindo o seu desenvolvimento e/ou induzindo uma resposta celular. *Abarema cochliacarpus* (Gomes) Barneby & Grimes, popularmente conhecida como barbatimão, é uma planta utilizada na medicina popular para tratar úlceras, feridas, infecções na pele, gastrite, dentre outras. Este estudo tem como objetivo investigar a presença de lectina em entrecascas de *A. cochliacarpus* e realizar a purificação e caracterização parciais da mesma. O extrato foi preparado e filtrado em carvão ativado na tentativa de remover compostos que não são de interesse. Uma alíquota desse filtrado foi aplicada em uma coluna cromatográfica de quitina e as proteínas de interesse foram eluídas com ácido acético 1 M. Em seguida, a amostra foi dialisada para remover a solução de eluição e sua atividade hemaglutinante foi avaliada (512). A partir daí denominou-se por AcBL (lectina de entrecascas de *A. cochliacarpus*). Não foi possível confirmar a purificação da lectina através de eletroforese SDS-PAGE em condições redutoras e não redutoras; o gel mostrou a presença de duas bandas proteicas nas duas condições. A dosagem de proteínas e de fenóis foi feita em todas as etapas da purificação, bem como foram realizados os testes de caracterização. AcBL foi inibida por caseína, apresentou termoestabilidade em ampla faixa de temperatura, demonstrou ser uma proteína com caráter ácido-neutro e teve sua atividade reduzida na presença de EDTA, íons cálcio e magnésio. O desenvolvimento deste trabalho contribui para o isolamento de novas proteínas, apresentando relevância regional ao investigar lectinas de uma planta medicinal do Nordeste brasileiro, podendo representar um novo biomaterial com elevado potencial biotecnológico.

Palavras-chave: Planta medicinal, barbatimão, lectina.

ABSTRACT

Several plants are used by man for therapeutic use and propagated throughout the generations. There is currently a growth in research seeking to identify and isolate active substances present in these organisms in order to create new drugs. The production of the active principles of these organisms is related to their defense mechanism against external agents. These substances are normally classified into primary and secondary metabolites. Lectins are primary metabolism proteins that can assume several biological roles, including antibacterial, antifungal, anti-inflammatory, anti-tumor and healing activities. These activities are related to the ability that lectins have to bind to carbohydrates present on the cell surface of target organisms, preventing their development and / or inducing a cellular response. *Abarema cochliacarpus* (Gomes) Barneby & Grimes, popularly known as barbatimão, is a plant used in folk medicine to treat ulcers, wounds, skin infections, gastritis, among others. This study aims to investigate the presence of lectin in *A. cochliacarpus* bark and perform its partial purification and characterization. The extract was prepared and filtered over activated carbon in an attempt to remove compounds that are not of interest. An aliquot of this filtrate was applied to a chitin chromatographic column and the proteins of interest were eluted with 1 M acetic acid. Then, the sample was dialyzed to remove the elution solution and its hemagglutinating activity was evaluated (512). From then on it was called AcBL (*A. cochliacarpus* bark lectin). It was not possible to confirm the purification of lectin using SDS-PAGE electrophoresis in reducing and non-reducing conditions; the gel showed the presence of two protein bands in both conditions. The measurement of proteins and phenols was carried out at all stages of purification, as well as characterization tests. AcBL was inhibited by casein, showed thermostability over a wide temperature range, demonstrated to be a protein with an acid-neutral character and had its activity reduced in the presence of EDTA, calcium and magnesium ions. The development of this work contributes to the isolation of new proteins, presenting regional relevance when investigating lectins from a medicinal plant in Northeast Brazil, which may represent a new biomaterial with high biotechnological potential.

Keywords: Medicinal plant, barbatimão, lectin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Abarema cochliacarpus</i> (Gomes) Barneby & J.W.Grimes.....	23
Figura 2 - Estruturas de <i>Abarema cochliacarpus</i> : (a) Folha, (b) Fruto tipo vagem, (c) Fruto com exposição de sementes, (d) Inflorescência, (e) Casca do caule.....	24
Figura 3 - Representação esquemática (A) da rede de eritrócitos promovida pela ligação da lectina aos carboidratos de superfície e (B) da inibição da atividade hemaglutinante pelos carboidratos livres.....	32
Figura 4 - Representação esquemática de quatro tipos de lectinas vegetais: merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas.....	34
Figura 5 - Esquema das aplicações gerais e avançadas das lectinas.....	39
Figura 6 - Coluna cromatográfica em matriz de quitina utilizada no isolamento parcial de AcBL.....	43
Figura 7 - Perfil cromatográfico da cromatografia em matriz de quitina.....	47
Figura 8 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 9 % - 1: AcBL em condições desnaturantes e não redutora, 2: AcBL em condições desnaturantes e redutora.....	48
Figura 9 - Efeito da temperatura na AH.....	51
Figura 10 - Efeito do pH na AH.....	52
Figura 11 - Efeito do EDTA e íons divalentes na AH.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Famílias de lectinas com base nas relações evolutivas e principais características.....	35
Tabela 2 – Purificação parcial da lectina da entrecasca de <i>A. cochliacarpus</i>	47
Tabela 3 - Teste de inibição da atividade hemaglutinante de AcBL por carboidratos e glicoproteína.....	49

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

- 786-0:** Linhagem tumoral de câncer renal;
- A549:** Linhagem tumoral de adenocarcinoma;
- AcBL:** Lectinas da entrecasca de *Abarema cochliacarpus*;
- AgNO₃:** Nitrato de prata;
- AH:** Atividade hemaglutinante;
- AHE:** Atividade hemaglutinante específica;
- BmoLL:** Lectina isolada da folha de *Bauhinia monandra*;
- BpLec:** Lectina da peçonha de *Bothropoides pauloensis*;
- C6:** Linhagem tumoral de glioma;
- Ca²⁺:** Íon cálcio;
- ConA:** Concanavalina A;
- COX-2:** Ciclo-oxigenase-2;
- CrataBL:** Lectina isolada da casca de *Crataeva tapia*;
- DlyL:** Lectina isolada das sementes de *Dioclea lasiophylla*;
- DRC:** Domínio de reconhecimento a carboidrato;
- DrfL:** Lectina isolada das sementes de *Dioclea reflexa*;
- EB:** Extrato bruto;
- EB_f:** Extrato bruto filtrado;
- EDTA:** Ácido etilenodiaminotetracético;
- ELLA:** Enzyme-linked Lectin Assay (Ensaio de lectina ligada à enzima);
- GaBL:** Lectina isolada da casca de *Genipa americana*;
- HeLa:** Linhagem tumoral de câncer cervical;
- HPV:** Papilomavírus humano;
- HT29:** Linhagem tumoral de câncer de cólon;
- ILAC:** Immobilized-lectin affinity chromatography (Cromatografia de afinidade por lectina imobilizada);
- IMA:** Instituto do Meio Ambiente;
- IUCN:** União Internacional para a Conservação da Natureza;
- LCL:** Lectina isolada da folha de *Lantana camara*;
- LHC:** Lectin histochemistry (Histoquímica com lectinas);
- MCF-7:** Linhagem tumoral de adenocarcinoma de mama;
- MDA-MB-231:** Linhagem tumoral de câncer de mama;

Mg²⁺: Íon magnésio;

MuBL: Lectina isolada da casca de *Myracrodruon urundeuva*;

MuHL: Lectina isolada da cerne de *Myracrodruon urundeuva*;

MuLL: Lectina isolada da folha de *Myracrodruon urundeuva*;

NaCl: Cloreto de sódio;

NaOH: Hidróxido de sódio;

NH₄OH: Hidróxido de amônio;

OMS: Organização Mundial da Saúde;

PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida;

PC-3: Linhagem tumoral de câncer de próstata;

PEG: Polietilenoglicol;

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

PgTeL: Lectina isolada da *Punica granatum*;

pH: Potencial hidrogeniônico;

RIP-2: Proteínas inativadoras de ribossomos tipo II;

SDS: Dodecil-sulfato de sódio;

SteBL: Lectina isolada da entrecasca de *Schinus terebinthifolius*;

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

TNBS: Ácido trinitrobenzenossulfônico.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
2.	OBJETIVOS	17
2.1.	Geral	17
2.2.	Específicos	17
3.	REFERENCIAL TEÓRICO	18
3.1.	O uso de plantas medicinais	18
3.2.	Família Fabaceae e gênero <i>Abarema</i>	22
3.2.1.	Espécie <i>Abarema cochliacarpus</i>	23
3.2.2.	Bioatividades de <i>Abarema cochliacarpus</i>	25
3.3.	Lectinas	27
3.3.1.	Histórico, definição e propriedades gerais	27
3.3.2.	Lectinas vegetais	32
3.3.3.	Classificação de lectinas vegetais	33
3.3.4.	Purificação de lectinas	36
3.3.5.	Aplicações de lectinas vegetais	38
4.	METODOLOGIA	41
4.1.	Obtenção do material	41
4.2.	Preparo do extrato bruto	42
4.3.	Remoção de metabólitos secundários	42
4.4.	Cromatografia em matriz de quitina	42
4.5.	Teste de atividade hemaglutinante (AH)	43
4.6.	Dosagem proteica	44
4.7.	Eletroforese	44
4.8.	Dosagem de fenóis	44
4.9.	Teste de inibição da AH por carboidratos e glicoproteínas	45
4.10.	Avaliação do efeito da temperatura e do pH na AH	45
4.11.	Avaliação do efeito do EDTA e de íons divalentes sobre AH	46
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1.	Extração e remoção de metabólitos secundários	46
5.2.	Isolamento parcial de AcBL	46

5.3. Eletroforese SDS-PAGE.....	48
5.4. Teste de Inibição da AH por carboidratos e glicoproteínas	49
5.5. Efeito da temperatura e do pH na AH	51
5.6. Efeito do EDTA e íons divalentes na AH	53
6. CONCLUSÃO	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o país com a maior biodiversidade do planeta devido a sua riqueza de fauna e flora. Em se tratando da flora, a cada dia novas espécies vegetais são catalogadas, muitas delas consideradas endêmicas, o que faz aumentar a responsabilidade ambiental sobre esse patrimônio brasileiro. Muitas plantas nativas são popularmente utilizadas para fins medicinais e essa prática, denominada fitoterapia, é tão antiga quanto a civilização humana (COSTA, 2018).

O uso de plantas medicinais é muito comum no Brasil, principalmente pela população rural, que geralmente vive em zonas de difícil acesso, e por pessoas com poucas condições financeiras, que muitas vezes não podem apropriar-se de medicamentos vendidos comercialmente. Muitas vezes, esse rústico recurso é a única alternativa para tratar da saúde (TENÓRIO, 2012; COSTA, 2018).

Desde a antiguidade observam-se as propriedades terapêuticas associadas às plantas, mas apenas a partir do século XIX, é que se iniciou a investigação de extratos vegetais, com a realização das primeiras purificações de compostos bioativos, oficializando, assim, o estudo da fitoterapia (ALMEIDA, 2011). Essas propriedades chamaram a atenção de cientistas ao longo dos anos e, com os avanços tecnológicos, o conhecimento acerca das plantas cresceu, possibilitando o isolamento e a caracterização de novas substâncias (PALHARINI et al., 2017; TENÓRIO et al., 2016).

Devido ao pouco conhecimento científico sobre as consequências da utilização de plantas medicinais pela população, o desenvolvimento de estudos que tragam confiança e confirmem, com segurança, se há, ou não, efeito prejudicial dessa prática no organismo, é fundamentalmente necessário (FERREIRA, SILVA, SOUZA, 2013). Deve-se haver uma conexão entre senso comum e senso crítico, e a ciência pode ser essa ponte, fornecendo as informações necessárias para os leigos, a partir do próprio saber popular.

Dentre as plantas utilizadas pelo homem para fins terapêuticos, a espécie *Abarema cochliacarpus*, conhecida por barbatimão, é uma das mais empregadas na medicina popular, geralmente na forma de chá da casca do caule para ingestão por

via oral, e esse extrato possui ação adstringente e antisséptica. Esse tratamento é comum contra úlceras, feridas, infecções na pele, gastrite, papilomavírus humano (HPV) e até câncer (MONTEIRO et al., 2018).

Há muitos relatos sobre as bioatividades do extrato da entrecasca do barbatimão, como por exemplo, inibição do estresse oxidativo e da inflamação, cicatrização, ação antimicrobiana, antinociceptiva, antioxidante, antiviral, antitumoral e efeitos gastroprotetores (SÀNCHEZ-FIDALGO et al., 2013; TENÓRIO et al., 2016).

Tem crescido o número de pesquisas que buscam identificar e isolar compostos bioativos presentes em plantas medicinais, visando a produção de novos fármacos. Os princípios ativos desses organismos estão relacionados ao seu mecanismo de defesa contra agentes externos, e essas substâncias são classificadas em metabólitos primários e secundários.

Dentre os metabólitos primários, estão as lectinas, que são proteínas ou glicoproteínas de origem não imune, com uma característica fundamental que é a capacidade de reconhecerem e se ligarem especificamente a carboidratos. Lectinas ocorrem em todos os organismos vivos, mas as de fonte vegetal são as mais investigadas. Em se tratando de purificação e caracterização de lectinas, a família Fabaceae é a mais estudada (ARAÚJO, 2011).

O fato de as lectinas terem especificidade por carboidratos confere a elas uma ampla utilização biotecnológica. Diversos trabalhos relatam as funções desempenhadas pelas lectinas vegetais e, dentre as aplicações gerais, destacam-se a atividade antibacteriana, antifúngica, antiviral, antiparasitária, inseticida e antitumoral (NAPOLEÃO et al., 2019).

Com base na utilização do barbatimão como planta medicinal e considerando que são poucos os trabalhos sobre compostos bioativos dessa espécie de barbatimão, a presente dissertação descreve a identificação de lectina de entrecasca de *Abarema cochliacarpus* (Gomes) Barneby & Grimes, bem como os procedimentos para o isolamento e a caracterização parcial da mesma.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Investigar a presença de lectina em entrecasas de *A. cochliacarpus* e realizar a purificação e caracterização parcial da mesma.

2.2. Específicos

- Preparar extratos da entrecasca de *A. cochliacarpus*;
- Realizar remoção de metabólitos secundários do extrato bruto;
- Purificar a lectina da fração obtida por cromatografia líquida;
- Confirmar a purificação da lectina através de eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes da fração eluída na cromatografia;
- Caracterizar a lectina quanto aos efeitos de temperatura, pH e íons na atividade hemaglutinante.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. O uso de plantas medicinais

Grande parte da população mundial utiliza-se de plantas para tratar problemas de saúde. No Brasil, a influência deixada por comunidades indígenas e africanas, acerca dessas fontes medicinais, se mostra como uma alternativa em potencial para a terapia de doenças (OLIVEIRA et al., 2013).

Segundo a União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN - 2012), são utilizadas na medicina moderna e tradicional, mais de 70.000 espécies de plantas. O Brasil, pela tamanha riqueza de sua fauna e flora, ocupa a principal posição no quesito biodiversidade no mundo (BRASIL, 2020) e este fato explica o elevado potencial de desenvolvimento na pesquisa por fitoterápicos no país (MENDONÇA, 2011).

Planta medicinal é qualquer organismo do reino Plantae que possui substâncias orgânicas ativas, permitindo a sua atuação como medicamento. Esse reino é o que mais colabora para a descoberta de fármacos (FERREIRA, SILVA, SOUZA, 2013). Até meados do século XVII, a única forma de se tratar as enfermidades da época, seja na prevenção, alívio ou na cura, era por meio da utilização de plantas, o que caracteriza a fitoterapia (COSTA, 2018).

A terapia através de produtos naturais é tão antiga quanto a civilização humana e essa prática atualmente é bastante comum dentro da população brasileira, especialmente pelas pessoas que vivem nas áreas rurais (TENÓRIO, 2012). Regiões de difícil acesso e a falta de condições financeiras são fatores que aumentam a valorização do saber popular e, conseqüentemente, a utilização de plantas medicinais, sendo este o único recurso para a saúde (COSTA, 2018).

Segundo Tenório (2016), desde a antiguidade observam-se as propriedades terapêuticas de plantas medicinais, mas somente após o ano de 1900 é que se mencionam as informações acerca dos estudos de caracterização dessas propriedades. Ao final do século XVIII, através do isolamento e estudo de metabólitos provenientes de extratos vegetais, tornou-se possível uma proposta científica consistente para a utilização de plantas medicinais e, a partir da purificação

de substâncias bioativas no início do século XIX, o estudo da fitoterapia foi renovado com o desenvolver-se da fisiologia e da farmacologia experimental (ALMEIDA, 2011).

A partir de fontes vegetais, podem-se obter moléculas importantes para o desenvolvimento de novos medicamentos, com base em sua alta diversidade química e seus diferentes mecanismos de ação (LIMA, 2019). Essas ricas fontes de agentes com propriedades terapêuticas e compostos bioativos chamaram a atenção dos cientistas e, com o passar do tempo, o conhecimento sobre plantas foi crescendo em conjunto com a evolução tecnológica, permitindo assim o isolamento e a caracterização de novas substâncias (PALHARINI et al., 2017; TENÓRIO et al., 2016).

Muitas espécies dos biomas brasileiros são consideradas endêmicas, ou seja, que ocorrem em uma região geográfica específica. Mesmo com esse fato, a exploração desses biomas vem acontecendo de forma inadequada, por meio, por exemplo, da indústria madeireira, do desmatamento, das queimadas, dentre outros fatores. Para Costa (2018) o que preocupa é que esses fatores podem provocar a extinção de várias espécies vegetais, o que inclui as endêmicas e também as plantas medicinais, possibilitando, assim, a perda de moléculas bioativas e de interesse biotecnológico.

Pires (2011) considera que a maioria das espécies da flora medicinal ainda não é conhecida, seja química ou farmacologicamente. Isso enfatiza ainda mais a importância de se haver uma exploração consciente e sustentável desses seres. Além disso, Jesus (2010), Gonçalves, Filho e Menezes (2005) afirmam que muitas pessoas têm feito o tratamento fitoterápico com plantas que não tiveram ainda seus efeitos analisados nem seus potenciais terapêuticos cientificamente comprovados.

Visto que há pouco conhecimento sobre a confiabilidade e segurança da utilização de muitas plantas medicinais, é essencial o desenvolvimento de pesquisas que confirmem todos os efeitos das plantas no organismo, sejam eles desejáveis ou não. Esses estudos também podem contribuir para o aumento de informações botânicas e farmacológicas desses vegetais, além de poder diminuir o tempo para

se desenvolver novos medicamentos, sendo este fator bastante positivo tanto para a população, quanto para os pesquisadores (FERREIRA, SILVA, SOUZA, 2013).

De acordo com Mendonça (2011), apesar do interesse pela fitoterapia estar crescendo cada vez mais, são poucos os trabalhos desenvolvidos no Brasil com foco na diversidade biológica de plantas medicinais. Em contrapartida, Jesus (2010) relata que têm se intensificado os estudos sobre as propriedades farmacêuticas de plantas na tentativa de minimizar os efeitos prejudiciais à saúde e de descobrir novas drogas capazes de combater doenças.

De maneira geral e diante da constante utilização de plantas medicinais principalmente pelos brasileiros, torna-se necessariamente fundamental a continuidade e o aprofundamento dos estudos sobre a fitoterapia, não somente para esclarecer ao meio científico sobre os potenciais biotecnológicos desse biomaterial, mas também a população leiga, acerca da bioatividade de substâncias presentes nesses organismos e que são, em sua maioria, desconhecidas. A partir da descoberta e descrição biológica dessas moléculas, a comunidade em geral poderá valorizar e proteger com responsabilidade essa flora tão rica (COSTA, 2018; MENDONÇA, 2011).

Um aspecto consideravelmente novo do estudo de plantas medicinais é a etnofarmacologia que, a partir de informações coletadas de um grupo étnico, estuda, além dos minerais, os produtos de origem animal e vegetal que são usados como remédio pela população, a fim de compreender as ações farmacológicas e, assim, dar validade aos dados, permitindo a indicação popular do fármaco (ALMEIDA, 2011).

Bessa (2013) ressalta a importância que a pesquisa fitoquímica tem para o interesse popular, principalmente quando ainda não são disponíveis os estudos químicos das espécies vegetais utilizadas no tratamento de enfermidades. Para o autor, ainda são escassas as pesquisas referentes à ciência por trás dos compostos bioativos de plantas medicinais e considera contraditório o fato de o Brasil possuir a maior diversidade vegetal do mundo, com tantas plantas medicinais, e, ao mesmo tempo, ser pequeno o crescimento do número de informações sobre essas plantas.

Para Almeida (2011), deve-se haver a segurança para que não se tenha uma visão preconceituosa sobre medicamentos à base de plantas e que não se aceite sua veracidade sem os devidos questionamentos. A autora enfatiza a orientação da Organização Mundial da Saúde (OMS) sobre ser feita uma ponte entre a medicina popular e a científica, pois isso pode desmistificar o uso de plantas medicinais e conferir confiabilidade a tantas pessoas que utilizam desse meio para suprir suas necessidades.

O metabolismo vegetal, assim como o de qualquer ser vivo, envolve processos bioquímicos simples e complexos que permitem o crescimento, desenvolvimento, reprodução e perpetuação das espécies de plantas. O metabolismo que é comum a todos os seres é chamado de primário, e está relacionado à síntese de substâncias vitais para a sobrevivência, como aminoácidos, carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos. Já o metabolismo secundário abrange a resposta das plantas aos fatores físicos e biológicos do ambiente, contribuindo para a comunicação e interação entre as espécies, causando a atração, repulsão, manutenção ou destruição delas (ALMEIDA, 2017).

Paiva et al. (2012) afirmam que metabólitos primários são produzidos constantemente em todos os organismos vivos, enquanto que os metabólitos secundários, como flavonoides, alcaloides, terpenos e fenóis, ocorrem em determinados períodos ou ocasiões, tendo sua produção aumentada frente a estresses ambientais, como exemplos o ataque de parasitas, pragas, doenças, radiação e escassez de água.

Sánchez-Fidalgo et al. (2013) relatam que atualmente produtos naturais vegetais são avaliados quanto à modulação de respostas inflamatórias, e que dentre os compostos presentes em extratos de plantas medicinais, os flavonoides apresentam bioatividades interessantes, como anticancerígena, antimicrobiana, anti-inflamatória, imunomoduladora, dentre outras.

Diante disso, são muitas as possibilidades de estudo dentro do âmbito da fitoterapia, especialmente se tratando de um país com tamanha diversidade florística. Muito ainda precisa ser descoberto do universo das plantas medicinais e ser compreendido sobre aquelas que, de geração em geração, são tão utilizadas

pela população brasileira. Pesquisas científicas que identifiquem, isolem e caracterizem compostos biologicamente ativos de fontes vegetais devem ser incentivadas, a fim de assegurar o uso responsável e consciente desses produtos naturais.

3.2. Família Fabaceae e gênero *Abarema*

As angiospermas constituem o maior e mais complexo grupo de vegetais que existem no planeta com mais de 250 mil de um total de 350 mil espécies de plantas conhecidas. Dentre as angiospermas, a família Fabaceae é a terceira maior, contendo cerca de 750 gêneros e 19.500 espécies. Fabaceae, por sua vez, divide-se em três subfamílias, Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae (SOUZA et al., 2019).

De David, Gonçalves e Neto (2015), afirmam que Fabaceae é a família botânica mais expressiva, ocorrendo em todos os biomas, seja nas florestas tropicais, desertos, planícies ou alpes. Morfologicamente variada, suas plantas podem se apresentar como árvores grandes ou até como pequenas ervas. Suas diferentes partes, raízes, folhas, legumes, sementes e flores, são aproveitadas na alimentação animal, na produção de derivados alimentares, na indústria madeireira, de tintas, de cosméticos, na apicultura, no paisagismo e como fonte de produtos medicinais (MENDONÇA, 2011).

A subfamília Mimosoideae se constitui de quatro tribos (Mimoseae, Mimozygantheae, Acacieae e Ingeae) com 3.270 espécies e 82 gêneros, ocorrendo nas regiões tropicais, subtropicais e zonas temperadas do globo, possuindo maior diversidade na América tropical, África, Ásia e Austrália. Na flora brasileira são aproximadamente 824 espécies e 37 gêneros (TAMASHIRO e ESCOBAR, 2016).

Dentro da tribo Ingeae encontra-se o gênero *Abarema*, o qual foi descrito pelo geógrafo e botânico suíço Henry Pittier, em 1927, e compreende cerca de 50 espécies no planeta. No Brasil são descritas 30 espécies com diversidade central na Floresta Amazônica e na Floresta Pluvial Atlântica (IGANCI e MORIM, 2012). Distribuem-se por florestas e matas costeiras do sul do Brasil até o México, concentrando-se em número de espécies também na Amazônia Venezuelana, vales

andinos colombianos, no Equador e nas Ilhas do Caribe (GUERRA, MORIM e IGANCI, 2016).

3.2.1. Espécie *Abarema cochliacarpus*

Algumas espécies do gênero *Abarema* possuem utilidade para fins medicinais, sendo a *Abarema cochliacarpus* uma das plantas mais aproveitadas da flora brasileira para o tratamento de doenças (SANTOS et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2013), sendo conhecida popularmente como barbatimão, bodão-vermelho, ingá negro, abaramotemo, barbatimão-verdadeiro, barba-de-timão, barbatimão-vermelho, casca da virgindade, ibatimô, paricana, piçarana, etc (PIRES, 2011; SANTOS et al., 2018).

Abarema cochliacarpus (Figura 1) é natural e endêmica do Brasil, ocorrendo nos biomas Mata Atlântica, Cerrado e Caatinga. Esses biomas vêm sofrendo modificações antrópicas, fazendo com que essa espécie seja inserida na lista de plantas ameaçadas de extinção (MENEZES, 2016; SÁNCHEZ-FIDALGO et al., 2013). Podem ser encontradas na região Sudeste, nos estados do Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo, e na região Nordeste, no Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Bahia, Sergipe e Alagoas (IGANCI e MORIM, 2015).

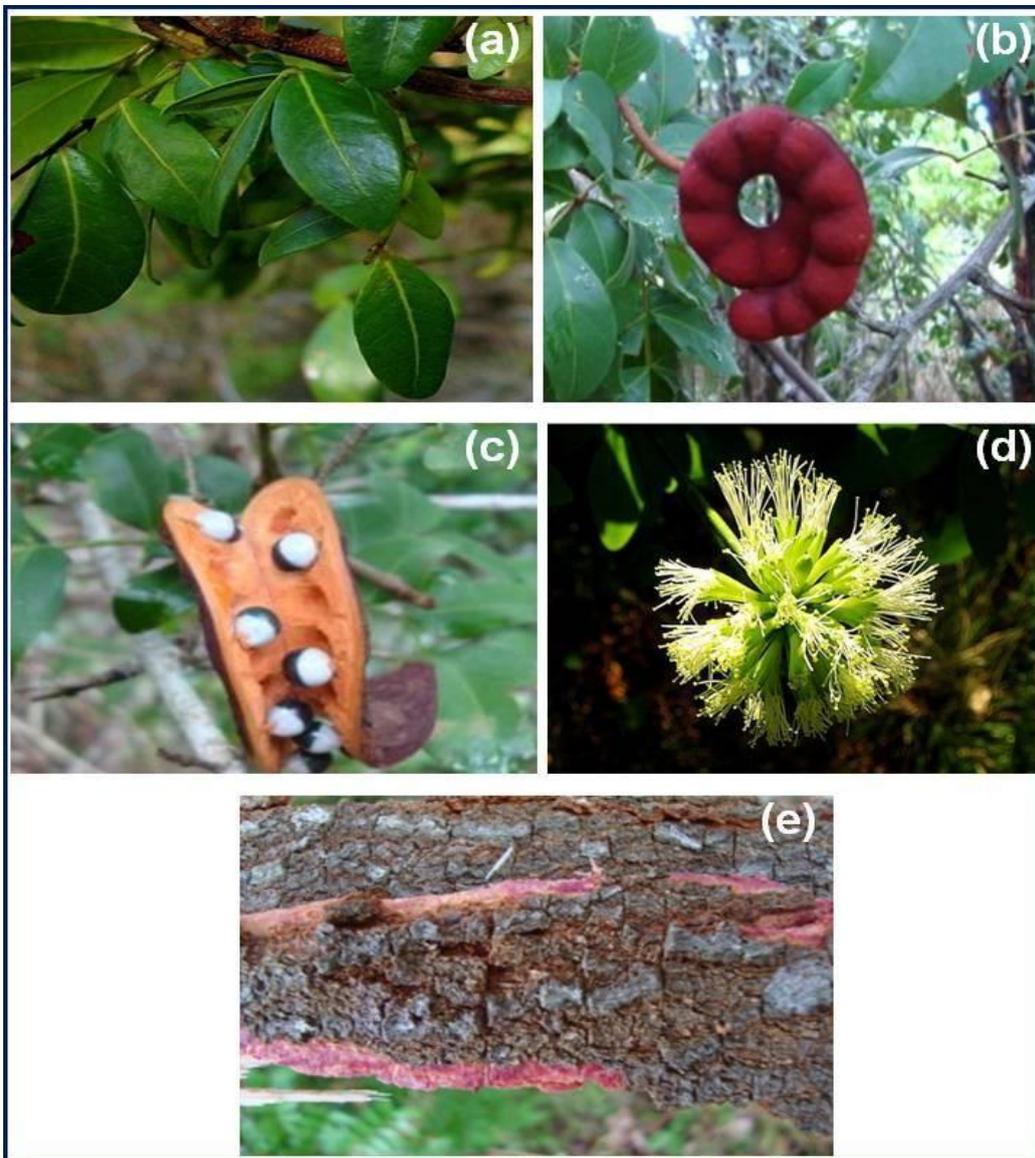
Figura 1 - *Abarema cochliacarpus* (Gomes) Barneby & J.W.Grimes



Fonte: POPOVKIN (2010)

Podendo atingir até 30 metros de altura (BARBOSA, 2015), apresenta-se como uma árvore cuja copa tem uma abundância de folhas compostas, inflorescência aglomerada de forma esférica, flores levemente amareladas, frutos contorcidos e sementes brancas (Figura 2). No Brasil, outras espécies de plantas são conhecidas também pelo nome de barbatimão, são elas *Stryphnodendron adstringens*, *S. ovobatum*, *S. polyphyllum*, *S. barbatimam* e *Dimorphandra mollis* (TENÓRIO, 2016).

Figura 2 - Estruturas de *Abarema cochliacarpus*: (a) Folha, (b) Fruto tipo vagem, (c) Fruto com exposição de sementes, (d) Inflorescência, (e) Casca do caule.



Fonte: Adaptado de JESUS (2010).

3.2.2. Bioatividades de *Abarema cochliacarpus*

Diversas plantas são utilizadas pelo homem para fins terapêuticos. Muitas comunidades do Nordeste brasileiro empregam *Abarema cochliacarpus* como planta medicinal no tratamento de úlceras, feridas, infecções na pele, gastrite, HPV e até câncer. Silva et al. (2010) relatam que da casca do barbatimão geralmente é feita a decocção, resultando numa espécie de chá com propriedade adstringente e antisséptica.

Oliveira et al. (2013) fizeram um estudo utilizando a infusão e o extrato bruto da casca do barbatimão para avaliar os efeitos no fígado de camundongos. Foi observado através de testes histológicos que ambas as amostras causaram intoxicação hepática. Os autores ressaltam a importância desses resultados que descrevem a hepatotoxicidade do barbatimão, pois embora existam trabalhos publicados sobre sua atividade no tratamento de doenças e que muitas comunidades, especialmente pobres, a utilizam como recurso farmacêutico, deve-se desenvolver mais análises fitoquímicas desses materiais para identificar e separar compostos responsáveis por essa toxicidade em camundongos dos bioativos de interesse biotecnológico.

Em contrapartida, outros estudos foram feitos considerando os efeitos benéficos do barbatimão. A fração butanólica de *Abarema cochliacarpus* foi avaliada por Sánchez-Fidalgo et al. (2013) contra macrófagos peritoneais de ratos estimulados por lipopolissacarídeos. Os resultados demonstraram inibição do estresse oxidativo e da inflamação causada, constituindo-se como descobertas interessantes para o tratamento de doenças inflamatórias.

Ratos Wistar tiveram parte de sua pele queimada e foram, em seguida, contaminados com *Staphylococcus aureus*, em um trabalho feito por Oliveira et al. (2013). Três dias após esse processo, iniciou-se o tratamento com o extrato hidroetanólico de *A. cochliacarpus* diretamente na ferida e observou-se uma cicatrização significativamente mais rápida do que no grupo de ratos não tratados, além da ação antimicrobiana desse extrato.

Silva et al. (2009) puderam comprovar também a atividade dos extratos

aquosos e metanólicos da casca do barbatimão em ratos que foram estimulados a algemia, através de injeção intraperitoneal de ácido acético e capsaicina. Os autores afirmam que substâncias ativas exerceram propriedades antinociceptivas e que esses efeitos justificam o possível uso dessa planta pela população no tratamento da dor, porém são necessários maiores estudos para esclarecer qual princípio ativo atua como analgésico nesse organismo.

A atividade antibacteriana de extratos ciclohexânico, acetônico e etanólico da casca do barbatimão foi verificada por Tenório et al. (2016) contra bactérias isoladas de feridas cutâneas de cães: *Staphylococcus intermedius*, *Bacillus sp.*, *Pasteurella sp.* e *Escherichia coli*. Destas, apenas as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus intermedius*, *Bacillus sp.* sofreram inibição do crescimento para a maioria das concentrações de extratos testadas.

Da Silva et al. (2010) também utilizaram a casca de *A. cochliacarpus* para obter extratos clorofórmico e metanólico, e, a partir deste, as frações butanólica, acetato de etila e aquosa foram testadas contra úlcera gástrica aguda induzida por etanol e ácido acético em ratos. Os resultados sugeriram que esta planta apresenta efeitos gastroprotetores e propriedades cicatrizantes, pois estimulou fatores proliferativos e induziram fatores de cura, como ciclo-oxigenase-2 (COX-2), restabelecendo, assim, a integridade da mucosa estomacal.

Em outro trabalho, os autores supracitados testaram a fração butanólica do extrato metanólico contra colite aguda provocada por introdução de ácido trinitrobenzenossulfônico (TNBS) em ratos, e puderam comprovar que esse extrato agiu por mecanismo anti-inflamatório, corroborando com o fato de que esta planta é bastante utilizada popularmente para o tratamento de doenças gastrointestinais (DA SILVA et al., 2010).

Nascimento Júnior (2016) investigou a atividade antioxidante, a citotoxicidade e o conteúdo de fenóis totais em extratos metanólicos de folhas de três plantas comuns da Caatinga, entre elas *A. cochliacarpus*. Todos os extratos foram considerados promissoras fontes de antioxidantes, não apresentando ação citotóxica. O autor enfatiza que é necessário aprofundar os estudos que busquem identificar e isolar compostos dos extratos que justifiquem essa bioatividade

De acordo com bioensaios de barbatimão realizados por Jesus (2010), o vegetal apresentou moderada citotoxicidade quando a administração se deu por via intraperitoneal e não foi tóxico quando por via oral. O extrato etanólico da casca apresentou atividade antimicrobiana e efeito antiaderente frente a *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus oralis* e *Lactobacillus casei*. Observou-se ação cicatrizante de feridas cutâneas através de redução do processo inflamatório, efeito analgésico também foi constatado e o extrato e suas frações purificadas mostraram inibição de duas linhagens de tumores malignos.

Monteiro et al. (2018) realizaram um monitoramento tecnológico acerca do potencial uso de extratos do barbatimão (incluindo espécies além de *A. cochliacarpos*), com inspiração no estudo da patente de uma pomada desenvolvida por professores da Universidade Federal de Alagoas, com o objetivo de tratar infecções causadas pelo HPV. Após vasta pesquisa em bases de dados de patentes, foram encontradas 29 patentes relacionadas ao uso de extratos do barbatimão, envolvidas nas áreas de saúde e cosméticos. O Brasil é o país que apresenta o maior número de patentes relacionadas, corroborando com a riqueza de sua biodiversidade. Essas patentes estão mais concentradas no campo medicinal, associando-se ao fato de que as plantas conhecidas por barbatimão são utilizadas na medicina popular.

3.3. Lectinas

3.3.1. Histórico, definição e propriedades gerais

Lectina, no sentido etimológico da palavra, significa selecionar, do latim *lectus* (OLIVEIRA, 2018). O primeiro trabalho relatado na literatura envolvendo o conhecimento de lectinas data de 1860 e foi realizado por Silas Weir Mitchell, o qual observou a capacidade que o veneno da cobra *Crotalus durissus* tem de aglutinar o sangue de pombo (OLIVEIRA, 2017). Essa atividade hemaglutinante presente em extrato de plantas foi primeiramente identificada em 1888, na Universidade de Dorpat (na Estônia), por Peter Hermann Stillmark, em seu trabalho com *Ricinus communis* (mamona) e denominou como ricina, a proteína responsável por essa ação (FAZANARO, 2010). Pouco tempo depois e na mesma universidade, H. Hellin

demonstrou haver uma substância em sementes de *Abrus precatorius* (jequiriti) com esse mesmo potencial aglutinante, e a batizou como abrina (VASCONCELOS, 2010).

Em 1898, Elfstrand sugeriu a denominação hemaglutinina para as proteínas até então descobertas, ricina e abrina, devido à atividade hemaglutinante exercidas por ambas. Em 1952, Walkins e Morgan comprovaram que esta característica baseava-se na especificidade de ligação entre lectina e carboidrato. Até meados do século XX, o termo hemaglutinina ainda era utilizado (ARAÚJO, 2011), além da designação fitoaglutininas, para aquelas proteínas identificadas em vegetais (BARBOSA, 2013).

Paul Ehrlich aproveitou as descobertas de ricina e abrina para realizar estudos imunológicos e, em 1891, propôs os princípios fundamentais da imunologia. Anos mais tarde, em 1902, Karl Landsteiner, da Universidade de Viena, observou que as atividades hemaglutinantes de vários extratos de sementes eram diferentes quando testadas com eritrócitos de diferentes animais. Essa descoberta fascinou William C. Boyd, da Universidade de Boston, que, em 1954, testou sementes de *Phaseolus lunatus* (feijão-de-lima) quanto à especificidade de grupos sanguíneos. No sangue tipo A houve aglutinação, mas não houve no B e no O (MISHRA et al., 2019).

Uma hemaglutinina pura foi obtida pela primeira vez em 1919 por James B. Sumner, a partir do feijão-de-jaca (*Canavalia ensiformis*) e que foi denominada como concanavalina A (ConA). Porém, somente duas décadas depois, Sumner e Howell relataram a atividade hemaglutinante dessa proteína contra eritrócitos e leveduras. Eles também constataram que essa atividade foi inibida pela sacarose e sugeriram que a hemaglutinação desenvolvida pela conA seria o resultado de uma reação desta com carboidratos da superfície dos eritrócitos. Pela primeira vez a especificidade das lectinas por açúcar foi comprovada (SHARON e LIS, 2004).

De acordo com Lima et al. (2017), aglutininas, hemaglutininas ou lectinas são identificadas devido a sua habilidade em aglutinar eritrócitos, em determinados casos de forma específica, isso porque se ligam aos antígenos de eritrócitos

(macromoléculas da superfície extracelular) que podem ter estrutura glicídica ou glicoproteica.

Houve um grande interesse, durante a Segunda Guerra Mundial, com relação à tipagem sanguínea pela necessidade de transfusão de sangue, e isso resultou na descoberta de várias lectinas específicas para vários tipos de sangue (OLIVEIRA, 2017). A partir dessa especificidade e da diferenciação supracitada, no ano de 1954 foi sugerido por Boyd e Elizabeth Shapleih que as fitoaglutininas fossem denominadas lectinas, visto que seu significado é escolher ou selecionar (BARBOSA, 2013).

Após listagem feita por Sharon e Lis, em 1972, sobre as lectinas de plantas isoladas e caracterizadas até então, e frente a uma extensa aplicabilidade dessas proteínas, passou-se a utilizar o termo “lectinologia”, expressão introduzida por Potapov para designar a área de estudos voltada totalmente à pesquisa sobre lectinas (CASTANHEIRA, 2011). A partir disso, o termo foi generalizado para todas as proteínas com potencial de aglutinar células ou precipitar polissacarídeos e glicoproteínas (BARBOSA, 2013).

A partir destes estudos pioneiros e de suas divulgações, surgiram diversos outros trabalhos envolvendo lectinas vegetais. Uma descoberta que marcou a história dessas proteínas foi realizada por Peter Nowell, em 1960, o qual expôs a atividade mitogênica da lectina do feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*), contribuindo ainda mais para os avanços de pesquisa no campo da imunologia (SANTOS, 2018).

Três anos depois, outro acontecimento importante se deu com a publicação do primeiro trabalho sobre lectinas e câncer, por Joseph C. Aub, o qual relata que extratos de *Triticum vulgare* (trigo) inibiram o crescimento tumoral devido a aglutinação das células cancerígenas (CASTELÃO, 2017). Isso fez com que cientistas associassem as alterações na parede celular e a tendência para aglutinar lectinas com o desenvolvimento das células de câncer (BARBOSA, 2014).

De 1970 até os dias atuais, houve um grande avanço no que se refere ao conhecimento estrutural e de aplicabilidade das lectinas, principalmente devido ao surgimento e evolução dos métodos utilizados na purificação e caracterização. A

divulgação científica contribui bastante para difundir as propriedades singulares dessas proteínas, além de provocar o interesse em explorar novos organismos (COSTA, 2018).

Pinto-Júnior (2019) comenta que a partir de 1980 a disponibilidade de lectinas puras possibilitou o estudo não só das propriedades físico-químicas, mas também da particularidade de suas atividades biológicas. O progresso tecnológico e os avanços da bioquímica e biologia molecular permitiram a determinação da estrutura proteica, da especificidade de ligação a carboidratos e do sequenciamento dos aminoácidos. Ainda em 1983 foi possível clonar a primeira lectina, a partir da lectina de soja.

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

Há um destaque em todas essas definições com relação à origem não imunológica das lectinas, e isso é explicado por Gomes (2013) como sendo necessário para diferenciar essas proteínas dos anticorpos que aglutinam células. Estes são produtos de uma resposta imune e apresentam menor variedade estrutural entre si, enquanto que aquelas são produzidas por organismos que não apresentam sistema imune e podem distinguir-se bastante quanto aos constituintes primários, necessidade de metais, massa molecular, estrutura tridimensional e ocorrência de glicídeos na estrutura molecular.

De acordo com Araújo (2011) e Pinto-Júnior (2019) a definição mais utilizada, até então, foi criada por Peumans e Van Damme, em 1995, e estabelece que lectinas sejam proteínas ou glicoproteínas de origem não imune com capacidade de se ligarem de forma específica e reversível a carboidratos, possuindo, no mínimo, um domínio não catalítico (domínio de reconhecimento a carboidratos – DRC). Este domínio de reconhecimento a carboidratos, pertencente à estrutura polipeptídica, é a

região na qual ocorre a ligação das lectinas com os carboidratos.

Esta interação pode ser tão particular quanto a que ocorre entre substrato e enzima ou entre antígeno e anticorpo (SILVA, 2018). O mecanismo de ligação está relacionado à especificidade existente em todas as lectinas; diferentes DCR resultam em diferentes especificidades ao carboidrato. E tudo isso se correlaciona com as bioatividades que essas proteínas exibem (CASTELÃO, 2017). As forças que fornecem a estabilidade das ligações reversíveis entre lectina e açúcar são as interações hidrofóbicas, forças de van der Waals e ligações de hidrogênio (PAIVA et al., 2010).

A nomenclatura das lectinas geralmente segue uma regra, comumente utilizada na literatura, com base na facilidade para citação. Elas devem ser denominadas por uma sigla derivada do nome científico das espécies das quais foram purificadas (BARBOSA, 2014). Por exemplo, Silva et al. (2016) purificaram uma lectina a partir da sarcotesta de romã (*Punica granatum*) a qual foi designada por PgTeL: Pg - *Punica granatum*, Te – testa, L – lectin. Silva (2017) isolou uma lectina da casca de *Schinus terebinthifolius* (aroeia da praia), que ficou conhecida como SteBL: Ste - *Schinus terebinthifolius*, B – bark, L – lectin. Castanheira (2011) purificou uma lectina da peçonha de *Bothropoides pauloensis* (serpente), denominada BpLec.

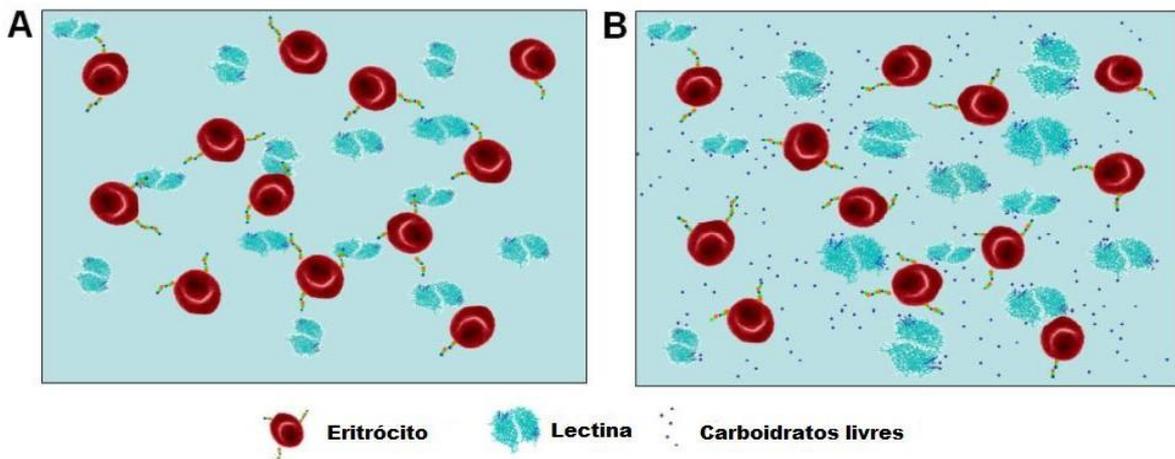
A identificação de lectinas em uma amostra pode ocorrer facilmente por meio de uma técnica chamada de hemaglutinação (Figura 3A). A amostra é serialmente diluída e, em seguida, é incubada com eritrócitos (humanos ou animais), que podem ser tratados enzimaticamente (melhorando a sensibilidade das células à lectina) ou quimicamente (para fixar os eritrócitos e aumentar sua validade) (SILVA, 2015). A atividade hemaglutinante (AH) corresponde ao inverso da maior diluição em que se observa a hemaglutinação (GOMES, 2013).

Para confirmar que a espécie aglutinante é uma lectina, deve-se realizar o teste de inibição da atividade hemaglutinante (Figura 3B), onde a amostra é diluída em série em uma solução de carboidratos ou glicoproteínas livres, antes da adição dos eritrócitos. Dessa forma, os DRC das lectinas poderão ser ocupados por essas macromoléculas livres em solução, impossibilitando a interação com os açúcares da

superfície celular e resultando na precipitação dos eritrócitos. Esse ensaio também permite determinar qual carboidrato é específico para a lectina, sendo este o que mais inibe a AH (SILVA, 2015).

Costa (2018) explica que há possibilidade de compostos como lipídeos, taninos ou íons bivalentes contribuírem, por meio de ligações não específicas, para um falso resultado da AH, destacando ainda mais a necessidade de se realizar o teste de inibição por carboidratos para confirmar se a hemaglutinação tem natureza lectínica.

Figura 3 - Representação esquemática (A) da rede de eritrócitos promovida pela ligação da lectina aos carboidratos de superfície e (B) da inibição da atividade hemaglutinante pelos carboidratos livres.



Fonte: Adaptado de Paiva, et al. (2010).

De forma geral, as lectinas são estruturalmente estáveis devido a sua forma compactamente globular, agregação molecular e perfil de glicosilação. Sendo assim, fatores externos são necessários para mudar a estrutura dessas proteínas, como temperaturas elevadas, pH e a ação proteolítica de enzimas, que modificam a conformação proteica por meio da quebra de interações que mantêm sua estrutura (interações de hidrogênio, iônicas e ligações covalentes) (BARBOSA, 2013).

3.3.2. Lectinas vegetais

Lectinas são predominantes em animais e plantas (CASTELÃO, 2017). Apesar das lectinas vegetais serem as mais estudadas (OLIVEIRA, 2018), elas ocorrem em todos os organismos vivos, incluindo algas, fungos e bactérias (MISHRA et al., 2019). Existe a dificuldade de se investigar lectinas de fontes animais devido à

baixa expressão tecidual se comparado às lectinas vegetais e, como a caracterização demanda uma quantidade grande de material bruto, pode se tornar inviável seguir por esse caminho (CASTANHEIRA, 2011).

De acordo com Carneiro e Halla (2011), a maioria das lectinas vegetais possui especificidade por carboidratos simples (monossacarídeos e derivados desses) como, por exemplos, manose, N-acetilglicosamina e ácidos N-glucurônico, galacturônico, xilurônico, L-idurônico, siálico e N-acetilmurâmico ou complexos (oligo e polissacarídeos) como sacarose, maltose, lactose, dentre outros (GOMES, 2013).

As lectinas estão incluídas em vários grupos botânicos, mas são encontradas principalmente em Fabaceae (ARAÚJO, 2011), família de plantas mais bem estudada quanto à purificação e caracterização de lectinas. Localizam-se predominantemente em cotilédones e endospermas, mas estão presentes também em folhas, raízes, tubérculos e flores (GONDIM, 2014). Lectinas de plantas já foram isoladas, segundo Paiva et al. (2010), a partir da casca, cladódios, flores, folhas, rizomas, raízes e sementes.

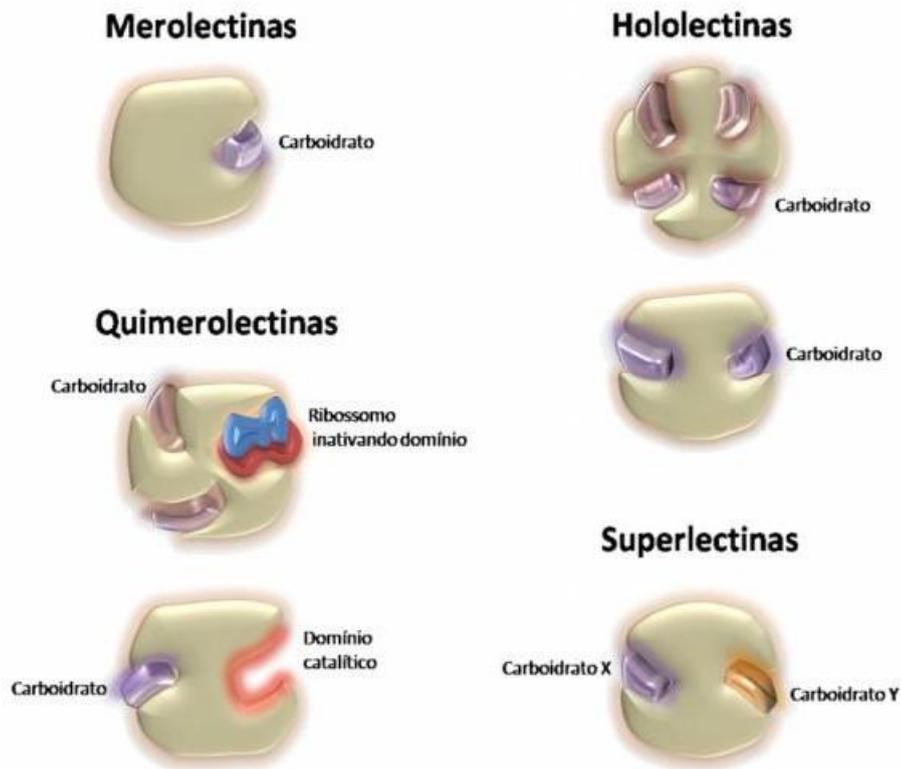
No aspecto fisiológico, as lectinas vegetais atuam como reservatório, (proporcionando aminoácidos para o desenvolvimento da planta), desempenham um papel de defesa contra microrganismos patógenos e/ou herbívoros, além de sinalizar os danos provocados na superfície celular ou intracelular das plantas. Esse mecanismo de defesa envolve a interação proteína-carboidrato: as lectinas reconhecem e se ligam, seletiva e reversivelmente, a carboidratos que podem estar na superfície celular do invasor, ou podem ter sido gerados na própria planta. Essa interação promoverá a transdução de sinal no interior da célula vegetal, como resposta ao ataque sofrido (OLIVEIRA, 2018).

3.3.3. Classificação de lectinas vegetais

As lectinas vegetais podem ser agrupadas por meio de três sistemas de classificação, que levam em consideração a sua estrutura tridimensional, especificidade aos carboidratos e relações evolutivas (BARBOSA, 2013). Quanto a sua estrutura, essas proteínas podem ser organizadas em quatro tipos (Figura 4):

As merolectinas apresentam apenas um DRC, o que as torna incapazes de aglutinar eritrócitos ou precipitar gliconjugados. As hololectinas possuem dois ou mais domínios que se ligam a carboidratos iguais ou estruturalmente semelhantes podem aglutinar células e precipitar glicoconjugados e a maioria das lectinas pertencem a esta classe. Quimerolectinas têm um domínio que reconhece carboidratos associado a outro domínio catalítico ou de atividade biológica distinta que atua independente do DRC. Já as superlectinas apresentam, no mínimo, dois domínios de ligação a açúcares, sendo estes estruturalmente diferentes (SANTOS, 2018).

Figura 4 - Representação esquemática de quatro tipos de lectinas vegetais: merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas.



Fonte: Bezerra (2009).

Com base na especificidade por carboidratos, as lectinas de plantas podem agrupar-se como ligadoras de fucose, ligadoras de glicose/manose, ligadoras de galactose/N-acetilgalactosamina, ligadoras de N-acetilglicosamina, ligadoras de ácido siálico e ligadoras de glicanos complexos (SILVA, 2016; PINTO-JÚNIOR, 2019).

As características evolutivas das lectinas, que abrangem suas propriedades estruturais e a sequência de aminoácidos, as dividem em sete famílias distintas (FERREIRA, 2017). A Tabela 1 apresenta cada família e suas principais particularidades.

Tabela 1 – Famílias de lectinas com base nas relações evolutivas e principais características.

Família	Característica
Lectinas ligadoras de quitina	Além de se ligarem à quitina, possuem similaridade estrutural com a heveína (uma merolectina da espécie <i>Hevea brasiliensis</i>).
Proteínas inativadoras de ribossomos tipo II (RIP-2)	Através de atividade catalítica, inativam ribossomos eucarióticos. São citotóxicos em potencial.
Lectinas relacionadas à jacalina	Possuem semelhança estrutural com a jacalina, lectina extraída da espécie <i>Hevea brasiliensis</i> (jaca). Apresentam especificidade para N-acetilglicosamina, manose e maltose.
Lectinas de monocotiledôneas ligadoras de manose	Encontradas em monocotiledôneas, ligam-se apenas a manose e são semelhantes em sequência e tridimensionalidade.
Lectinas semelhantes à Amarantina	Presentes nas amarantáceas, são similares na sequência de aminoácidos. São específicas para N-acetilgalactosamina e não são glicosiladas.
Lectinas de Cucurbitáceas	Encontradas nas cucurbitáceas, são específicas para quitina, mas sem semelhança com a heveína. Geralmente apresentam glicosilação.
Lectinas de leguminosas	Presentes em plantas leguminosas, são similares quanto a estrutura primária e terciária e características físico-químicas, porém são distintas as especificidades e estrutura quaternária.

Fonte: Adaptado de Barbosa (2013).

Silva (2017) comenta que há lectinas que dependem de íons divalentes, como os cátions magnésio, cálcio, manganês e zinco, para exercerem sua função biológica. Essas proteínas são denominadas metaloproteínas e, segundo Oliveira (2018), os sítios de ligação desses metais são adjacentes ao DRC.

Lectinas que não precisam de íons metálicos já estão em seu arranjo tridimensional necessário para reconhecer carboidratos. Quando apresentam porção glicídica em sua estrutura, são chamadas de glicoproteínas, e essa característica diminui tanto a degradação proteolítica, quanto a desnaturação devido a temperatura e pH, o que confere a proteína maior estabilidade. Além disso, contribui para a associação com outras moléculas e para a solubilidade e viscosidade em soluções aquosas (GOMES, 2013).

3.3.4. Purificação de lectinas

As lectinas de leguminosas (família Fabaceae) são uma das mais bem investigadas entre as lectinas vegetais, devido à abundância, propriedades moleculares, interações com açúcar e pela facilidade de purificação dessas biomoléculas (GONDIM, 2014).

Purificar proteínas tem como objetivo estudar as suas características físico-químicas, estruturais e atividades biológicas (SILVA, 2018). Para que todos esses parâmetros sejam investigados, é necessário avaliar a proteína em sua forma pura e, assim, confirmar o princípio ativo associado à propriedade biológica observada inicialmente. Porém, a purificação proteica demanda um bom planejamento para que o processo seja viável e produtivo, seja para lectinas ou para qualquer outra proteína (COSTA, 2018).

O passo inicial para a purificação de lectinas consiste na extração de proteínas, que pode ser realizada utilizando solução salina, como no caso da purificação parcial da lectina da casca de *S. terebinthifolius* (SILVA, 2017), ou usando tampões, como feito por Costa (2018) ao purificar uma lectina da casca de *Genipa americana* (jenipapo). Algumas lectinas são também extraídas usando apenas água como solvente, como é o caso da lectina de sementes de acácia-branca (*Moringa oleífera*) (DE OLIVEIRA et al., 2017).

A extração ocorre sob agitação constante, com tempo e temperatura controlados. A partir do extrato bruto, podem-se isolar proteínas por meio de algumas técnicas, dentre elas destaca-se o fracionamento salino, processo no qual geralmente se usa sulfato de amônio (sal altamente hidrofílico) para precipitar proteínas pela remoção da camada de solvatação ao redor das mesmas (salting out). Em seguida, para remoção do sal e de outras moléculas pequenas que podem estar presentes, submete-se a fração ao processo de diálise em membrana semipermeável, que consiste basicamente em separar moléculas pela diferença de peso molecular (CARNEIRO e HALLA, 2011).

Outra opção para pré-purificação das lectinas é o tratamento com carvão ativado, onde o extrato bruto é filtrado em carvão com a finalidade de remover, por adsorção, metabólitos secundários, que inclusive podem contribuir para uma falsa atividade lectínica, ou retirar qualquer outro composto indesejável que esteja presente, sem interferir na composição da amostra. Esse método foi utilizado por Nonose e Trindade (2009), em seu trabalho de purificação de lectinas a partir das folhas de *Mikania laevigata* (guaco) e por Gomes e colaboradores (2013) no isolamento da lectina de folhas de *Schinus terebinthifolius*.

Segundo Santos (2016), a purificação de proteínas pode demandar o uso de muitas técnicas para cada fase de separação. A técnica que envolve uma purificação mais efetiva, mantendo a bioatividade da molécula, é a cromatografia. Os diferentes tipos de cromatografia com diferentes propriedades fornecem potentes opções, isoladas ou combinadas, para purificar qualquer biomolécula.

Os métodos cromatográficos utilizados na purificação de lectinas podem ser cromatografia de afinidade, cromatografia de troca iônica e cromatografia de exclusão molecular (ou gel filtração). A diferença entre elas está relacionada à matriz a ser utilizada na coluna cromatográfica, cuja escolha dependerá de três propriedades: especificidade a carboidratos, carga líquida ou tamanho molecular da proteína, respectivamente (GOMES, 2013).

A habilidade que as lectinas têm de se ligarem de forma específica e reversível a carboidratos, faz com que seja mais usual a escolha pela cromatografia de afinidade. Nesse caso, a fase estacionária é uma matriz composta por ligantes

altamente específicos às lectinas, ou seja, os ligantes são carboidratos. Geralmente as colunas contêm matrizes polissacarídicas como Sephadex (polímero de glicose), Galactose-Sepharose (galactose ligada em agarose) e quitina (polímero de N-acetilglicosamina). Lectinas ligam-se especificamente à matriz por ligações não-covalentes e podem ser obtidas com pureza alterando as condições de pH, força iônica ou pela eluição de uma solução contendo um competidor (ARAÚJO, 2011).

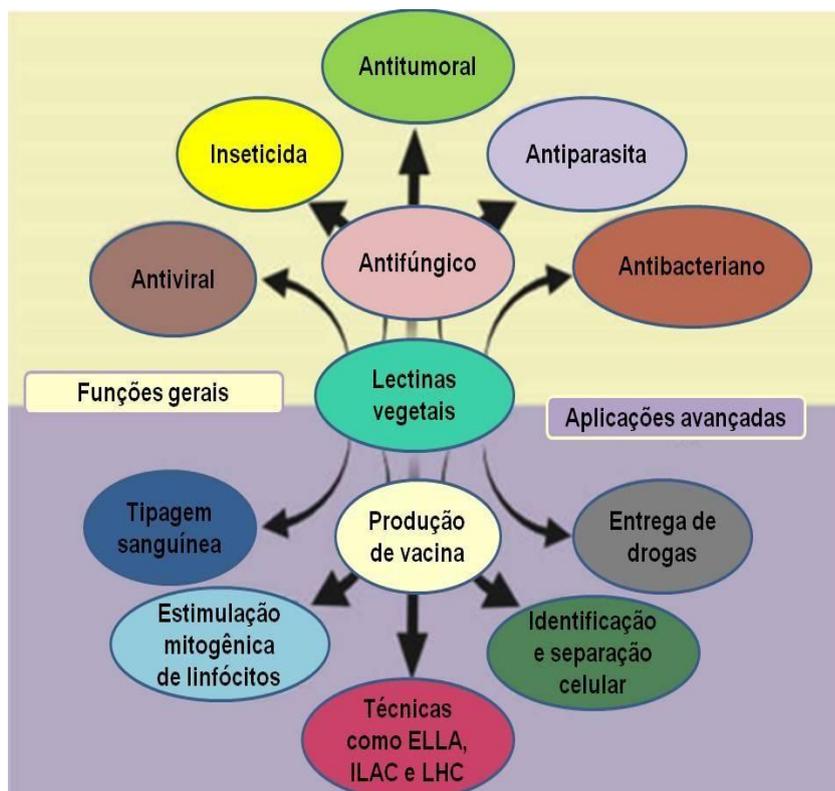
Para Paiva et al. (2010), a cromatografia de afinidade está presente em muitos processos de purificação de lectinas pelo fato de ser bastante vantajosa, considerando a alta especificidade e elevada recuperação, fornecer alto grau de pureza em um único passo e conseguir manter a atividade biológica dessas proteínas.

Costa (2018) cita quatro variáveis que devem ser levadas em consideração ao se realizar uma cromatografia excelente: - Capacidade de separação: o quanto de proteína a coluna suporta no processo de separação, evitando perdas e a diminuição da vida útil da matriz; - Velocidade: o tempo gasto no processo é um fator importante, visto que uma cromatografia demorada pode ser economicamente inviável, além de aumentar a possibilidade de desnaturação proteica; - Resolução: o grau de separação da proteína de interesse com relação às outras que estão em um mesmo extrato e – Recuperação: avalia o quão bem estabelecido foi o protocolo, se a purificação foi minimamente eficiente. O autor conclui, dessa forma, que purificar proteínas deve levar em consideração todos os aspectos mencionados acima de forma a obter a maior quantidade da proteína desejada na forma ativa e com menor tempo e custo.

3.3.5. Aplicações de lectinas vegetais

Lectinas de plantas são amplamente utilizadas na área biotecnológica, visto que relatos confirmam cada vez mais a eficácia das funções desempenhadas por essas proteínas. Essas bioatividades estão associadas diretamente com suas estruturas diferenciadas e sua característica de reconhecimento e ligação específica a carboidratos (FERREIRA, 2017). Mishra et al. (2019) descrevem as principais contribuições de lectinas vegetais e organizam separando as aplicações gerais das avançadas, como mostrado na Figura 5:

Figura 5 – Esquema das aplicações gerais e avançadas das lectinas.



Fonte: Adaptado de Mishra et al. (2019).

Dentre os trabalhos desenvolvidos com lectinas vegetais envolvendo microrganismos, está o realizado por Gomes (2013), onde o mesmo demonstrou a atividade contra bactérias e fungos de importância médica da lectina de folhas de *S. terebinthifolius* (SteLL). Outra lectina com potencial atividade antimicrobiana foi isolada por Silva (2016) a partir da raiz de *Portulaca elatior*, denominada como PeRoL. Sá et al. (2009) isolaram uma lectina da cerne de *Myracrodruon urundeuva* (aroeira-do-sertão), que conseguiu inibir bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e inibir o crescimento de fungos fitopatogênicos. Da folha de *Bauhinia monandra* (árvore-orquídea), Silva (2008) extraiu uma lectina (BmoLL) que também apresentou ação antimicrobiana, além de ação inseticida contra um tipo de cupim. No presente ano, Hiremath e colaboradores publicaram um artigo que apresenta a purificação de LCL, um lectina de folha da planta medicinal cambará (*Lantana camara*), com potente atividade antibacteriana e antifúngica, além de inibir o crescimento de células HT29 (linhagem celular de câncer de cólon).

Em 2009, um trabalho realizado por Lima e Paiva revelou que lectinas das folhas de *Myracrodruon urundeuva* foram agentes larvicidas contra *A. aegypti*. Dornelles e Paiva (2011) utilizaram a mesma planta para isolar lectinas da entrecasca (MuBL), cerne (MuHL) e folhas (MuLL) e testaram contra bactérias simbiotes do extrato de intestinos de operários e soldados de *N. corniger* (cupim). Os dados mostraram ação termiticida das lectinas relacionada ao efeito deletério sobre essas bactérias que são essenciais para a digestão de componentes da dieta dos insetos.

A lectina extraída de *Brassica oleracea* ssp. *Botrytis* (couve-flor) foi avaliada quanto aos efeitos contra macrófagos (a primeira linha de defesa contra invasões microbianas) em células de levedura. Os resultados evidenciaram a ação imunomoduladora da lectina, que estimulou a fagocitose e a produção de mediadores inflamatórios por macrófagos, auxiliando na ativação da resposta imune (DUARTE et al., 2017). A lectina SteLL também foi avaliada, por Lima et al. (2019), frente a macrófagos infectados por *S. aureus*, onde a mesma melhorou a ação bactericida dessas células, conferindo à lectina a atividade anti-infecciosa.

Araújo (2011) isolou uma lectina de sementes de *Canna limbata* (berisilvestre) que apresentou atividade antinociceptiva e anti-inflamatória, sugerindo sua possível utilização no tratamento da inflamação e da dor. Ação anti-inflamatória também foi observada na lectina de sementes do feijão-bravo do Ceará (*C. brasiliensis*) (BARBOSA, 2013) e na lectina purificada de sementes de *Dioclea reflexa* (DrfL) por Pereira-Júnior (2014).

No trabalho descrito por Araújo et al. (2011), a lectina extraída da casca de *Crataeva tapia* (CrataBL) ou trapiá, exerceu não somente ação anti-inflamatória e analgésica, mas também significativo efeito antitumoral contra Sarcoma-180, uma linhagem celular de câncer em camundongos.

Outras lectinas com propriedades antitumorais foram descritas: Araújo (2015) isolou uma lectina das sementes de *Canavalia marítima* (feijão-da-praia) que afetou a viabilidade das linhagens tumorais A549 (adenocarcinoma), 786-0 (câncer renal), HT29 (câncer de cólon) e HeLa.(câncer cervical); Palharini et al. (2017) testou a lectina extraída do látex do avelós, ou *Euphorbia tirucalli* (eutirucallina) contra várias

linhagens celulares: HeLa, PC-3 (câncer de próstata), MDA-MB-231 (câncer de mama) e MCF-7 (adenocarcinoma de mama), e essa lectina apresentou atividade antiproliferativa nessas células tumorais.

Em 2017, Figueirôa e colaboradores tiveram um artigo publicado que demonstrou que as lectinas nativa e recombinante da semente de *Cratylia mollis* (camaratuba) induziram a morte de células PC-3 através do comprometimento da integridade da membrana e homeostase mitocondrial. E a lectina purificada de sementes de *Dioclea lasiophylla* (mucunã), denominada DlyL, apresentou ser um potencial antitumoral e antiglioma, por provocar a autofagia e apoptose em células de glioma da linhagem C6 (PINTO-JÚNIOR, 2019).

Todos esses estudos são apenas uma parcela da quantidade de pesquisas que vêm sendo desenvolvidas com lectinas vegetais, e é notória a gama de aplicações biotecnológicas nas quais essas proteínas podem estar envolvidas, ainda mais se considerarmos que elas podem estar presentes em todas as partes de uma planta. Apesar do processo de purificação de lectinas não ser algo trivial, é de bastante valia, visto que se busca isolar e caracterizar o princípio ativo de uma planta (o que já muito complexo e relevante), investigar sua possível ação biológica e tentar justificar e dar validade a sua utilização pelas pessoas no tratamento de doenças.

4. METODOLOGIA

4.1. Obtenção do material

A entrecasca da espécie *A. cochliacarpus* (barbatimão) foi coletada na reserva ambiental de Mata Atlântica, na cidade de Coruripe – Alagoas. O material adquirido foi encaminhado para o herbário do Instituto do Meio Ambiente do Estado de Alagoas (IMA), onde foi realizada a identificação da espécie. Em seguida, foi conduzido até o Laboratório de Metabolismo e Proteômica, da Universidade Federal de Alagoas, onde foi preparado para trituração em liquidificador até a condição de pó e então colocado para secagem, em bandejas plásticas esterilizadas, que foram levadas à estufa a 35°C e permaneceram por sete dias até estarem totalmente secas. O pó foi acondicionado no freezer a - 20°C.

4.2. Preparo do extrato bruto

Para extração de proteínas, o pó da entrecasca do barbatimão foi pesado (1,5 g) em balança analítica (Marte AY220) e transferido para um béquer de 50,0 mL. Logo após foram adicionados 15,0 mL de solução tampão de extração (fosfato de sódio 0,2 M pH 7,0). Para a extração dos compostos, a amostra ficou sob agitação magnética constante por 16 horas (Agitador magnético, IKA IKAMAG C-MAG HS7), a 4°C para evitar uma possível desnaturação da proteína de interesse. O extrato bruto obtido (EB) foi filtrado em algodão hidrófilo com auxílio de uma peneira para reter partículas sólidas.

4.3. Remoção de metabólitos secundários

Para remover metabólitos secundários e clarificar a amostra, o extrato bruto foi filtrado em carvão ativado. Uma seringa de 5 mL foi empacotada com carvão ativado e conectada a uma mangueira tipo Equipo. Com o auxílio de outra seringa que proporcionou a sucção pela pressão, foram eluídos dois volumes (10 mL) de água ultrapura e, em seguida, aplicou-se a amostra, que passou a ser chamada de extrato bruto filtrado (EB_f).

4.4. Cromatografia em matriz de quitina

Uma alíquota (1000 µL) do extrato bruto filtrado em carvão ativado foi aplicada em coluna cromatográfica (14 cm x 1,5 cm) composta por matriz de quitina (Figura 6). A coluna foi equilibrada com NaCl 0,15 M (dois volumes da coluna), que também serviu como primeiro eluente para iniciar a cromatografia. Em seguida foi eluída solução de NaCl 1 M e, por fim, solução de ácido acético 1 M. As frações foram coletadas em alíquotas de 2 mL, totalizando 60 tubos, 20 para cada eluente. As frações foram avaliadas quanto à absorbância em espectrofotômetro (Varian Cary 50) a 280 nm e analisadas em relação à atividade hemaglutinante (AH). O pico proteico ativo obtido foi dialisado por 3 h contra tampão fosfato de sódio 0,2 M pH 7,0 para a remoção do ácido acético, avaliado quanto à dosagem proteica e novamente medida a sua AH. O dialisado foi denominado por AcBL (lectina de entrecascas de *Abarema cochliacarpos*).

Figura 6 – Coluna cromatográfica em matriz de quitina utilizada no isolamento parcial de AcBL.



Fonte: Elaborado pela autora (2020).

4.5. Teste de atividade hemaglutinante (AH)

O teste de atividade hemaglutinante (AH) foi realizado em placas de microtitulação com fundo em formato “v”, de acordo com a metodologia descrita por Paiva e Coelho (1992). Alíquota (50 μ L) da amostra foi diluída serialmente em NaCl 0,15 M antes da adição de 50 μ L de suspensão (2,5 % v/v) de eritrócitos de coelho. A AH (título⁻¹) foi expressa como o inverso da maior diluição da amostra que promove hemaglutinação. A atividade específica (AHE) foi definida pela razão entre o título e a concentração proteica (mg/mL).

4.6. Dosagem proteica

As diferentes amostras obtidas durante as etapas de extração, filtração e cromatografia 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 μ L das amostras diluídas (1: 10) e 190 μ L de reagente de Bradford. Posteriormente as amostras foram incubadas por 5 min, e medido a absorbância a 595 nm. As unidades correspondentes são (mg/mL) de proteína.

4.7. Eletroforese

O maior pico protéico (frações com as maiores absorvâncias medidas) verificado no cromatograma foi o que obteve maior atividade hemaglutinante. Após a diálise, parte desta amostra, ainda na membrana de diálise, foi colocada em contato com PEG (polietilenoglicol) para concentrá-la. Essa alíquota concentrada foi então submetida à eletroforese para avaliar o grau de pureza proteica, bem como aferir se a metodologia de purificação poderia ser efetivamente confirmada.

A eletroforese ocorreu em gel de poliacrilamida a 9%, em presença de dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE), de acordo com a metodologia descrita por Laemmli (1970). Os géis foram preparados sob condição não redutora e redutora (na presença de β -mercaptoetanol). A coloração foi realizada com 0,4 g de nitrato de prata (AgNO_3) diluído em 2 mL de água deionizada (solução A) acompanhada da solução B (126 μL de NaOH 10 M + 10,4 mL de água + 1,250 mL de NH_4OH). A solução A foi misturada lentamente sob agitação na solução B, e o volume ajustado para 50 mL, resultando na solução C. O gel permaneceu nessa solução por 15 minutos e depois foi lavado três vezes em água, com trocas a cada três minutos. Em seguida, o gel foi imerso em solução reveladora (25 μL de ácido cítrico + 25 μL de formaldeído + 50 mL de água deionizada) durante o tempo necessário para visualização de bandas proteicas.

4.8. Dosagem de fenóis

O conteúdo de fenol do extrato bruto, extrato bruto filtrado e de AcBL foi determinado usando o método de Folin-Ciocalteu com base na redução de reagente ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico em meio alcalino (MORAIS et al., 1999). A reação foi feita com 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu diluído 1:10 em água destilada, 2 mL de carbonato de sódio a 75 g/L e 0,5 mL das amostras que foram incubadas a 50 °C por 5 min. Após arrefecimento durante 30 min, a absorvância foi medida a 760 nm. O teor de fenol foi determinado com base em uma curva padrão de ácido tânico (9, 6, 48 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$).

4.9. Teste de inibição da AH por carboidratos e glicoproteínas

A inibição da AH foi avaliada utilizando carboidratos e glicoproteínas como descrito por Napoleão et al. (2011). Foram testadas soluções na concentração de 200 mM para os carboidratos glicose, frutose, galactose, metil-D-glicopiranosídeo, sacarose, lactose, arabinose, N-acetilglicosamina e 0,5 mg/mL para a glicoproteína caseína. Alíquotas de 50 µL da amostra foram submetidas à incubação inicial em solução de carboidrato/glicoproteína dissolvido em NaCl 0,15 M durante 15 minutos. Em seguida foram adicionadas 50 µL de suspensão de eritrócitos (2,5 % v/v) nos poços da placa de microtitulação e incubadas por um período de 45 minutos. Uma alíquota de 50 µL da amostra diluída serialmente em igual volume de solução salina de NaCl 0,15 M incubada com 50 µL de suspensão de eritrócitos de coelho foi usado como controle positivo. A inibição é quantificada em razão da redução da AH quando comparado com o controle positivo.

4.10. Avaliação do efeito da temperatura e do pH na AH

O teste de estabilidade térmica foi feito mantendo alíquotas de 400 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 min, 25°C) para remover precipitados, caso fosse formado, e em seguida foi realizado a atividade hemaglutinante do sobrenadante e quantificado em razão do título. Todos os ensaios foram feitos em triplicata.

O ensaio para avaliar a estabilidade da lectina parcialmente purificada da casca de *A. cochliacarpus* em diferentes valores de pH foi feito 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 200 mM (pH 3,0 – 4,0), Acetato de sódio 200 mM (pH 5,0 - 6,0) Fosfato de sódio 200 mM (pH 7,0), Tris-HCl 200 mM (pH 8,0) e Glicina-NaOH 200 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 coelho, para verificação da melhor AH.

4.11. Avaliação do efeito do EDTA e de íons divalentes sobre AH

A influência de cátions divalentes (Ca^{2+} e Mg^{2+}) e do EDTA (agente quelante) para a atividade hemaglutinante foi determinada conforme adaptações do método de PAJIC et al. (2002). A amostra (1000 μL) foi dialisada contra EDTA 5 mM por 4 horas, com troca a cada hora e contra as soluções de Ca^{2+} e Mg^{2+} a 10 mM. Uma alíquota (50 μL) foi retirada e avaliada a atividade hemaglutinante.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Extração e remoção de metabólitos secundários

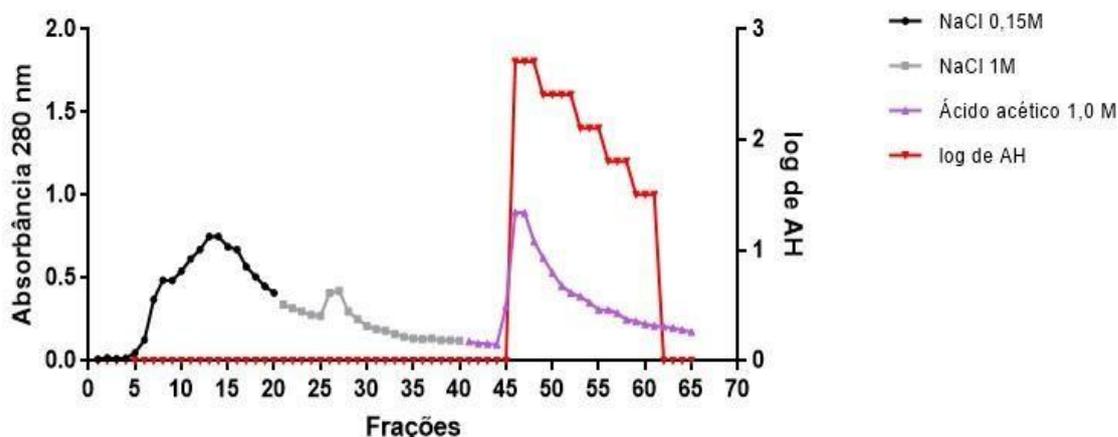
O extrato bruto de *A. cochliacarpos*, que apresentou atividade hemaglutinante específica de 1.349 e teor de proteínas igual a 0,759 mg/mL, foi tratado com carvão ativado, visto que metabólitos secundários, como taninos, podem interferir na atividade hemaglutinante de lectinas e que extratos vegetais podem ser ricos nesses compostos (Costa et al., 2018). Após a etapa de filtração, o filtrado obtido (AHE: 1.323) exibiu um teor de proteínas bem menor que o extrato bruto (0,387 mg/mL), porém manteve alta a sua atividade hemaglutinante específica, indicando que o tratamento com carvão não provocou perda de atividade lectínica, mas reteve compostos que poderiam estar contribuindo para um falso positivo na AH (Tabela 2).

Para confirmar a eficácia da filtração em carvão ativado na remoção de metabólitos secundários, foi determinado o teor total de compostos fenólicos do EB e do EB_f. Os valores obtidos foram 0,95 mg/mL e 0,41 mg/mL, respectivamente, indicado que quase 60% dos fenóis foram retidos apenas nesta etapa. O tratamento com carvão ativado também foi efetivo na remoção de fenóis do extrato de folhas de *S. terebinthifolius* durante os procedimentos de isolamento da lectina SteLL (Gomes et al., 2013).

5.2. Isolamento parcial de AcBL

Foram obtidos 0,170 mg de proteínas utilizando 0,2 M de tampão fosfato de sódio pH 7,0 como solução de extração. O pico proteico ativo obtido da cromatografia e dialisado em seguida, foi denominado por AcBL (lectina de entrecascas de *Abarema cochliacarpos*).

Figura 7 – Perfil cromatográfico da cromatografia em matriz de quitina.



Fonte: Elaborado pela autora (2020).

O cromatograma do extrato bruto filtrado mostra que os picos eluídos inicialmente com NaCl 0,15 M e 1 M não apresentaram atividade hemaglutinante, indicando que os componentes presentes nessas frações não eram lectinas (Figura 7). Somente após eluição com ácido acético foi possível obter as frações contendo lectinas, fato este comprovado através do ensaio de hemaglutinação. Em apenas um passo cromatográfico foi possível purificar parcialmente a lectina de entrecasca de *A. cochliacarpus* (Tabela 2).

Tabela 2 – Purificação parcial da lectina da entrecasca de *A. cochliacarpus*.

Amostra	Volume (mL)	Proteínas (mg/mL)	Proteína total (mg)	AH	AHE	Fator de purificação	Rendimento (%)
EB	11,5	0,759	8,73	1024	1.349	1	100
EB _f	9,4	0,387	3,64	512	1.323	0,98	40
AcBL	56,4 mL	0,003	0,170	512	170.667	126.513	246

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).

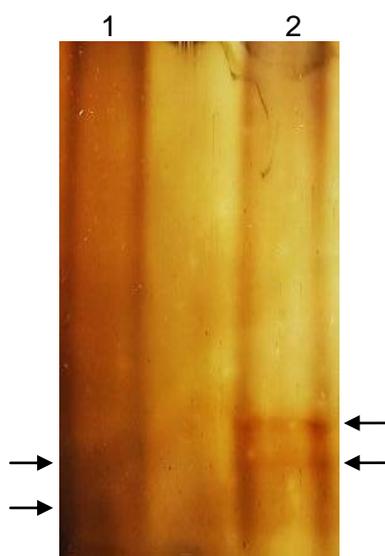
Várias lectinas já foram purificadas em apenas um passo por meio de matriz de quitina, como exemplos, a WSMoL, isolada de sementes de *Moringa oleífera* e DeL isolada de sementes de *D. ecastophyllum* (L.) Taub, conhecida como marmelo do mangue (FERREIRA et al., 2011; CORREIA, 2019).

Observando a Tabela 2, a atividade hemaglutinante observada no extrato bruto filtrado foi a mesma para AcBL (512), porém a concentração de proteínas nesta foi significativamente menor (0,003 mg/mL) que aquela (0,387 mg/mL). Este fato justifica tanto a alta AHE (170.667) quanto o expressivo rendimento (246%) no isolamento de AcBL. Esse alto rendimento obtido pode ser reflexo da eliminação de taninos do EB, após o tratamento com carvão ativado e a cromatografia em quitina. A dosagem de fenóis mostrou que aproximadamente 90% desses compostos foram eliminados da amostra (fenóis totais de AcBL: 0,12 mg/mL), se comparada com o EB. De acordo com Gomes e colaboradores (2013), compostos de fenol podem formar complexos solúveis ou insolúveis com proteínas, interferindo, dessa forma, em sua atividade biológica. Os autores citam ainda que a eliminação de inibidores da atividade de aglutinação também contribui para a alta taxa de recuperação. Logo, a remoção de metabólitos secundários e de inibidores de lectinas pode justificar o elevado rendimento no processo de purificação de AcBL.

5.3. Eletroforese SDS-PAGE

A eletroforese em condições desnaturantes a 9% (Figura 8) mostrou a presença de duas bandas proteicas em condições redutoras e não-redutoras, utilizando B-mercaptoetanol.

Figura 8 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 9% - 1: AcBL em condições desnaturantes e não redutora, 2: AcBL em condições desnaturantes e redutora.



Fonte: Elaborado pela autora (2020).

Este resultado mostra que as duas proteínas não possuem duas ou mais subunidades ligadas por ligações dissulfeto. Essas ligações covalentes são muito fortes se comparadas às interações intermoleculares, porém, em contato com agentes redutores, elas podem ser desfeitas e as subunidades separadas. Uma possibilidade a ser considerada é que sejam duas isoformas da lectina. Sousa (2018) obteve resultado semelhante ao realizar eletroforese em SDS-PAGE com a lectina CCL (lectina da esponja marinha *Chondrilla caribensis*).

5.4. Teste de Inibição da AH por carboidratos e glicoproteínas

A fim de caracterizar a lectina de entrecascas de *A. cochliacarpus* quanto à especificidade, a atividade hemaglutinante de AcBL foi avaliada frente a alguns carboidratos e glicoproteína (Tabela 3). O teste de inibição pode indicar por quais carboidratos ou glicoproteínas as lectinas tem especificidade, pois devido a característica fundamental dessas proteínas se ligarem a açúcares, essas espécies podem inibir a AH pelo comprometimento do domínio de ligação a carboidratos. Uma vez que essa região já está ocupada pelos carboidratos livres em solução, as lectinas são parcialmente ou totalmente impedidas de interagir com os açúcares presentes na superfície dos eritrócitos, resultando na precipitação dessas células.

Tabela 3 - Teste de inibição da atividade hemaglutinante de AcBL por carboidratos e glicoproteína.

LIGANTE	AH (AcBL)
Controle Negativo	512
Glicose	512
Frutose	512
Galactose	512
Metil-D-Glicopirranose	512
Sacarose	512
Lactose	512
Arabinose	128
N-acetilglicosamina	512
Caseína (glicoproteína)	0

Fonte: Elaborado pela autora (2020).

Dos carboidratos testados, somente arabinose reduziu parcialmente a AH. Porém a caseína, uma glicoproteína, conseguiu inibir totalmente a atividade de AcBL, indicando que a região de ligação a carboidratos dessa lectina interage melhor com a porção glicídica da caseína do que com os monossacarídeos e os dissacarídeos. Comportamento semelhante foi descrito por Silva et al. (2016) sobre PgTeL, que foi inibida por caseína e ovalbumina, mas não pelos monossacarídeos testados. Os autores relatam que lectinas com DRC de tamanho estendido podem ligar-se preferencialmente a glicoproteínas, a fim de que a porção de açúcar desses glicoconjugados se encaixem à lectina em uma geometria mais favorável. Desta forma, carboidratos simples não se conectam bem na região de ligação, conferindo a estes baixa afinidade com a lectina.

O carboidrato derivado da glicose, N-acetilglicosamina, não inibiu a atividade de AcBL, porém esta molécula é o monômero do polímero quitina, matriz utilizada no isolamento descrito neste trabalho. Como as lectinas se ligaram reversivelmente a esta matriz, mas não foi inibida pelo monômero que constitui a quitina, sugere-se que essa coluna não somente pode funcionar em cromatografia de afinidade, como realizado por Gifoni (2009) ao isolar uma proteína ligante de quitina e obter um pico proteico ao eluir com N-acetilglicosamina, mas esse tipo de matriz também pode ser utilizada em cromatografia de troca iônica, possuindo carga positiva, por seu caráter básico, e ligando-se a componentes da fase móvel que tenham carga negativa, possuindo caráter ácido. Por esta razão, muitos trabalhos envolvendo purificação de proteínas não especificam o tipo de cromatografia, apenas descrevem que o procedimento cromatográfico ocorreu em matriz de quitina, como feito por Sá et al. (2009) e Gomes et al. (2013).

Outra justificativa para esta situação pode ser que o encaixe de AcBL com o polímero (quitina) seja mais favorável do que com o monômero (N-acetilglicosamina), o que condiz com o fato de que apenas a glicoproteína foi capaz de inibir a AH dessa lectina, devido ao tamanho de sua região de ligação a carboidratos.

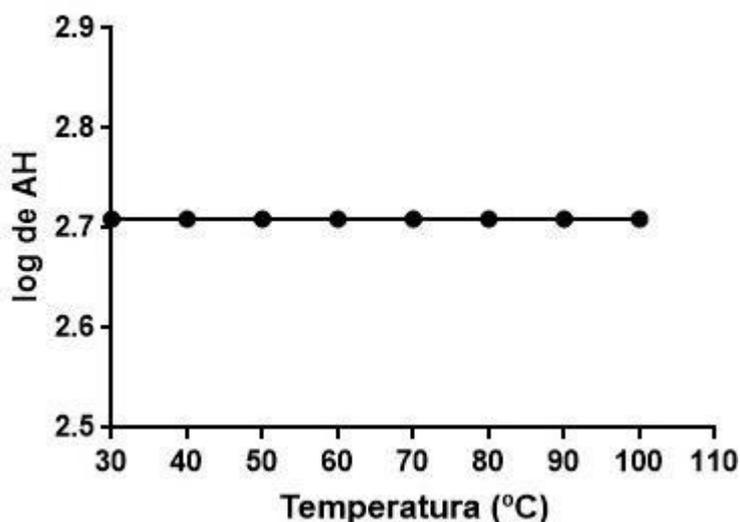
A afinidade existente entre AcBL e quitina é um fator importante para uma possível avaliação do efeito dessa lectina frente a fungos patogênicos, pois esses microrganismos possuem parede celular constituída de quitina. Tem sido

demonstrado que lectinas podem interagir com esse polissacarídeo em fungos e causar danos na parede celular fúngica, promovendo, conseqüentemente, estresse oxidativo e ruptura das células. Essa ação antifúngica foi relatada por Silva et al. (2018) sobre PgTeL, a lectina encontrada na sarcotesta de *Punica granatum* (romã).

5.5. Efeito da temperatura e do pH na AH

As proteínas podem perder a integridade de sua estrutura tridimensional e, conseqüentemente, perder sua função. Este processo é chamado de desnaturação e a maioria dessas biomoléculas pode ser desnaturada por fatores como calor e pH extremos. O aumento da temperatura pode afetar as interações fracas da proteína, como as ligações de hidrogênio (NELSON e COX, 2014). AcBL foi testada em uma faixa de temperatura de 30 °C a 100 °C e se mostrou resistente em todo o intervalo, ou seja, sua atividade não foi afetada pelo calor (Figura 9).

Figura 9 - Efeito da temperatura na AH.



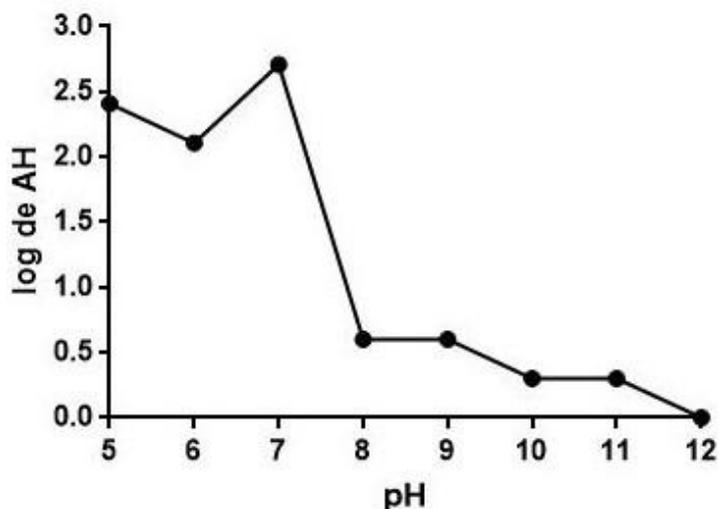
Fonte: Elaborado pela autora (2020).

Lectinas vegetais possuem predominantemente folhas β na organização de sua estrutura tridimensional além da presença de ligações dissulfetos (CAMPANA et al., 2011; BOSE et al., 2016) conferindo maior rigidez à essas proteínas. Essa característica pode justificar a estabilidade dessas macromoléculas frente a diferentes temperaturas.

Da Silva et al. (2019) relataram um comportamento semelhante da lectina isolada da raiz de *Portulaca elatior* (PeRoL), que não foi afetada pelo aquecimento. GaBL, lectina isolada da casca do jenipapo, também apresentou notável termoestabilidade até 120 °C, porém a lectina da folha de *Bauhinia cheilantha* (mororó) teve sua atividade totalmente perdida acima de 60 °C, ou seja, esta temperatura foi suficiente para que as interações que mantinham sua estrutura tridimensional fossem rompidas, promovendo sua desnaturação (CRUZ, 2015; COSTA et al., 2018).

Extremos de pH também desnaturam proteínas. Através da alteração da sua carga líquida, ocorre a repulsão eletrostática e o rompimento de ligações de hidrogênio, resultando na desnaturação (NELSON e COX, 2014). O teste de estabilidade frente a soluções com diferentes valores de pH (Figura 10) demonstrou que AcBL é mais estável em pH ácido e neutro, possuindo maior atividade em pH 7. Acima desse valor (pH 8 e 9) ocorre um decaimento significativo na AH, diminuindo um pouco mais em pH 10 e 11, e perdendo total atividade em pH 12.

Figura 10 - Efeito do pH na AH.



Fonte: Elaborado pela autora (2020).

A protonação dos grupos ionizáveis presentes nos grupamentos amino-terminal, carboxi-terminal e cadeias alquilas laterais dos aminoácidos, causada pela adição de íons H^+ , pode provocar mudanças na estrutura e função das proteínas, aumentando ou diminuindo a atividade que exercem (NELSON e COX, 2014).

Valores de pH abaixo de 5 não foram considerados nesse teste, visto que, de acordo com Ivanov (1999), a alta acidez pode provocar a hemólise de eritrócitos através da lesão oxidativa das membranas, provocada pela entrada do ácido no citosol. Assim, torna-se inviável avaliar a atividade hemaglutinante em valores de pH tão baixos.

A lectina das sementes de *Parkia platycephala* (faveira-preta) demonstrou ter estabilidade ao pH semelhante a AcBL, pois as maiores atividades hemaglutinantes também foram observadas em pH 5, 6 e 7, diminuindo consideravelmente do pH 8 em diante. Já a lectina das sementes de *Pueraria Montana* (kudzu) mostrou ser mais ativa em condições de neutralidade e basicidade (pH 7 a 9), tendo sua atividade perdida nos extremos de pH (DA SILVA, 2018). A lectina isolada da casca de *Schinus terebinthifolius* por Silva (2017) apresentou estabilidade em pH ácido (maiores atividades) e básico, porém em pH neutro sofreu um decréscimo significativo em sua atividade. O autor deduz que esse pH refere-se ao ponto isoelétrico da proteína, onde sua carga líquida é anulada, ocorrendo a precipitação e consequente perda de atividade da mesma.

A estabilidade de AcBL em diferentes valores de pH e temperaturas é uma característica físico-química desejável para seu uso biotecnológico. Além do mais, AcBL está mais ativa em temperaturas e pH próximos ao encontrado no corpo humano (37 °C; pH 6,5-7,5), indicando seu uso potencial no tratamento de doenças infecciosas humanas, por exemplo.

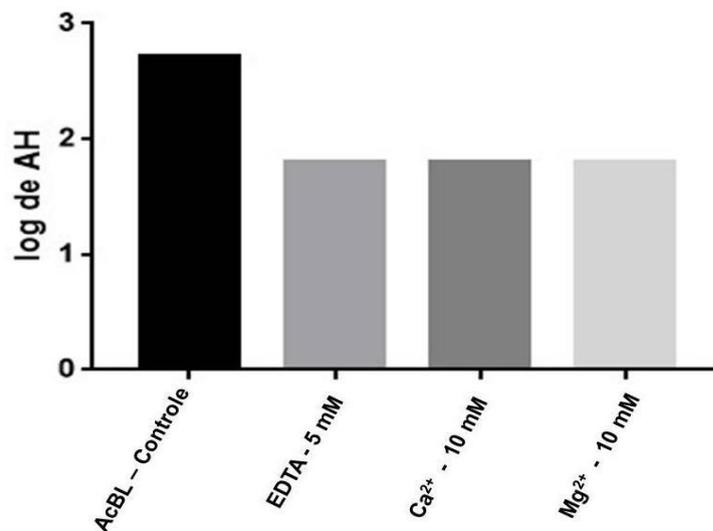
5.6. Efeito do EDTA e íons divalentes na AH

As proteínas podem ser classificadas como simples, quando contém somente aminoácidos em sua estrutura, ou conjugadas, quando exibem componentes químicos associados à cadeia polipeptídica. Estes componentes constituem o grupo prostético da proteína, e podem ser diferenciados de acordo com sua natureza. Glicoproteínas, por exemplo, são proteínas conjugadas que contém glicídios como grupo prostético. Quando há metais associados à estrutura proteica, esta é chamada de metaloproteína. Geralmente essa associação é importante para o desempenho da função biológica da proteína (NELSON e COX, 2014).

Lectinas podem ter sua atividade influenciada por grupos prostéticos, tais como íons divalentes de cálcio, magnésio, zinco e manganês. Para verificar se são dependentes desses metais, pode ser feito o tratamento com EDTA (ácido etilenodiaminotetracético), que age como quelante, complexando íons metálicos, e provocando a perda da atividade hemaglutinante.

Ao ser testada contra soluções de íons divalentes e EDTA (Figura 11), AcBL teve sua atividade igualmente reduzida (cerca de 33 % menor que o controle). A diminuição da atividade provocada pelo EDTA pode indicar que a lectina é dependente de algum íon que foi complexado pelo mesmo, com exceção de Ca^{2+} e Mg^{2+} que também reduziram a AH de AcBL.

Figura 11 - Efeito do EDTA e de íons divalentes na AH.



Fonte: Elaborado pela autora (2020).

Silva et al. (2010) avaliaram a influência de cátions divalentes e de EDTA sobre a lectina da folha de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), e os resultados sugeriram que essa lectina não depende de íons metálicos para exercer sua atividade. Em contrapartida, a AH da lectina de sementes de *Andira surinamensis* (angelim) foi afetada após tratamento com EDTA, mas recuperou significativamente sua atividade após a adição de cátions divalentes (NOBRE, 2012).

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, considerando seus objetivos iniciais, bem como a importância de se isolar novas proteínas com relevância regional e com elevado potencial biotecnológico, algumas adaptações de protocolo são necessárias, sobretudo na perspectiva de confirmar a purificação de AcBL. Na continuidade deste projeto, poderá ser aperfeiçoado o processo de remoção dos metabólitos secundários, a fim de eliminá-los totalmente. Além disso, a amostra proteica ativa proveniente da cromatografia em matriz de quitina e dialisada será aplicada em uma coluna de gel filtração, para separar as duas isoformas de lectina que possuem massas moleculares distintas. Com a purificação total, serão realizados testes biológicos para avaliar as bioatividades da lectina e caracterizá-la quanto às aplicações biotecnológicas, além da submissão de artigos em periódicos internacionais.

6. CONCLUSÃO

✓ Nesse estudo foi possível identificar e realizar a purificação e caracterização parciais da lectina de entrecasas de *A. cochliacarpus*;

✓ Metabólitos secundários foram removidos do extrato bruto significativamente através do tratamento com carvão ativado;

✓ O pico proteico ativo obtido da cromatografia em matriz de quitina apresentou expressiva atividade hemaglutinante específica e rendimento;

✓ Não foi possível confirmar a purificação da lectina através de eletroforese SDS-PAGE em condições redutoras e não redutoras;

✓ Lectina de entrecasas de *A. cochliacarpus* foi igualmente estável no intervalo de temperatura de 30 °C a 100 °C, demonstrou ter pH ótimo em 7,0 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 AcBL foi reduzida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, Diogo Filipe Loureiro dos Santos. **Estudo das vias metabólicas das plantas na síntese de pigmentos naturais**. 2017. Tese de Doutorado.

ALMEIDA, Mara Zélia de. **Plantas medicinais: abordagem histórico contemporânea**. Plantas Mediciniais [online], v. 3, p. 34-66, 2011.

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

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

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

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

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

BARBOSA, Shirley Pricila Vasconcelos. **Alelopatia, biometria e germinação de barbatimão (*Abarema cochliacarpus* (Gomes) Barneby & Grimes) (FABACEAE)**. 2015. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Alagoas.

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

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

BRADFORD, Marion M. Um método rápido e sensível para a quantificação de quantidades de microgramas de proteína, utilizando o princípio da ligação proteína-corante. **Bioquímica analítica**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Biodiversidade Brasileira**. 2020. Disponível em: < <https://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira>>. Acesso em 15 de janeiro de 2020.

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

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

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

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

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

COSTA, Ricardo Bezerra et al. Purification and characterization of a lectin with refolding ability from *Genipa americana* bark. **International journal of biological macromolecules**, v. 119, p. 517-523, 2018.

CRUZ, Deize Raquel dos Reis. **Isolamento, purificação e caracterização parcial da lectina de folhas de *Bauhinia cheilantha* (BONGARD) Steudel, nativa do bioma Caatinga**. 2015. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Vale do São Francisco.

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.

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

DA SILVA, Maria Silene et al. *Abarema cochliacarpus*: Gastroprotective and ulcer-healing activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 132, n. 1, p. 134-142, 2010.

DA SILVA, Maria Silene et al. Anti-inflammatory intestinal activity of *Abarema cochliacarpus* (Gomes) Barneby & Grimes in TNBS colitis model. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, n. 2, p. 467-475, 2010.

DA SILVA, Rafael Carvalho. **Extração, identificação e caracterização parcial de lectinas com possível efeito antinutricional de leguminosas utilizadas na suplementação animal**. 2018. Monografia. Universidade Federal do Maranhão.

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

DE DAVID, Margô; GONÇALVES, Karina Gondolo; NETO, Germano Guarim. A SUBFAMÍLIA MIMOSOIDEAE (FABACEAE) PARA A FLORA DE MATO GROSSO, BRASIL. **Biodiversidade**, v. 14, n. 3, 2015.

DE OLIVEIRA, Caio Fernando Ramalho et al. A chitin-binding lectin from *Moringa oleifera* seeds (WSMoL) impairs the digestive physiology of the Mediterranean flour larvae, *Anagasta kuehniella*. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 142, p. 67-76, 2017.

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

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

FAZANARO, Fabiano. **Avaliação in vitro da interferência de lectinas vegetais e do diterpeno casbano isolado de *Croton nepataefolius* sobre o crescimento de formas planctônicas e biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa***. 2010.

FERREIRA, Érica Camila. As propriedades medicinais e bioquímicas da planta *Stryphnodendron Adstringens* “Barbatimão”. **Biológicas & Saúde**, v. 3, n. 11, 2013.

FERREIRA, Nathália Matos. **EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE UMA LECTINA DE SEMENTES DE *Bauhinia pulchella* BENTH**. 2017.

FERREIRA, RS et al. Coagulant and antibacterial activities of the water-soluble seed lectin from *Moringa oleifera*. **Letters in applied microbiology**, v. 53, n. 2, p. 186-192, 2011.

FIGUEIRÔA, Evelyne de Oliveira et al. As lectinas pCramoll e rCramoll induzem a morte celular em células de adenocarcinoma da próstata humano (PC-3) pelo

comprometimento da homeostase mitocondrial. **Toxicology in Vitro** , v. 43, p. 40-46, 2017.

GIFONI, Juliana Menezes. **Propriedades Bioquímicas e Funcionais de uma Proteína Ligante à Quitina Purificada de Sementes de *Moringa oleifera* Lamarck**. 2009.

GOMES, Francis Soares. **Purificação e caracterização de lectinas e inibidor de tripsina presentes em tecidos de *Myracrodruon urundeuva* e *Schinus terebinthifolius*: ação antimicrobiana de preparações**. 2013.

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

GONÇALVES, A. L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. **Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas**. Arquivos do Instituto Biológico, v. 72, n. 3, p. 353-358, 2005.

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

GUERRA, Ethiene; MORIM, Marli Pires; IGANCI, JOÃO RICARDO VIEIRA. A new species of *Abarema* (Fabaceae) from Brazil. **Phytotaxa**, v. 289, n. 1, p. 77-82, 2016.

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

Iganci, J.R.V., Morim, M.P. 2015. **Abarema** in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB17974>>. Acesso em 20 de janeiro de 2020.

IGANCI, Joao RV; MORIM, Marli P. *Abarema* (Fabaceae, Mimosoideae) in the Atlantic Domain, Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 168, n. 4, p. 473-486, 2012.

IUCN. **Salvar a rede da vida**. 2012. Disponível em: <<https://www.iucn.org/node/11296>>. Acesso em 15 de janeiro de 2020.

IVANOV, IT A hemólise de eritrócitos induzida por pH baixo está relacionada à entrada do ácido no citosol e ao estresse oxidativo nas membranas celulares. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -Biomembranes** , v. 1415, n. 2, p. 349-360, 1999.

JESUS, Renata Patrícia Freitas Soares de. **Bioensaios de *Abarema cochliocarpa*** (Gomes) Barneby & Grimes (Leguminosae). 2010.

LAEMMLI, U. Clivagem de proteínas estruturais durante a montagem da cabeça do bacteriófago T4. **Nature** 227, 680-685 (1970).

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

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

LIMA, Vanessa Cristina Oliveira et al. ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE EM SEMENTES EXÓTICAS GERMINADAS E COMESTÍVEIS. **Revista Brasileira de Inovação Tecnológica em Saúde**. 2017.

MENDONÇA, Patrícia Calligioni de. **Caracterização da diversidade genética de *Stryphnodendron adstringens* (mart.) Coville por marcador molecular AFLP e transferência de microssatélites**. 2011.

MENEZES, Cristiane Lima. **Estudo Redox do extrato da fase acetato de *Abarema cochliacarpus* (Gomes) Barneby & JW Grimes (Fabaceae)**. 2016.

MISHRA, Abtar et al. Structure-function and application of plant lectins in disease biology and immunity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 134, p. 110827, 2019.

MONTEIRO, Luiz Gustavo et al. MONITORAMENTO TECNOLÓGICO DO POTENCIAL USO DOS EXTRATOS DE BARBATIMÃO. **Cadernos de Prospecção**, v. 11, p. 475, 2018.

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.

NASCIMENTO JUNIOR, José Adelson Alves do. **Avaliação do potencial antioxidante e atividade citotóxica de extrato metanólicos de plantas medicinais da caatinga**. 2016. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.

NAPOLEÃO, Thiago 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.; SANTOS, A. F. S.; LUZ, L. A. ; PONTUAL, E. V. ; PAIVA, P. M. G. ; COELHO, L. C. B. B. *Moringa oleifera*: A Powerful Source of Environmentally, Medicinally and Biotechnologically Relevant Compounds. In: Rusu Teodor. (Org.). **Advances in Applied Science and Technology**. 1ed. West Bengal: Book Publisher International, 2019, v. 5, p. 58-77.

NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Artmed Editora, 2014.

NOBRE, Camila Bezerra. **Caracterização físico-química e efeito sobre bactérias orais de uma lectina de sementes de *Andira surinamensis* (Bondt) Splitg. ex Amshoff**. 2012.

NONOSE, Yasmine; TRINDADE, Vera Maria Treis. **Isolamento e algumas características das isoformas da lectina de *Mikania laevigata* (guaco)**. Salão de Iniciação Científica. Livro de resumos. Porto Alegre: UFRGS, 2009.

OLIVEIRA, Jaqueline Franciele Caetano de et al. **Lectinas vegetais: de moléculas de defesa de plantas às suas diversas aplicações biotecnológicas**. 2018.

OLIVEIRA, Messias Vital de. **Determinação estrutural de uma lectina pró-inflamatória de sementes de *Vaitarea guianensis* (Aublet)**. 2017.

OLIVEIRA, Roseli F. et al. Avaliação da hepatotoxicidade de extratos de *Abarema cochliacarpus* em camundongos *Mus musculus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 4, p. 674-679, 2013.

OLIVEIRA, Roseli Fernandes et al. Use of *Abarema cochliacarpus* (Gomes) Barneby & JW Grimeson the skin burn treatment of wistar *Rattus norvegicus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 94, p. 302-306, 2013.

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, Patrícia MG et al. **Atividade inseticida de lectinas e metabólitos secundários**. In: Inseticidas - avanços no manejo integrado de pragas . 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, Julio G. et al. Eutirucallin: A lectin with antitumor and antimicrobial properties. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 7, p. 136, 2017.

PEREIRA JÚNIOR, Francisco Nascimento. **Caracterização estrutural parcial e biológica de uma lectina de sementes de *Dioclea reflexa* Hook F.** 2014.

PINTO JÚNIOR, Vanir Reis. **Análise da estrutura cristalográfica de DLyl, uma lectina de sementes de *Dioclea lasiophylla* Mart. ex Benth, e avaliação do seu efeito citotóxico contra glioma.** 2019.

PIRES, Andreza Maria Lima. **Estudo Fitoquímico de *Abarema cochliacarpus* (Gomes) Barneby & JW Grimes e *Calliandra depauperata* Benth.** 2011.

POPOVKIN, Alex. ***Abarema cochliacarpus* (Gomes) Barneby & JWGrimes.** 2010. Disponível em: <
[https://www.flickr.com/photos/plants_of_russian_in_brazil/5109775019/Abarema cochliacarpus \(Gomes\) Barneby & JWGrimes](https://www.flickr.com/photos/plants_of_russian_in_brazil/5109775019/Abarema_cochliacarpus_(Gomes)_Barneby_&_JWGrimes)>. Acesso em 20 de janeiro de 2020.

SÁ, Roberto A. et al. Atividades antibacterianas e antifúngicas do cerne de *Myracrodruon urundeuva*. **Ciência e Tecnologia da Madeira**, v. 43, n. 1-2, p. 85-95, 2009.

SÁNCHEZ-FIDALGO, S. et al. *Abarema cochliacarpus* reduz a resposta inflamatória induzida por LPS em macrófagos peritoneais murinos que regulam a via do sinal ROS-MAPK. **Jornal de etnofarmacologia**, v. 149, n. 1, p. 140-147, 2013.

SANTOS, Carilan Moreira Souza. **Desenvolvimento de adsorventes monolíticos macroporosos com concanavalina a immobilizada para a purificação de lectinas.** 2016. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

SANTOS, R. L. et al. **Diversidade de *Abarema* Pitter (Leguminosae-Mimosoideae) no herbário IAN (Embrapa Amazônia Oriental) Belém-Pará-Brasil.** In: Embrapa Amazônia Oriental-Resumo em anais de congresso (ALICE). In:

SIMPÓSIO DE ESTUDOS E PESQUISAS EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS NA AMAZÔNIA, 4., 2015, Belém, PA. Anais: resumos aprovados. Belém, PA: UEPA, 2015.

SANTOS, Valdenice Ferreira dos. **Extração e caracterização parcial de uma lectina das sementes de *Camptosema rubicundum* HOOK. & ARN.** 2018.

SHARON, Nathan; LIS, Halina. História das lectinas: das hemaglutininas às moléculas de reconhecimento biológico. **Glycobiology**, v. 14, n. 11, p. 53R-62R, 2004.

SILVA, Josiane Ferreira da. **Otimização da imobilização de carboidratos em matrizes macroporosas para a purificação de lectinas por afinidade.** 2018. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

SILVA, Maria Cristina et al. Extração da lectina da folha de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e o efeito de cátions divalentes na atividade hemaglutinante. **Food Science and Technology**, v. 30, p. 103-107, 2010.

SILVA, Michele D. C da. **Aplicações biotecnológicas das lectinas ClaveLL (*Cladonia verticillaris* Lichen Lectin) E BmoLL (*Bauhinia monandra* Leaf Lectin).** 2008.

SILVA, Nina CB et al. Antinociceptive effects of *Abarema cochliacarpus* (BA Gomes) Barneby & JW Grimes (Mimosaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1A, p. 46-50, 2009.

SILVA, Pollyanna Michelle da. **Caracterização estrutural e avaliação da atividade antimicrobiana da lectina da testa de *Punica granatum* L.** 2015. Dissertação de Mestrado. UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO.

SILVA, Pollyanna M. et al. The juicy sarcotesta of *Punica granatum* contains a lectin that affects growth, survival as well as adherence and invasive capacities of human pathogenic bacteria. **Journal of functional foods**, v. 27, p. 695-702, 2016.

SILVA, Pollyanna Michelle et al. PgTeL, a lectina encontrada no suco de *Punica granatum*, é um agente antifúngico contra *Candida albicans* e *Candida krusei*. **Revista internacional de macromoléculas biológicas**, v. 108, p. 391-400, 2018.

SILVA, Roberto José Amaro da et al. **Isolamento e caracterização de uma nova lectina da casca de *Schinus terebinthifolius* (aroeira-da-praia)**. 2017.

SOUSA, Andressa Rocha de Oliveira. **Purificação e caracterização bioquímica de uma nova lectina da esponja marinha *Chondrilla caribensis* Rützler, Duran & Piantoni, 2007**. 2018.

SOUZA, Ueric José Borges de et al. **Caracterização parcial e tamanho do genoma de *Stryphnodendron adstringens* (Leguminosae)**. 2019.

TAMASHIRO, J. Y.; ESCOBAR, G. Subfamília Mimosoideae. **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**, v. 8, p. 84-166, 2016.

TENÓRIO, Rodrigo Ferreira Lima et al. Atividade antibacteriana in vitro do extrato de *Abarema cochliacarpus* (Gomes) Barneby & JW Grimes contra bactérias isoladas de feridas cutâneas de cães. **Ciência Animal Brasileira**, v. 17, n. 2, p. 252-259, 2016.

TENORIO, Rodrigo Ferreira Lima. **Avaliação do conhecimento dos tutores de cães e gatos atendidos no hospital veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco sobre plantas medicinais e da atividade antimicrobiana in vitro do barbatimão (*Abarema cochliacarpus*) em bactérias isoladas de feridas cutâneas de cães**. 2012.

VASCONCELOS, Mayron Alves de. **Atividade das lectinas de *Canavalia brasiliensis* e *Canavalia ensiformis* sobre o crescimento “in vitro” de *Rhizobium tropici***. 2010.