



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

RICARDO BEZERRA COSTA

**PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE
ANTIFÚNGICA E CITOTÓXICA DA LECTINA DE CASCA DE
Genipa americana (JENIPAPO)**

MACEIÓ

2018

RICARDO BEZERRA COSTA

**PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE
ANTIFÚNGICA E CITOTÓXICA DA LECTINA DE CASCA DE
Genipa americana (JENIPAPO)**

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

2018

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

Bibliotecária Responsável: Janis Christine Angelina Cavalcante

C837p Costa, Ricardo Bezerra.
Purificação, caracterização e avaliação de atividade antifúngica e citotóxica da lectina de casca de *Genipa americana* (Jenipapo) / Ricardo Bezerra Costa. – 2018.
98f. : il. color., grafs., tabs.

Orientador: Francis Soares Gomes.
Coorientadora: Maria Luiza Vilela Oliva.
Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Biologia Molecular) – Universidade Federal de Alagoas. Escola de Enfermagem e Farmácia. Maceió, 2018.

Bibliografia: f. 74-98.

1. *Genipa americana*. 2. Lectina. 3. Proteína hemaglutinante. 4. Plantas medicinais. I. Título.

CDU: 577.112:63

RICARDO BEZERRA COSTA

**PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE
ANTIFÚNGICA E CITOTÓXICA DA LECTINA DE CASCA DE
Genipa americana (JENIPAPO)**

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.

Aprovado em 05 de março de 2018.

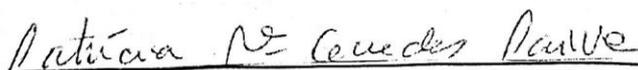


PROF. DR. FRANCIS SOARES GOMES (Orientador)
UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

BANCA EXAMINADORA



PROF. DR. HUGO JUAREZ VIEIRA PEREIRA (Avaliador Interno)
UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS



PROF. DR^a PATRÍCIA MARIA GUEDES PAIVA (Avaliadora Externa)
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

As minhas maiores Riquezas,
Pérola Eduarda e Crystal Isabella, por
quem vivo incessantemente em busca de
um futuro melhor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS, pela sua proteção e toda ajuda nas horas de angústia e dor, por não ter me deixado desistir, sou grato por mudar a história da minha vida.

A mamãe, a quem dedico essa etapa da minha vida, por ter feito de mim quem sou, tenho orgulho de ser seu filho, mamãe. A minha irmã Alais Costa por toda a torcida de sempre, ao generoso Pai que Deus colocou em nossas vidas, Paulo Santana, a quem sempre incentivou os nossos estudos e a quem me ensinou o valor do conhecimento.

Sou grato as minhas filhas, Pérola Eduarda e Crystal Isabella, por suportar minhas muitas ausências por ter que trabalhar e estudar, para proporcionar a vocês momentos de maior conforto.

Aos meus tios a quem tenho grande apreço, em especial ao meu padrinho Edivaldo Bezerra Costa, que ajudou a mamãe a nos criar, e por ter sido desde sempre minha grande fonte inspiradora, meu grande amigo e meu ajudador.

Ao Amigo, Professor e Orientador Dr. Francis Soares Gomes, por ter sido seu primeiro orientando, sou grato pela atenção, amizade e esclarecimentos, e muito mais por acreditar em mim, a quem me inspiro não só pelas palavras, mais muito mais pelos exemplos que seguirei nessa caminhada, sem dúvidas um ser Humano inexistente.

A Professora Dr^a. Maria Luiza Vilela Oliva pela ajuda e sugestões no trabalho, pela sua cordialidade e recepção em seu laboratório, na Universidade Federal de São Paulo – UNESP.

Ao professor Dr. Hugo Juarez Vieira, por todos os esclarecimentos, ensino, atenção, paciência, inclusive nas minhas dificuldades pessoais, sou grato por ter me mostrado muitos dos caminhos da bioquímica.

A professora e amiga Dr^a. Edma Carvalho de Miranda, a quem me ensinou muito do que sei cientificamente, mas a quem me ensinou algo que jamais poderei esquecer, “Que quem não vive para servir, não serve para viver”.

Aos professores Sônia Salgueiro, Melissa Landel, Emiliano de Oliveira, Luciano Meireles, por abrirem as portas de seus laboratórios para realização de nossos experimentos, juntamente com a essencial ajuda dos alunos colaboradores.

Aos amigos de laboratório – LAMP, Janaina, Gabriela, Laís, Roberto, Camila, Vanessa, João, Humberto, Fabiana, Dávida, Tatiele, Sarah, Ábner, Talita, Cleiton, Reginaldo, Nicolás, Josiel, Mariana, Camila, Juliana, Woodland, Marina, Gustavo, Ciro, Julianderson, Marcos, Rafael, enfim a todos que puderam de alguma forma compartilhar momentos bons e difíceis dos quais convivemos, sou grato pelas xícaras de café.

Aos amigos da USP LESTE EACH, a quem me receberam com tanto carinho, em especial a Prof^a Dr^a Patrícia Campana.

Ao meu amigo a quem sou muito grato e serei sempre, Cláudio Wilian, pessoa a quem dividi muitas tristezas, choro, alegrias, rizadas, mas acima de tudo pelos momentos de muita aprendizagem, sou grato pelas incontáveis noites que passamos junto, trabalhando e estudando e pela nossa amizade.

A Maria Elizabeth, minha irmã de laboratório, sou grato por me mostrar sua força e garra, por ser uma fonte inspiradora de perseverança e muita luz, sou grato pelas preocupações e por todo carinho, eu sou eterno grato a Deus por ter lhe conhecido.

A Marta Angelo, melhor IC que já tive o prazer de trabalhar durante esses anos, companheira de experimentos, a quem sempre foi muito prestativa, cuidadosa e presente, sou grato pela sua amizade.

Ao Cledson Barros, Humberto Tenório e Antonio Thomas, sou grato por todo o aprendizado, amizade, pelos experimentos e trabalhos que juntos realizamos, pelas horas maravilhosas de descontração e rizadas.

A Monizy Costa, somos irmãos incondicionais, sou grato pelo carinho, amor, amizade, preocupação, e por todo o bem a mim feito nesses últimos anos, muito obrigado por me ajudar a passar momentos tão difíceis, e por me estender a mão quando precisei.

Ao Programa de pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular – PPBqBM.

Aos órgãos de fomento CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

RESUMO

O uso da cultura do jenipapeiro *Genipa americana* apresenta grande potencial econômico e na medicina popular e isso se dá em decorrência da presença dos compostos bioativos presentes na espécie. Dentre estes, podemos citar a presença das lectinas, uma classe de proteína de extrema importância médica e biotecnológica, devido as suas atividades antifúngica, antitumoral, mitogênica, inseticida, e como um potente marcador biológico, devido a sua capacidade de ligar especificamente a carboidratos. Desse modo, o presente trabalho tem por objetivo identificar, purificar e caracterizar uma lectina da casca da *G. americana L.* assim como avaliar as atividades citotóxicas e antifúngica. O extrato da casca foi preparado em tampão Tris-HCl pH 8,0 50 mM, sob agitação constante durante 12 h a 4°C. Em seguida foi realizada precipitação salina utilizando ((NH₄)₂SO₄). A fração que apresentou maior atividade hemaglutinante (F1-20%) foi submetida à cromatografia de exclusão molecular (Sephacryl S-100) para possível isolamento. Através de um único passo cromatográfico foi isolada uma lectina (GaBL) e por meio de SDS-PAGE (10 %) foi observado que GaBL apresenta uma massa molecular aproximada de 242,5 KDa. A atividade hemaglutinante foi inibida por lactose e fetuina, mas não foi afetada por íons (Ca²⁺ e Mg²⁺). GaBL é classificada como uma proteína termoestável, pois se manteve ativa entre as temperaturas de 20°C-120°C durante 60 minutos, bem como entre os pH 5,0-10,0 com uma melhor atividade a uma temperatura abaixo de 60°C e pH 5,0. Dicroísmo circular de GaBL demonstrou a presença de elevado conteúdo de β-folha e estabilidade conformacional em ampla faixa de pH (4,0-11,0). A lectina purificada foi submetida ao teste antifúngico e mostrou potente atividade contra leveduras patogênicas, apresentando um MIC de 12,5 e 25 µg/mL, contra *Cryptococcus neoformans* e *Candida albicans*. No teste citotóxico GaBL não se mostrou tóxica para linhagens celulares de fibroblastos 3T3 em concentrações abaixo de 50 µg/mL. Com isso podemos destacar que GaBL é uma forte candidata antifúngica e com possível potencial contra células tumorais.

Palavras-chave: *Genipa americana*; lectina, planta medicinal, proteína hemaglutinante.

ABSTRACT

The use of the genipap culture *Genipa americana* presents great economic potential and in folk medicine and so on in case of suspension of the presence of the bioactive compounds present in the species. Among these, we can cite a presence of lectins, a narrow class of protein with medical and biotechnological importance due to its antifungal, antitumor, mitogen and insecticide activities, and as a potent biological marker, due to its ability to specifically bind to carbohydrates. We consider the importance shown by the vegetable city species, the present work by the objective, as a citation, as for example, the cytochemicals and antimicrobials. The bark extract was prepared in 50 mM Tris-HCl pH 8.0 buffer under constant stirring for 12 h at 4 ° C. Saline precipitation was then performed using $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$. A fraction that presented higher hemagglutinating activity (F1-20%) was submitted to the exclusion chromatography (Sephacryl S-100) for possible isolation. By a single chromatographic step to isolated a lectin (GaBL) and by means of SDS-PAGE (10%) it was observed that GaBL has an approximate molecular mass of 242.5 kDa. The hemagglutinating activity was inhibited by lactose and fetuin, but was not affected by ions (Ca^{2+} and Mg^{2+}). GaBL is classified as a thermostable protein because it remained active at between 30 ° C-120 ° C for 30 minutes as well as between pH 5.0-10.0 with better activity at a temperature below 60 ° C and pH 5.0. Circular dichroism of GaBL demonstrated the presence of high β -sheet content and conformational stability over a wide range of pH (4.0-11.0). The purified lectin was submitted to the antifungal test and showed potent activity against pathogenic yeasts, presenting a MIC of 12.5 and 25 $\mu\text{g} / \text{mL}$ against *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans*. In the cytotoxic GaBL test it was not shown to be toxic to cell lines of 3T3 fibroblasts at concentrations below 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. With this we can highlight that GaBL is a strong antifungal application with potential potential against tumor cells.

Keywords: *Genipa americana*; lectin, medicinal plant, hemagglutinating protein.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

- AH:** Atividade hemaglutinante;
- AHE:** Atividade hemaglutinante específica;
- Ca²⁺:** Íon Cálcio;
- BIL:** Lectina isolada da peçonha da cobra *Bothrops leucurus*;
- CaBo:** Lectina purificada da sementes de *C. bonariensis*;
- Casul:** Lectina isolada da *Calliandras urinamensis*;
- CDR:** Domínio de reconhecimento a carboidratos;
- CMF:** Concentração Mínima Fungicida;
- CMI:** Concentração Mínima Inibitória;
- Com A:** Lectina isolada da *Canavalia ensiformis*;
- CNA:** Lectina isolada de sementes de *Clathrotropis nítida*;
- CRD:** Domínio de Reconhecimento de Carboidratos;
- DC:** Dicroísmo circular
- DMSO:** Dimetilsulfóxido;
- EDTA:** Etilenodiaminotetracético;
- ESC:** Carboidratos de superfície;
- FPLC:** Fast protein liquid chromatography (cromatografia líquida rápida de proreína);
- GaBL:** Lectina isolada da casca da *Genipa americana*;
- HCl:** Ácido Clorídrico;
- KCl:** Cloreto de potássio;
- kDa:** Quilo Dalton;
- HIV:** Vírus da imunodeficiência humana;
- LSL:** Lectina obtida do cogumelo *Laetiporus sulphureus*;
- MaL:** Lectina isolada da *Morus alba*;
- Mg²⁺:**Íon Magnésio;
- Mn²⁺:**Íon Manganês;
- mg:** Miligrama;
- mL:** Mililitros;
- mM:** Milimolar ;
- nm:** Nanômetros;

μL: Microlitros;
μg: Microgramas;
Min: Minutos;
m/v: Massa por volume;
MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina;
MuBL: Lectina isolada da casca *Myracrodruon urundeuva*;
MuHL: Lectina isolada cerne da *Myracrodruon urundeuva* ;
NaCl: Cloreto de sódio;
NaOH: Hidróxido de sódio;
(NH₄)₂SO₄: Sulfato de Amônio;
NI: Não inibiu;
PeLa: Lectina purificada de sementes de *Platypodium elegans*;
pH: Potencial hidrogeniônico;
pI: Ponto Isoelétrico;
PgTeL: Lectina isolada da *Punica granatum L*
Rip: Lectina inativadora de ribossomos;
RPM: Rotação por minuto;
RPMI: Roswell Park Memorial Institute (meio de cultura celular);
SC: Carboidratos específicos;
SDS:Dodecil-sulfato de sódio;
PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida;
StELL : Lectina isolada de folhas de *Schinus terebinthifolius*;
TRIS: 2-amino-2-hidrometilpropano-1,3-diol;
TxLCI: Lectina isolada da *Tulipa gesneriana*;
UFC: Unidade formadora de colônias;
UV-vis: Ultravioleta visível.
V/V: volume por volume
WSMoL: Lectina isolada de sementes de *Moringa oleífera*
YPD: Yeastextract – Peptone - Dextrose
Zn²⁺: íon zinco

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estruturas de <i>Genipa americana</i>	25
Figura 2: Representação esquemática da ligação da lectina a carboidratos livres e os de superfície celular.....	34
Figura 3. Esquema da atividade hemaglutinante (HA) e inibição de ensaios HA.....	36
Figura 4: Classificação de lectinas de acordo com características estruturais.....	37
Figura 5: Estruturas e processos utilizados para a preparação do extrato.....	47
Figura 6: Coluna cromatográfica de Exclusão Molecular Sephacril S-100, com amostra de <i>Genipa americana</i>	50
Figura 7: Imagem ilustrativa da atividade Hemaglutinante.....	51
Figura 8: Perfil cromatográfico da cromatografia de Exclusão Molecular Sephacril S-100.....	58
Figura 9: Eletroforese SDS-PAGE a 10 % de marcador de peso molecular (canaleta 1); GaBL em condições desnaturantes e redutora (2) e não redutora (3).....	60
Figura 10: Teste de termo estabilidade. As amostras foram incubadas por 60 minutos.....	63
Figura 11: Teste de estabilidade a pH. A lectina foi dializada por 6 horas em todos os pHs.....	65
Figura 12: Avaliação do efeito de íons na AH.....	67
Figura 13: Espectros de dicroísmo circular de GaBL na faixa de pH de 2,0 até 12,0.....	68
Figura 14: Espectros de dicroísmo circular de GaBL nos valores de pH 2,0, 3,0 e 4,0 (A) e após ter sido reequilibrado para o pH 7,0 (B).....	69
Figura 15: Efeito da lectina pura, do extrato bruto da casca de <i>Genipa americana</i> e da fração sobre a viabilidade de fibroblastos 3T3 em 24 e 48 horas.....	72

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Classificação de lectinas quanto à especificidade ao ligante.....	45
Tabela 2: Atividades biológicas de Lectinas em diferentes tecidos vegetais.....	46
Tabela 3: Precipitação com acetona e etanol.....	49
Tabela 4: Precipitação salina.....	49
Tabela 5: Fracionamento com Etanol.....	56
Tabela 6: Fracionamento com Acetona.....	56
Tabela 7: Fracionamento com Sulfato de Amônio.....	57
Tabela 8: Purificação lectina da casca de <i>Genipa americana</i>	59
Tabela 9: Teste de inibição da Atividade Hemaglutinante Específica - AHE de GaBL por carboidratos e glicoproteína.....	62
Tabela 10: Atividade antifúngica de GaBL fungos patogênicos.....	70

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	18
2.1	OBJETIVO GERAL	18
2.2	Objetivos Específicos	18
3	REFERENCIAL TEORICO	19
3.1	A Importância da Fitoterapia e o uso das Plantas Medicinais	19
3.2	Família Rubiácea	23
3.2.1	<i>Genipa americana L.</i>	24
3.2.2	Importância Socioeconômica de <i>Genipa Americana L.</i>	26
3.2.3	Importância Medicinal e Uso Popular	27
3.2.4	Importância Farmacológica	29
3.3	Lectinas	31
3.3.1	Conceito e Identificação das Lectinas	33
3.3.2	Classificação das Lectinas Vegetais	36
3.3.3	Purificação de Lectinas	38
3.3.4	Lectinas de plantas e suas aplicações	44
4	MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.1	Obtenção do Material e Identificação	47
4.2	Preparo do Extrato	48
4.3	Precipitação	48
4.3.1	Precipitação com solventes orgânicos (acetona e etanol)	48
4.3.2	Precipitação com sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄)	49
4.4	Cromatografia Líquida	49
4.5	Ensaio de atividade Hemaglutinante	50
4.6	Eletroforese	51
4.7	Determinação da Concentração de Proteína	52
4.8	Ensaio de Inibição e Especificidade a Carboidratos e Glicoproteínas	52
4.9	Ensaio de avaliação de temperatura, estabilidade térmica e efeito do pH na atividade hemaglutinante	52
4.10	Quantificação de Fenóis totais	53

4.11	Efeito do EDTA e de Cátions divalentes sobre a Atividade Hemaglutinante	53
4.12	Análise da conformação da lectina sob ação de pH	54
4.13	Ensaio de Atividade Antimicrobiana	54
4.14	Ensaio de Viabilidade Celular	55
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1	Extração e Fracionamentos	55
5.2	Isolamento de GaBL	58
5.3	Eletroforese SDS-PAGE	60
5.4	Teste de Inibição da AH de GaBL com Carboidratos e Glicoproteínas	61
5.5	Teste de Termoestabilidade	62
5.6	Teste de Estabilidade a Variação do pH	64
5.7	Efeito de Íons na AH de GaBL	66
5.8	Análise da conformação da lectina sob ação de pH	67
5.9	Testes Biológicos	69
5.9.1	Atividade Antifúngica	69
5.9.2	Teste de Citotoxicidade e Viabilidade Celular	71
6	CONCLUSÃO	73
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais não é uma prática nova, pois desde os primórdios até meados do século XVII seu uso era o único meio de tratamento, devido à inexistência de medicamentos e conhecimentos científicos na elaboração de substâncias específicas para tratar a saúde das pessoas por doenças existentes na época (OLIVEIRA, 2016; BETTEGA, 2017).

Em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, o uso de medicamentos naturais apresenta grande relevância, principalmente nas regiões de difícil acesso aos serviços de saúde. Em decorrência a essas características, o comércio de medicamentos fitoterápicos vem aumentando consideravelmente, atingindo uma taxa anual média de 15 % (LIMA et al., 2017). No Brasil, o crescimento das vendas de fitoterápicos superou a casa dos 25%, entre 2011 e 2012 (ABFISA, 2012).

Todavia, o preparo e uso de produtos de origem vegetal para fins curativos podem acarretar sérios danos, quando manipulados inadequadamente, uma vez que algumas plantas apresentam substâncias tóxicas para o organismo humano. Desta forma, torna-se necessário o conhecimento sobre os compostos químicos e suas possíveis ações biológicas, visando confirmar cientificamente os benefícios e assegurar a utilização pela população (SILVA, 2015).

As espécies vegetais são constituídas por metabólitos primários e secundários, onde os primeiros são produzidos de forma constante e desempenham diversas funções vitais, sendo produtos essenciais para o crescimento, desenvolvimento e reprodução dos seres. Os de origem secundária, por sua vez, possuem ocorrência restrita, mesmo apresentando características essenciais para os organismos que os produzem por estarem envolvidos nas relações interespecíficas e em mecanismos de defesa (WINK, 2011 apud Silva, 2015).

Além dos metabólitos secundários, alguns componentes do metabolismo primário das plantas têm sido relacionados a mecanismos de defesa. As lectinas, caracterizadas como proteínas ou glicoproteínas de origem não imune, possuem pelo menos um domínio não catalítico de reconhecimento a carboidratos, se ligando de maneira reversível sem alterar suas estruturas, sendo capazes de aglutinar célula (DA SILVA, 2017).

Amplamente distribuídas na natureza, as lectinas podem ser encontradas em plantas (inferiores e superiores), animais (invertebrados e vertebrados) microrganismos e até mesmo em vírus. Essas proteínas possuem estruturas tão diversas quanto suas funções e aplicações, variam amplamente em tamanho, estrutura, organização molecular, bem como na constituição de seus domínios de reconhecimento a carboidratos (CDR). Atualmente essas proteínas têm exercido papéis extraordinários, tendo em vista seu potencial diversificado em áreas como biologia, medicina, farmacologia, bioquímica e biotecnologia (OLIVEIRA, 2017).

As lectinas mais estudadas são de origem vegetal, principalmente da família Leguminosae. Devido à ampla diversidade estrutural e biológica, essas biomoléculas não apresentam apenas uma função para todas elas. Pode-se afirmar que estas biomoléculas desempenham um papel fundamental em muitos processos biológicos, tais como comunicação, adesão e interação celular, defesa, fertilização e desenvolvimento. Na literatura existem diversos relatos sobre suas atividades, podendo destacar: atividade inseticida (MACEDO et al., 2015; OHIZUMI et al., 2009; ATALAH et al., 2014), atividade antiinflamatória e pró-inflamatória (FREIRE et al., 2003; BENJAMIN et al., 1997, ASSREUY et al., 1997, ALENCAR et al., 2005), efeito vasodilatador em anéis de aorta (ASSEREUY et al., 2009), e indução de apoptose (BARBOSA et al., 2001), agentes antimicrobianos contra patógenos (PAIVA et al., 2010; GOMES et al., 2014).

Genipa americana L, pertencente à família das Rubiaceae, esp oriunda da América Central e do Sul e se destaca por sua ampla distribuição geográfica dentro do continente americano. O uso da cultura do jenipapeiro apresenta grande potencial econômico. Ela é utilizada em carpintaria, para a confecção de móveis, também é usada na recomposição de matas ciliares, bem como na recuperação de solos contaminados ou poluídos graças à sua ação fitorremediadora, uma vez que apresenta alta adaptação a terrenos úmidos e alagados (ALMEIDA, 1993; SILVA, 2006). Seus frutos são muito consumidos, inclusive *in natura*, e têm sido muito utilizado pela culinária brasileira, em diversas regiões, sendo consumidos na forma de polpas, compotas, doces, sucos, licores, xaropes, geléias e vinhos (SILVA; TASSARA 2005; LORENZI e MATOS, 2008).

Pesquisas com *Genipa americana* tem sido alvo de grandes descobertas, principalmente farmacológicas e medicinais. Sua polpa é usada contra icterícia,

afecções do estômago, baço e fígado, no tratamento para tosse, contusões, luxações, depurativo, faringite, asma, purgativos e para anemia. A casca tem sido muito utilizada como decocção e chás, e apresenta efeito diurético, antibacteriano, fungicida, além de ser usada no processo de emagrecimento (NETO, 2006). Existem relatos de que a goma extraída do tronco desta frutífera tem efeito antidiarreico e propriedades antigonorréicas (ABRÃO 2010; RODRIGUES e ANDRADE, 2014). A decocção ou infusão das folhas e raiz tem sido utilizada no tratamento contra problemas renais, expelindo possíveis cálculos renais, além de ser útil para outros problemas ligados ao sistema urinário (MESSIAS et al., 2015).

Considerando que estudos sobre os constituintes bioativos da *Genipa Americana* ainda são poucos, o presente trabalho tem por objetivo identificar, isolar, e caracterizar uma lectina da casca da *Genipa americana* L. assim como avaliar as atividades citotóxicas e antimicrobianas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar, isolar e caracterizar uma lectina da casca da *Genipa americana L.* assim como avaliar as atividades citotóxicas e antimicrobianas.

2.2 Objetivos Específicos

Extrair a lectina da casca da *Genipa americana L.*

Avaliar a atividade hemaglutinante do extrato frente a eritrócitos de coelhos;

Realizar fracionamento salino, alcoólico e/ou acetona;

Realizar a purificação da lectina por procedimento cromatográfico;

Caracterizar a lectina isolada quanto a especificidade a carboidratos;

Avaliar o efeito do pH, íons e temperatura na atividade da lectina pura;

Caracterizar os efeitos da variação de pH na estrutura secundária da lectina por dicroísmo circular;

Avaliar a atividade antimicrobiana da lectina isolada da casca de *Genipa americana L* através de determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e a concentração mínima fungicida (CMF);

Avaliar a atividade citotóxica da lectina em linhagem celular humana.

3 REFERENCIAL TEORICO

3.1 A Importância da Fitoterapia e o uso das Plantas Medicinais

É notório que o Brasil é o país com a maior biodiversidade em fauna do mundo, possuindo a maior diversidade genética vegetal do planeta, tendo em vista as dezenas de espécie estão sendo catalogadas como novas diariamente. Sabe-se que muitas destas espécies existentes nos biomas brasileiros são classificadas como endêmicas, o que reforça a importância no cuidado e exploração sustentável dessa riqueza. Sabemos que grande parte desse patrimônio brasileiro vem sendo, a cada dia, explorado de diversas formas inadequadas, quer seja pela exploração agropecuarista, pelas queimadas, pelo desmatamento, pelas indústrias madeireiras, dentre outros fatores.

O que é preocupante é que por conta da extinção de diversas espécies vegetais, inclusive endêmicas, tem-se perdido e colocado em risco um enorme patrimônio biológico. Diversas moléculas biologicamente ativas de interesse biológico, farmacológico, médico e biotecnológico, estão nos vegetais, inclusive plantas medicinais usadas há séculos por diversas gerações e povos asiáticos, africanos, europeus e no Brasil, principalmente, pelos indígenas.

O uso de plantas medicinais não é uma prática nova, pois desde os primórdios até meados do século XVII seu uso era o único meio de tratamento devido à inexistência de medicamentos e conhecimentos científicos na elaboração de substâncias específicas para tratar a saúde das pessoas afetadas por doenças existentes na época (OLIVEIRA, 2016; BETTEGA, 2017). Porém, após o início do século XX, o uso de plantas medicinais foi marginalizado e vulgarizado por não conter um embasamento científico, e logo os fitoterápicos foram substituídos por alopáticos. Contudo muitas comunidades e povos continuaram a manter por anos e até os dias atuais, a inclusão das práticas de saúde baseadas na fitoterapia (ALVIM, 2006; OLIVEIRA, 2016; BETTEGA, 2017).

A fitoterapia caracteriza-se pela prática do uso de plantas, ou de suas estruturas, com a finalidade de prevenir, aliviar ou curar um processo patológico. É a terapia baseada no uso de fitoterápicos com produtos farmacêuticos de origem vegetal, devidamente avaliados quanto à sua qualidade, eficácia e segurança de

uso. Sua incorporação como abordagem de tratamento e até mesmo para prevenção de doenças baseia-se na medicina controlada, cujos medicamentos são devidamente estudados.

O uso de plantas medicinais e fitoterápicas vem sendo difundido pela Organização Mundial de Saúde desde 1978, no qual se originou um programa mundial para estimular o uso de métodos da chamada “medicina tradicional”. O desenvolvimento e a busca por estas práticas tradicionais visam fornecer remédios ou práticas seguras e eficazes para a obtenção da saúde (TOMAZZONI; NEGRELLE; CENTA, 2006; SANTOS, 2011; LIMA; GOMES, 2014).

No Brasil, mesmo com o incentivo das mídias e das indústrias farmacêuticas para a utilização de medicamentos industrializados, grande parte da população ainda utiliza de práticas complementares para cuidar da saúde, como o uso das plantas medicinais empregada para aliviar ou mesmo curar algumas enfermidades, ainda mais em regiões de difícil acesso, onde muitas famílias recorrem ao uso de fitoterápicos e alguns povos os têm como único recurso para saúde.

Devido à escassez de recursos financeiros e a constante dificuldade no acesso aos medicamentos alopáticos por muitos povos, há uma valorização do conhecimento popular e tentativa de suprir a ausência de recursos financeiros para os setores de saúde. Isso fez com que o uso das plantas medicinais tenha crescido consideravelmente. O comércio de medicamentos fitoterápicos vem aumentando consideravelmente, demonstrando uma taxa anual média de 15%. No Brasil, o crescimento das vendas de fitoterápicos superou a casa dos 25%, entre 2011 e 2012 (ABFISA, 2012).

Muitos tecidos das plantas têm sido utilizados para fins medicinais e curativos, tais como sementes, raízes, caules, cascas, folhas e frutos. Estes, por sua vez, são de origem extrativista. São comercializados *in natura* em grande parte em feiras livres, bancas de condimentos e ervas. Embora muitos produtos processados sejam ofertados em farmácias de manipulação, onde a matéria-prima provém predominantemente da atividade extrativista, no entanto é observado uma pequena produção e cultivo nas denominadas farmácias vivas (OLIVEIRA, 2001).

Estas características demonstram a extrema importância à continuidade e a necessidade de novos estudos que visam o esclarecimento não só científico mais da comunidade em geral, sobre as potencialidades das moléculas biologicamente

ativas nessas plantas de interesse popular, em sua maioria ainda desconhecidos, e uma vez que essas moléculas sejam descobertas e descritas pelos seus mais diversos potenciais biológicos, estas passarão a ter maior valorização, ascensão e proteção pela comunidade, além de ser mais uma fonte no meio científico e popular de forma responsável. (ALVIM, 2004; ISERHARD, 2009; BADKE, 2011).

De forma geral, a flora brasileira possui um patrimônio biológico imensurável, pois existe uma diversidade muito grande e complexa de substâncias que são produzidas pelas plantas, inclusive de interesse médico, e muitas destas, necessitam de uma melhor compreensão e conhecimento acerca de suas estruturas e funções.

As plantas medicinais são uma fonte de vários agentes terapêuticos que ganharam a atenção da comunidade científica, uma vez que apresentam propriedades terapêuticas e compostos bioativos (KIRBAG et al.,2013). De forma geral as plantas possuem uma grande quantidade de compostos, e a estes denominamos princípios ativos, podendo ser caracterizados como micro ou macronutrientes a depender de seu peso molecular e estrutura química. Estes também podem ser classificados como metabólicos de origem primária ou secundária.

É sabido que o custo e produção desses compostos pelas plantas é muito alto e isso se deve a sua extrema importância para o bom funcionamento e sobrevivência da mesma, contudo as funções fisiológicas desses compostos ainda não são bem esclarecidas. Dados contidos na literatura relatam que estes compostos apresentam funções ligadas a alto-proteção do vegetal contra parasitas hospedeiros, pragas e doenças, assim como a proteção contra radiação, escassez de água, entre outros agentes externos. O conhecimento popular sobre as propriedades farmacológicas e medicinais de plantas ou de seus órgãos representa o ponto de partida para o desenvolvimento de estudos sobre as moléculas bioativas sintetizadas por diferentes espécies (BRUSOTTI, 2014).

Os metabólitos primários são amplamente encontrados em todos os reinos, estando presentes em todos os seres vivos, o que confere a esses a total dependência desses compostos para execução permanente e assídua de suas funções, sendo estes produzidos de forma constante, enquanto os metabólitos secundários são de ocorrência restrita e restringida em determinados períodos ou

ocasiões precisas, embora sejam essenciais para os organismos que os produzem, estando presentes majoritariamente em plantas, mas também podem ser encontrados em algas e fungos. Contudo, a sua produção é aumentada em meio aos desafios relacionados principalmente aos estresses bióticos e abióticos sofridos por estes organismos (WINK, 2003; BRAKHAGE, 2013; SPITELLER, 2015; MACHELEIDT, 2016).

A partir do metabolismo primário, é derivada a produção de substâncias com a introdução de nutrientes importantes tirados do solo (nitrogênio, fósforo e sais minerais). Essas substâncias têm a função de promover os processos básicos da planta, como os ácidos carboxílicos do ciclo do ácido cítrico, os aminoácidos que constituem a maioria das proteínas, além de constituir uma diversidade de lipídeos, ácido nucléicos, os glicídios e seus derivados.

Os compostos do metabolismo primário como glicídios, lipídeos, ácidos nucléicos e proteínas são substâncias encontradas em todas as plantas, em concentrações variadas de acordo com a família, gênero e espécie, e instituem a matéria-prima de reações posteriores, catalisadas por enzimas e controladas geneticamente. São essas reações posteriores que levam à produção dos compostos do metabolismo secundário das plantas (flavonóides, alcalóides, terpenos, entre outros) (DIAS; DIAS, 2007).

Uma classe de compostos de origem do metabolismo secundário produzidos pelas plantas são os compostos fenólicos. Pesquisas relatam que a presença destes está diretamente relacionada com as atividades antioxidante (MARTINS et al., 2015), antidepressiva (FERRERES et al., 2013) e antiinflamatória (GARCÍA-LAFUENTE et al., 2014).

O conhecimento popular sobre as propriedades farmacológicas e medicinais de plantas ou de seus órgãos representa o ponto de partida para o desenvolvimento de estudos sobre as moléculas bioativas sintetizadas por diferentes espécies (BRUSOTTI, 2014).

3.2 Família Rubiácea

O Brasil é um dos países com maior biodiversidade do mundo, apresentando uma enorme e vasta diversidade de fauna e flora. Em especial a flora Brasileira tem sido alvo de grandes pesquisas, tendo em vista sua grandiosa riqueza em espécies, e muitas destas possuem alto potencial de uso pela humanidade, especialmente no que diz respeito à criação de novas opções voltadas à alimentação e ao fornecimento de produtos medicinais (RIGDEN, 2002).

A família Rubiaceae é uma das maiores famílias dentre as Angiospermas, compreendendo o quarto lugar de todo o reino vegetal em número de espécies, cerca de 13.000, abrigadas em aproximadamente 650 gêneros. No Brasil, existem por volta de 110 a 130 gêneros e 1500 a 2000 espécies catalogadas, sendo conhecido, na região Nordeste cerca de 70 gêneros e 277 espécies pertencentes à família das Rubiáceas (GERMANO FILHO, 1999; PEREIRA, 2014; BARBOSA, 2004).

As rubiáceas possuem distribuição universal, estando mais presentes em regiões tropicais e subtropicais, apresentando mais de 80% de seus gêneros característicos por espécies lenhosas e são representadas por quatro subfamílias: *Antirheoideae*, *Cinchonoideae*, *Ixoroideae* e *Rubioideae*, que evidenciam diversas utilidades e usos, tais como: medicinal, farmacológica, alimentícia, madeireira, construção civil, tinturas, forrageira, têxtil, apícola, ornamental e artesanal (MARGALHO; ROCHA; SECCO, 2009; ICMBIO, 2012; PEREIRA, 2004; KINOSHITA, 2013).

Estudos anteriores têm mostrado uma avaliação dos aspectos etnobotânicos, fitoquímicos e farmacológicos da família das Rubiáceas. No Brasil foram revelados através de bibliografia consultada um total de 80,9% de estudos etnobotânicos, 15,87% de estudos fitoquímicos e 6,34% de estudos farmacológicos (MABBERLEY, 1997; DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002; SOUZA et al., 2013).

A literatura faz relatos de algumas espécies de maior relevância desta família, sob o ponto de vista medicinal, farmacológico e econômico, como exemplo: *Coffea arábica* (Café), *Uncaria tomentosa* (unha-de-gato), *Morinda citrifolia* Linn (None) e *Genipa americana* (Jenipapo).

A *Coffea arabica* (Café) é uma planta de grande importância econômica para o Brasil, sendo o café produto de importação a décadas, para todo o mundo, não só em virtude de seu valor como bebida revigorante, mais também por suas propriedades medicinais, oriunda principalmente por seus metabólitos secundários (MARGALHO; ROCHA; SECCO, 2009; ICMBIO, 2012).

A *Uncaria tomentosa* (unha-de-gato) é amplamente empregada na medicina popular. Esta planta possui diversas substâncias de interesse médico, e que tem sido utilizada para diversas indicações: Como artrite, asma, câncer, úlcera gástrica, inflamações e hemorragias, dentre outras (LEMAIRE, 1999; PERAZZO, 2004; GONÇALVES, 2005; CARVALHO, 2017).

A *Morinda citrifolia* Linn (None) apresenta grande potencial medicinal e farmacológico, encontrados em suas diversas estruturas vegetais, que atuam no controle e combate de doenças como: câncer, artrite, diabetes e hipertensão. É notório que novas pesquisas vêm sendo realizadas, explorando o potencial das substâncias produzidas por esse vegetal (BASAR et al., 2010; BROWN, 2012; IDA, 2017).

3.2.1 *Genipa americana* L.

O jenipapo (*Genipa americana* L.) é uma espécie oriunda da América Central e do Sul, e se destaca por sua ampla distribuição geográfica dentro do continente americano, mas também há relatos de sua presença na África e Ásia (FRANCIS, 1993). No Brasil, pode ser encontrada na Floresta Amazônica, Mata Atlântica e Cerrado, biomas de regiões de clima tropical e semi-tropical, sendo encontradas predominantemente sob a forma de árvores e semi-arbustos. De maneira geral, esta é preferencialmente encontrada em regiões litorâneas e nas margens dos rios, podendo ocorrer no interior até no alto Amazonas, em terras elevadas. Esta planta também tem sido muito utilizada em regiões sujeitas a inundações periódicas no estado de Minas gerais e sul da Bahia (BOLZANI, 2001; CHIQUIERI, 2004; ALBUQUERQUE; HANAZAKI, 2006; PINTO, 2009).

O termo *Genipa americana* é de origem indígena Tupi-guarani, que significa “mancha escura ou fruto que serve para pintar”. Estudos demonstram que o jenipapo tem sido utilizado pelos índios em seus rituais, para colorir o corpo. Isso se dá

devido a um composto presente no fruto e na casca que, quando em contato com proteínas da pele, deixam o corpo escuro por dias e até semanas. A planta tem grande importância para os índios, devido às suas propriedades medicinais e alimentícias, além de seus frutos serem uma fonte rica em ferro (BARROS, 1970).

Esta planta dispõe de diversos nomes populares, a depender da região onde se encontre, sendo os nomes mais comuns: “jenipapo”, “janapapeiro”, “janipaba”, “jenipapeiro”, “jenipapinho”, “jenipá”, “jenipapeirol”.

A planta apresenta uma morfologia exuberante, possuindo altura entre 7,0 e 20 metros. O caule é reto e de formato cilíndrico com diâmetro de 40 a 60 cm; casca lisa, espessa, cinza-esverdeada. Copa de tamanho mediano, com numerosos galhos, folhas concentradas no ápice dos ramos, sendo opostas, acuminadas e estreitas na base, possuindo de 10 a 35 cm de comprimento (BARBOSA, 2008). As flores são hermafroditas, campanuladas, terminais ou axilares, flores grandes, brancas ou amareladas, suavemente aromáticas, de 20 a 45 mm (PEREIRA, 2014; KINOSHITA, 2013). Seus frutos são comestíveis, possuem polpa adocicada e consistente; baga subglobosa, de 8,0 a 10 cm de comprimento e 6,0 a 7,0 cm de diâmetro, amarelada quando madura, de casca mole, rugosa, amarelo-pardacento contendo polpa aromática e sabor cítrico, envolvendo numerosas sementes achatadas de cor creme com 1,0 cm de diâmetro, como mostrado na imagem abaixo (LORENZI; MATOS, 2008)

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



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

3.2.2 Importância Socioeconômica de *Genipa Americana* L.

A espécie *Genipa americana* apresenta diversos estudos em áreas agrícola, agroecológica, genética e outras áreas do conhecimento. São encontrados na literatura estudos sobre germinação, temperatura e desenvolvimento pós-seminal (ANDRADE et al., 2000; ANDRADE et al., 2003, 2007; QUEIROZ et al., 2012); restrição hídrica de sementes (SANTOS; SILVA-MANN; FERREIRA, 2011); valor nutricional (HAMACEK et al., 2013); características de seu corante (RENHE et al., 2009), além de estudos e pesquisas relacionados à produção de mudas (COSTA et al., 2007; VALERI; PUERTA; CRUZ, 2003; SALLA, et al., 2015).

Contudo, os estudos direcionados a pesquisa de compostos primários, suas propriedades, características e funções têm sido escassos, o que demonstram a importância de trabalhos científicos na exploração da espécie como um todo.

O uso da cultura do jenipapeiro apresenta grande potencial econômico. Sua madeira, de cor branca marfim, mole, elástica e flexível é empregada na produção de cosméticos, tintura, carvão e para fins madeireiros nas construções naval, civil e em marcenaria (SALOMÃO; PADILHA, 2006; RENHE, 2008;). É muito usada na confecção de móveis, fabricação de cabos para ferramentas agrícolas e para carpintaria em geral, principalmente por povos que vivem em regiões próximas de matas e zonas rurais devido a sua alta incidência. O cultivo da espécie tem sido primordial na recomposição de matas ciliares, para plantios em áreas brejosas e degradadas de preservação permanente. Ela também tem sido usada na recuperação de solos contaminados ou poluídos graças a sua ação fitorremediadora, tendo em vista sua alta adaptação em terrenos úmidos e alagada (ALMEIDA, 1993; SILVA, 2006).

Diante dos relatos e estudos com a espécie é estimulado que mais estudos sejam realizados, com a finalidade de obterem mais informações sobre esta importante essência florestal, assim como o aproveitamento da espécie em reflorestamentos para diversos fins e em diversas regiões de mata ciliares. (DONADIO, 1998).

Genipa americana tem se mostrado muito útil até no fornecimento abundante de alimentação nos ecossistemas a qual se encontra inserida. Seus frutos doces têm servido de alimento para uma infinidade de animais silvestres, principalmente

em épocas de escassez de alimento, devido aos períodos de seca. Dentre os animais que se alimentam do jenipapo, podemos citar os invertebrados, os répteis, e de maneira especial as aves e os mamíferos, pois os mesmos apresentam uma enorme capacidade de dispersão de suas sementes, tendo um papel fundamental e de imprescindível importância para o aumento e propagação da espécie (LORENZI, 2000; RAGUSA-NETTO, 2006; DELPRETE et al., 2005).

Seus frutos são muito consumidos, inclusive *in natura*. Este por sua vez, tem sido muito utilizado pela culinária brasileira em diversas regiões, pois o mesmo tem sido utilizado na forma de polpas, compotas, doces, sucos, licores, xaropes, geléias e vinhos (SILVA; TASSARA 2005; LORENZI; MATOS, 2008).

A partir dos frutos e cascas de *Genipa americana*, em 1996, foi isolada e caracterizada quimicamente uma substância corante violeta ou azul-escuro (PRANCE, 1975), denominada genipina (DJERASSI, 1960; ESTRELLA, 1995). Contudo, sua estrutura química só foi elucidada no ano seguinte (DJERASSI, 1961). Esse corante tem se mostrado solúvel na água e no álcool, mas torna-se preto em contato com o ar (PRANCE, 1975). Antigamente era usada pelos índios para se pintarem de negro e ainda hoje é empregada na marcação de peças de roupas, pintura de tecidos, palhas, enfeites, cerâmicas e para pintar o corpo nas cerimônias religiosas e durante as batalhas, além de outros utensílios domésticos (DA SILVA et. al., 1998; ALMEIDA, 1993; ERBANO; DUARTE, 2010).

3.2.3 Importância Medicinal e Uso Popular

Popularmente conhecida, esta espécie tem sido empregada para muitas propostas, sendo selecionada pelo programa “Plants of the Future” entre as dez plantas com maior potencial de uso imediato entre árvores frutíferas nativas (DIAS SOUZA, 2013). Não obstante, estudos de 2008 mostram que o jenipapeiro (*G. americana L.*) está em destaque dentre inúmeras espécies frutíferas por sua utilização pela população, em especial pelos nordestinos, em diversos aspectos, mas principalmente pelas suas propriedades medicinais (HANSEN et al., 2008).

Pesquisas com *G. americana* tem sido alvo de grandes descobertas, principalmente farmacológicas e medicinais. Estudos nesse âmbito têm sido definidos, graças a relatos baseados na medicina popular, que por sua vez tem

demonstrado ser um ponto de partida primordial para diversos estudos na flora brasileira.

Segundo Cordeiro e colaboradores (2014), *Genipa americana* foi destacada como a segunda espécie com maior número de citações por sua atividade médicas e farmacológicas, por 63,1% dos entrevistados. Foi à espécie com maior número de tratamento indicado: osteoporose, anemia, problemas estomacais, nervosismo, diabetes, colesterol, além de constituir excelente tônico no combate a indisposição, cansaço e fraqueza.

O fruto do jenipapo, em alguns lugares, é considerado afrodisíaco. Sua polpa é usada contra icterícia, afecções do estômago, baço e fígado, no tratamento para tosse, contusões, luxações, depurativo, faringite, asma, purgativos e para anemia devido à quantidade de ferro existente no vegetal. É um excelente tônico para problemas estomacais. Alguns estudos têm mostrado uma considerável atividade antioxidante *in vitro* e também tem sido bastante utilizada para o tratamento de diabetes, controlando a glicemia dos indivíduos (SANDRI, 1998; EPSTEIN, 2001; PORTO et al., 2010; BESSA et al., 2013).

A casca tem sido muito utilizada como decocção e chás, e apresenta efeito diurético, antibacteriano, fungicida, além de ser usada no processo de emagrecimento (NETO, 2006). Existem relatos de que a goma extraída do tronco desta frutífera tem efeito antidiarreico e propriedades antigonorréicas (ABRÃO 2010; RODRIGUES; ANDRADE, 2014), doenças do fígado (AGRA et al., 2008) e febre (DELPRETE; SMITH; KLEINI, 2005). Alves et al. (2008) relataram a decocção da casca e das folhas da *G. americana* como depurativo do sangue. Estudos recentes têm demonstrado que a decocção da casca é usada no tratamento da malária por indígenas do Alto Rio Negro no Amazonas (KFFURI et al., 2016).

Cientificamente, estudos têm demonstrado que as folhas, casca e fruto da espécie em estudo têm efeito antiinflamatório, adstringente, antianêmica, propriedades tônicas e tratamento para feridas escorbúicas (CORRÊA, 1984; DELPRETE et al., 2005; SOUZA et al., 2013). Estudo tem demonstrado que a decocção ou infusão das folhas e raiz tem sido utilizada no tratamento contra problemas renais, expelindo possíveis cálculos renais, além de ser útil para outros problemas ligados ao sistema urinário. (MESSIAS et al., 2015).

Alguns estudos de caráter experimental realizados com extratos de folhas de *G. americana* mostrou ser eficiente frente atividade antipalúdica *in vitro* contra *Plasmodium falciparum* e *in vivo* contra *Plasmodium berghei* (DEHARO et al., 2001), assim como os efeitos antiparasitários e antimicrobianos (OLIVEIRA et al., 2012; NOGUEIRA et al., 2014; TALLENT, 1964). As folhas maceradas, tem sido usados para tratar febre por algumas tribos nativas (DELPRETE et al., 2005).

Trabalhos recentes demonstraram que o extrato polissacárido das folhas de *G. americana* mostrou atividade significativa contra as formas epimastigota, tripomastigota e amastigota de *Trypanosoma cruzi*, sugerindo morte celular por necrose com envolvimento de espécies reativas de oxigênio (DA SILVA SOUZA et al., 2018).

3.2.4 Importância Farmacológica

São notórias, como já citadas, as importantes características da família das Rubiáceas, sendo o jenipapo a espécie com maiores relatos e diversificação quanto a sua importância medicinal e farmacológica. Isso se dá em virtude das suas muitas funcionalidades descritas na literatura.

G. americana pode ser caracterizada pela grande quantidade de compostos do metabolismo secundário, que vem sendo estudados e identificados desde a década de 60. Diversos estudos têm sido realizados com a genipina, principalmente nos últimos anos devido às suas propriedades farmacológicas (antiangiogênica, antiinflamatória e antioxidante) e devido ao seu poder corante, principalmente pelas indústrias (ALMOG et al., 2004; KOO et al., 2004; BYUNG-CHUL et al., 2005).

Outros dois compostos da mesma classe de iridóides foram identificados e isolados, ácidos genípico e genipínico (TALLENT, 1964). A literatura descreve que esses compostos apresentaram atividade antimicrobiana, sendo capaz de inibir o crescimento *in vitro* de algumas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, do fungo *Trichophyton mentagrophytes*, da alga *Chlorella vulgarise* e do protozoário *Tetrahymena gelleii*.

Através de estudos realizados no Panamá, com as folhas de *G. americana*, foi isolado um iridóide glicosilado, o ácido geniposídico (GUARNACCIA et al., 1972). Em 1983 pesquisadores trabalhando com *G. americana* coletada na Indonésia, isolaram

um novo iridóide glicosilado, inédito até então, o geniposídeo, juntamente com outros já conhecidos e através da formação de calos e culturas de células suspensas foi obtido o tarenosídeo, gardenosídeo e o ácido geniposídico. Segundo Ueda e Iwahashi (1991), todas as substâncias apresentaram atividade antitumoral em testes realizados *in vitro*.

Contudo a partir dos anos 2000, foram observados muitos trabalhos destacando os compostos e as possíveis atividades do jenipapo, não só apenas do fruto, como é descrito em trabalhos anteriores, mais em outros órgãos da planta, como raiz, caule e folhas.

Segundo Borges e Rezende (2000) a fração volátil dos frutos de jenipapo coletados no Brasil mostraram altas quantidades de ácidos carboxílicos. Por esse motivo, é sugerido que os mesmos possam estar intrinsecamente relacionados ao odor forte e característico do jenipapo. Contudo, em trabalhos realizados com frutos coletados em Cuba, foram identificados na fração volátil olinalol e limoneno, além dos ácidos carboxílicos (PINO et al., 2005).

No ano de 2005, foram publicados diversos trabalhos no Brasil e em outros países da América do Sul com *G.americana*. Ono et al (2005), no Peru, isolaram e elucidaram as estruturas de mais quatro novos iridóides glicosilados denominados genamesídeos, juntamente com quatro outros já conhecidos: ácido geniposídico, geniposídeo, gardenosídeo e genipina-gentiobiosídeo.

Outro grupo de pesquisa, no entanto, identificou compostos do metabolismo secundário, além do ácido hexadecanóico, o ácido octadecanóico, ácido tetradecanóico, linalol e limoneno como principais constituintes no concentrado de aroma e importantes no sabor do fruto (PINO et al., 2005).

Segundo Pinto et al (2006), o extrato aquoso dos frutos da *G. americana*, mostrou uma diversidade de 52 compostos voláteis, que dentre estes, 32 foram relatados pela primeira vez em trabalhos anteriores, como sendo os responsáveis pelo aroma do jenipapo. Foram descritos, dentre seus constituintes, alcoóis, ésteres, ácidos e aromáticos.

Um estudo realizado em 2010 descreve sobre a presença de iridóides glicosídicos, principalmente em frutos, destacando especialmente geniposídeo, ácido geniposídico e genipina, contudo na folha tem sido visto compostos como o ácido geniposídico, e, em cultura de células e tecidos calosos da espécie, o

tarenosídeo, ácido geniposídico e gardenosídeo (ERBANO; DUARTE, 2010). Pesquisa recente de 2017 destaca em diferentes regiões do fruto, como epicarpo, mesocarpo e endocarpo, a presença de diversos compostos do metabolismo secundário, principalmente iridóides (NÁTHIA-NEVES et al., 2017).

3.3 Lectinas

Os primeiros relatos que descrevem o surgimento no conhecimento das lectinas são datados de 1860, sendo este um trabalho descrito por Silas Weir Mitchell, trabalho que mostrou o potencial hemaglutinante do veneno de *Crotalus durissus* (cobra cascavel), em sangue de pombo (MITCHELL, 1860; PEUMANS; VAN DAMME, 1998).

Em 1888 foi observado a partir do extrato de uma planta denominada *Ricinus communis* (mamona) que esta apresentava atividade semelhante, hemaglutinando eritrócitos. Peter Hermann Stillmark em sua tese de doutorado apresentada à Universidade de Dorpat obteve o extrato protéico puro de mamona, e a este denominou de ricina (FRANZ, 1988). Coincidentemente em 1891, H. Hellin estudando outra planta *Abrus precatorius* (abrina), observou que a mesma também apresentava a capacidade em hemaglutinar eritrócitos, contudo ambas as proteínas “Ricina e Abrina” foram denominadas como tóxicas devido à capacidade destas plantas em aglutinar eritrócitos (OLSNES, 2004). Tais proteínas foram referidas como hemaglutininas, ou fitoaglutininas, porque eles foram originalmente encontrados em extratos de plantas.

Apenas na primeira década do século XIX, os estudos de Landsteiner e Raubitschek demonstraram que diversos extratos de plantas apresentavam a mesma capacidade de aglutinar o sangue de alguns animais como coelho, e que alguns extratos possuem a especificidade para alguns tipos sanguíneos (LIENER, 1963).

No entanto, foi na década de trinta, que os trabalhos de Sumner e Howell com extrato de plantas, mas especificamente os extratos de uma leguminosa *Canavalia ensiformis* (ConA), demonstraram que a hemaglutinação causada por esta planta era inibida pela sacarose, demonstrando pela primeira vez a especificidade de uma lectina por açúcar. ConA foi à primeira lectina a ser isolada, sendo denominada

hemaglutinina (SHARON; LIS, 2004). Foi mostrado que a lectina também aglutina leveduras e bactéria, além de precipitar amido e glicogênio. Além disso, os autores sugerem que a capacidade de aglutinação está relacionada com a reação entre a proteína e os carboidratos presentes na superfície dos eritrócitos (SUMNER; HOWELL, 1936; AGRAWAL; GOLDSTEIN, 1967).

No final da década de 1940, estudos demonstraram que as fitohemaglutininas tinham especificidade para diferentes grupos sanguíneos, mas somente em 1952 é que foi demonstrado que esta especificidade estava intrinsecamente relacionada à capacidade de ligação a carboidrato (WATIKINS; MORGAN, 1952).

Os trabalhos que destacaram a especificidade entre as fitohemagutinininas e os carboidratos de membrana deram grande impulso para estudos na área, pois no período da Segunda Guerra Mundial, o grande interesse na tipagem sanguínea para a transfusão de sangue resultou na descoberta de algumas lectinas específicas para os tipos de sangue A, B e O (LANDSTEINER, 1901; BOYD; SHAPLEIGH, 1954).

Essas fitohemaglutininas logo foram denominadas "lectinas", um termo derivado da palavra latina "legere", que significa "escolher". Graças a esse impulso, os estudos relacionados a essa proteína passaram a ser estimulados e difundidos, e logo surgiram diversos trabalhos com muitas plantas com o objetivo de buscar conhecer as diversas propriedades apresentadas por elas (BOYD; SHAPLEIGH, 1954; VASCONCELOS; OLIVEIRA, 2004; SHARON; LIS, 2004).

Após a década de 1950 o termo lectina foi difundido, sendo descrito para todas as proteínas que apresentam sítios de ligação e especificidade a carboidratos, e que não sejam advindas do sistema imune, independentemente do tipo sanguíneo utilizado para sua identificação (GOLDSTEIN et al., 1980; SHARON; LIS, 1972).

Com inusitado crescimento nos estudos de identificação e purificação das lectinas, nos anos pós 1960 iniciaram os primeiros trabalhos descrevendo as primeiras atividades biológicas. A lectina purificada de *Phaseolus vulgaris* apresentou alta capacidade de estimular mitose em linfócitos (NOWELL, 1960). Assim como ConA, que também demonstrou atividade mitogênica fortemente inibida por baixas concentrações de manose. (POWELL; LEON, 1970).

Outra atividade descrita por lectinas foi à possibilidade de estas moléculas serem utilizadas como agentes antitumorais, devido à ampla capacidade em

conseguir diferenciar o padrão de carboidratos de superfície em células tumorais e normais. Um dos primeiros relatos sobre essa atividade foi para a lectina WGA, isolada do germen do trigo (AUB; SANFORD; COTE, 1965; AUB; TIESLAU; LANKESTER, 1963). Conseqüentemente, nesse período foram aparecendo novos estudos de lectinas com essas atividades, como: *Canavalia ensiformis* (ConA), e a lectina de *Glicine max* (SBA), (MARIKOVSKY; INBAR, 1974; NICOLSON, 1973).

Com o surgimento de novas técnicas de isolamento, purificação e caracterização, além da divulgação das propriedades únicas e inovadoras dessa classe de proteínas, a partir da década de 1970, houve um grande salto no que diz respeito à pesquisa, conhecimento e aplicação das lectinas, fazendo com que novos organismos começassem a ser explorados.

Atualmente já existe uma grande diversidade dessas moléculas, extraídas das mais diversas fontes. Além das plantas, também podem ser encontradas em vírus, bactérias, protozoários, fungos e nos animais. Isso mostra não só a diversidade de organismos que detêm essa proteína, mas também a imensidão de aplicações que podem ser feitas por essas moléculas nas mais diversas áreas da ciência e biotecnologia (AGRAWAL; GOLDSTEIN, 1965; SHARON; LIS, 2004; SHARON, 2008; VARROT; BASHEER; IMBERTY, 2013; NIO-KOBAYASHI, 2016; SHOBA; ROSE, 2016; SINGH; WALIA; KANWAR, 2016; SOUSA-FILHO et al., 2016).

3.3.1 Conceito e Identificação das Lectinas

Lectinas fazem parte de um grupo muito heterogêneo de proteínas ou glicoproteínas que se ligam a carboidratos de forma reversível, sendo capazes de induzir a aglutinação de diferentes tipos de células ao interagirem com glicoconjugados presentes na superfície celular (PEUMANS; VAN DAMME, 1995; FARIAS, 2013).

As lectinas não apresentam origem imunológica, o que as diferem de anticorpos anticarboidratos que aglutinam células. Além disso, os anticorpos são estrutural e funcionalmente similares, enquanto as lectinas diferem entre si quanto à composição aminoacídica, requerimentos de metais, massa molecular e estrutura tridimensional (PAIVA et al., 2013).

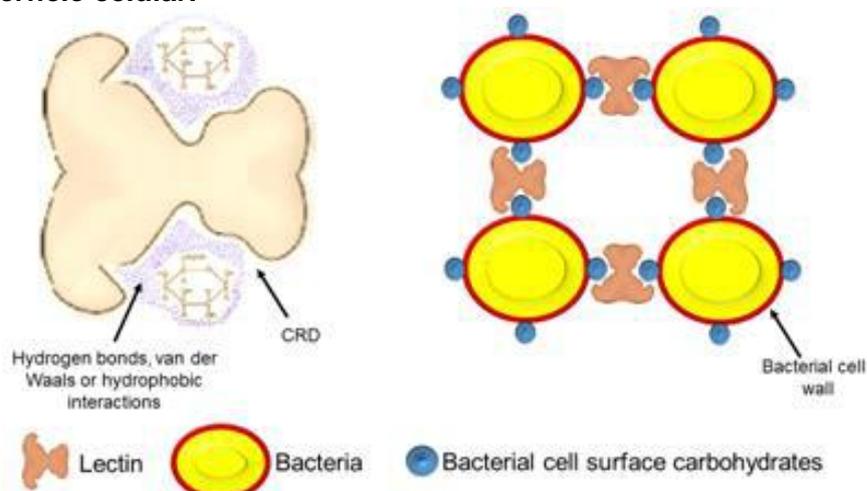
As lectinas possuem estruturas tão diversas quanto suas funções e aplicações, devido à capacidade de se ligarem de maneira seletiva e reversível aos carboidratos. Estas proteínas variam amplamente em tamanho, estrutura, organização molecular, bem como na constituição de seus domínios de reconhecimento a carboidratos (CDR). Atualmente essas proteínas têm exercido papéis extraordinários, tendo em vista seu potencial diversificado em áreas como biologia, medicina, farmacologia, bioquímica e biotecnologia (GOLDSTEIN et al., 1980; KENNEDY et al., 1995; CORREIA et al., 2008).

A literatura descreve que algumas lectinas necessitam da presença de um cofator, os íons bivalentes, para que as mesmas possam se tornar ativas e aptas para exercerem sua função biológica. Contudo, tem sido visto que muitas não necessitam ou apresentam em seu sítio ativo quaisquer cofatores para exercerem suas atividades ou funções (QU et al., 2015).

As lectinas, assim como outras proteínas, podem apresentar uma porção glicídica, sendo denominadas de glicoproteínas. Essa porção aumenta a estabilidade da lectina, reduzindo a susceptibilidade à degradação proteolítica e à desnaturação por aquecimento (ALBUQUERQUE et al., 2012).

Devido à capacidade de ligação das lectinas, estas podem interagir com um ou mais tipos de carboidratos, de forma reversível, fornecendo grande estabilidade as ligações, que podem ser por diversas forças como: ligações de hidrogênio forças de Van der Waals e interação hidrofóbicas (Figura 2), (LANNOO; VAN DAMME, 2010).

Figura 2: Representação esquemática da ligação entre a lectina, os carboidrato livres e os de superfície celular.

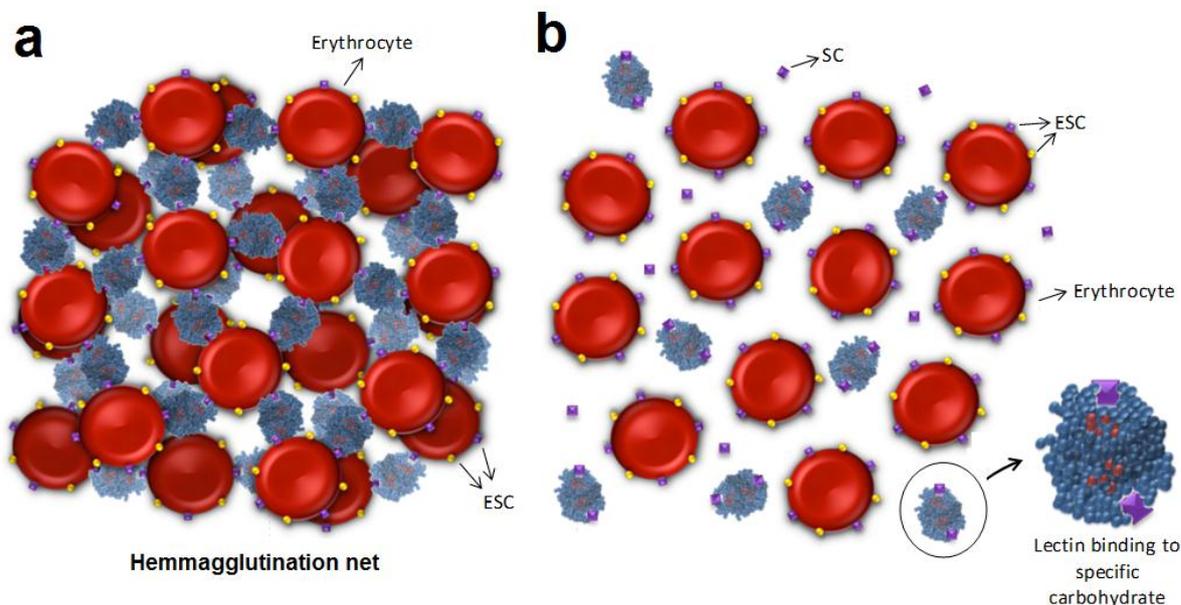


Fonte: PROCÓPIO et al (2017).

A presença de lectinas em uma amostra ou extrato é tradicionalmente detectada a partir de ensaios de aglutinação, uma vez que estas interagem com carboidratos da superfície celular através de seus sítios ou domínios de ligação a carboidratos, estabelecendo diversas ligações reversíveis entre células. As lectinas podem aglutinar células de diversos organismos, contudo o ensaio mais comumente utilizado é o de hemaglutinação, e este geralmente é realizado com eritrócitos de coelhos ou humanos, o qual é realizado através de uma diluição seriada da amostra contendo lectina e de posterior incubação com eritrócitos, que podem ser tratada através de ensaios enzimáticos (com tripsina, papaína, entre outras) ou químicos (com glutaraldeído ou formaldeído), aumentando ou não a sensibilidade das células à lectina (COELHO; SILVA, 2000; SANTOS et al., 2005). O inverso da maior diluição em que se observa a hemaglutinação (título) corresponde à atividade hemaglutinante (AH) (NAPOLEÃO et al., 2012).

Contudo, faz-se necessário destacar que diversos compostos tais como taninos, lipídios ou íons bivalentes podem dispersar eritrócitos através de ligações não específicas, dando um falso resultado. Tendo em vista esses aspectos e características, são necessários ensaios subsequentes de inibição da AH para confirmação da natureza lectínica da atividade hemaglutinante. No ensaio, é realizada uma diluição seriada da amostra em uma solução contendo carboidratos ou glicoproteínas livres previamente à incubação com eritrócitos. Os sítios de reconhecimento de carboidratos das lectinas serão ocupados pelos carboidratos ou glicoproteínas livres em solução e não poderão interagir com os açúcares das superfícies celulares, ocorrendo à precipitação dos eritrócitos (Figura 3). Este ensaio determina também o grau de especificidade da lectina a carboidratos, sendo o carboidrato mais específico aquele que resultou na maior inibição da hemaglutinação (PAIVA et al., 2013).

Figura 3: Esquema da atividade hemaglutinante (HA) e inibição de ensaios HA - a: A amostra de lectina induz hemaglutinação devido à ligação da lectina aos hidratos de carbono da superfície dos eritrócitos (ESC). **b:** Há a inibição ocorre quando a amostra de lectina é incubada com carboidrato antes da adição de eritrócitos; A ligação de um carboidrato específico (SC) aos locais de lectina extingue a formação da rede.



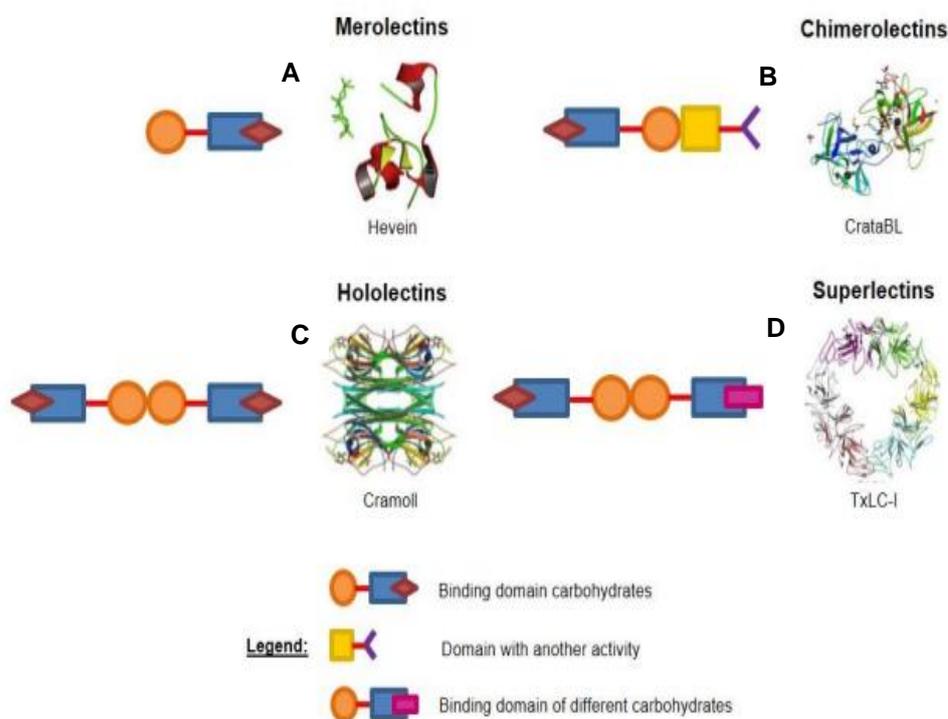
Fonte: SANTOS, ANDRÉA et al (2014.)

A grande maioria de lectinas de plantas apresenta especificidade por carboidratos simples (monossacarídeos) ou complexos (oligossacarídeos e glicanos), tais como manose, Nacetilglicosamina e ácidos N-glucurônico, galacturônico, xilurônico, L-idurônico, siálico e Nacetilmurâmico (VAN DAMME et al., 1998).

3.3.2 Classificação das Lectinas Vegetais

As lectinas vegetais estão divididas em quatro classes principais, (merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas) (Figura 4), de acordo com a sua estrutura e seu sítio de reconhecimento a carboidratos ou CDR, assim como seu grau de complexidade (VAN DAMME et al., 1995; VAN DAMME et al., 1998).

Figura 4: Classificação de lectinas de acordo com características estruturais - A: Heveina partir de *Hevea brasiliensis*; **B:**CrataBL a partir de *Crataeva Tapia*; **C:**Cramoll a partir de *Cratylia mollis* e **D:**TxLC-1 a partir de *Tulipa gesneriana*.



Fonte: Adaptado de Liu et al. (2010) e da Silva et al. (2014).

As **MEROLECTINAS** apresentam apenas um sítio de ligação a carboidratos, sendo denominada de monovalente, são incapazes de causar aglutinação de células ou de precipitar glicoconjugados. A lectina mais conhecida dessa classe é a Viena, obtida a partir do látex de *Hevea brasiliensis* (VAN DAMME et al., 1998).

As **HOLELECTINAS** apresentam dois ou mais sítios idênticos, sendo denominadas divalentes, pois podem fazer ligação a carboidratos, podendo também estabelecer ligações cruzadas entre células e glicoconjugados e, eventualmente, precipitando-os. Um exemplo dessa classe, denominada de Hololectinas, é a lectina de *Dioclea wilsonii* (RANGEL et al., 2011).

As **QUIMEROLECTINAS** além dos domínios de ligação a carboidrato, apresentam um ou mais domínios independentes e de função biológica distinta, podendo desempenhar uma função enzimática ou outra. A lectina PPL2 é um exemplo, sendo extraída a partir de sementes de *Parkia platycephala*, que apresenta

de forma independente um domínio ligante a quitina e outro com atividade endoquitinásica (CAVADA et al., 2006).

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

3.3.3 Purificação de Lectinas

Para que as características, propriedades e atividades de uma determinada proteína possam ser confirmadas se faz necessário avaliá-la em sua forma pura, para que se possa confirmar o princípio ativo da atividade observada nas preparações anteriores (extrato e fração pré-purificada) (NELSON; COX, 2014). A purificação de uma proteína, não é algo trivial, ou de simples feito, é necessário que alguns passos sejam previamente planejados e bem elaborados para que todo o processo seja produtivo e viável, e a isso se deve para todas as classes de proteínas, incluindo lectinas.

O processo de purificação de uma lectina é iniciado a partir uma preparação complexa, podendo ser denominada de extrato bruto, que pode ser advindo um de um órgão, tecido, célula, ou qualquer estrutura de onde a proteína de interesse venha estar (AUGUSTO, 2012; YAO et al., 2010).

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

No processo de extração muitas vezes é utilizado o auxílio mecânico, para triturar, ou macerar o tecido a ser estudado, é em alguns casos um passo fundamental. Os extratos são feitos utilizando diversas soluções de extração e recentemente foi utilizada uma solução tampão de PBS para extração da lectina de um fungo, *Laetiporus sulphureus* (WANG et al., 2018). Em outro trabalho foi observado a extração de lectinas da leguminosa *Crotalaria spectabilis* R, por solução salina NaCl (OLIVEIRA, 2017), assim como tem se observado a extração de lectinas de *Jatropha curcas* L. a partir de etanol (VIRGENS et al., 2016). Logo tem se observado que as soluções de extração podem ser as mais diversas possíveis, a depender da constituição do extrato e de suas características.

Para a preparação do extrato, o material é submetido à extração sob período de tempo e condições de temperatura pré-estabelecidas. Após o processo de extração, se inicia uma nova etapa para tentar isolar a proteína de interesse a partir um fracionamento, e dispersar a maior quantidade de contaminantes possíveis, otimizando assim as etapas posteriores.

O fracionamento pode ser realizado utilizando sais ou através de uma infinidade de solventes orgânicos. O fracionamento mais comumente usado para extração de lectinas, segundo a literatura, é através do uso ou a adição de sal, visto que a solubilidade de moléculas protéicas é reduzida em meio salino. O principal exemplo é o uso do sulfato de amônio, um sal altamente hidrofílico, que remove a camada de solvatação das proteínas fazendo com que as mesmas se precipitem. Logo com a remoção da camada de solvatação há um aumento nas interações entre proteínas do meio aquoso, permitindo a formação de um denso complexo de proteínas, provocando assim a precipitação dessas biomoléculas (PROCÓPIO et al., 2017). Esse processo de separação por meio de saturação salina de soluções é conhecido, pelo termo em inglês, *salting out*.

As lectinas parcialmente purificadas pelo tratamento salino são geralmente submetidas ao processo de diálise em membranas semipermeáveis, método baseado na separação de moléculas por diferenças de peso molecular. As proteínas ficam retidas dentro da membrana, enquanto moléculas menores (como carboidratos ou sais), presentes na amostra passam para a solução solvente (THAKUR et al., 2007).

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

Sem dúvidas dentre os métodos conhecidos e difundidos na atualidade para purificação de proteínas está à cromatografia líquida, sendo esta definida como excelente técnica e de grande ênfase na purificação de proteínas.

As cromatografias líquidas requerem sempre um grande cuidado para a longevidade da coluna, tendo em vista seu alto custo, inicialmente no processo de empacotamento das colunas, que não é algo trivial, e por isso requer que a matriz seja previamente retirada do refrigerador, para que esta se mantenha em temperatura ambiente, se calcula o volume exato e necessário da coluna, evitando com isso desperdícios da matriz. Após o volume ser previamente calculado é indicado que o processo de empacotamento seja feito de forma lenta e gradual, sendo imprescindível a observação e o cuidado com a matriz, evitando choques fortes e ríspidos, uma vez que tais cuidados evitam o rompimento dos *bids*, sedimentação da matriz, formação de bolhas, rachadura da fase estacionária e criação de duas ou mais fases na coluna. Após a coluna estar completamente empacotada a mesma estará pronta para os procedimentos de uso, de acordo cada método.

A cromatografia de gel filtração, também conhecida como cromatografia por exclusão molecular tem como princípio separar as proteínas por diferença de peso molecular. As proteínas de alto peso molecular percorrem um caminho mais curto e são eluídas, passando pelos *Bids* (esferas), mais rapidamente, porém as proteínas de baixo peso molecular penetram nas esferas de diâmetro específico presente na matriz polimérica da fase estacionária e tomam um caminho mais longo, sendo eluídas depois das proteínas de alto peso molecular (NELSON; COX, 2014). A fase estacionária de uma coluna de gel filtração pode variar de acordo com os polímeros a que são constituídas.

Alguns cuidados são importantes para se obter uma melhor resolução das cromatografias de exclusão molecular, tais como a altura da coluna, tendo em vista

que colunas com maior altura e menor espessura apresentam maiores resoluções na separação de proteínas. Outro fator imprescindível é o volume de amostra a ser aplicado, uma vez que quanto menor o volume a ser aplicado maior a resolução e o poder de resolução da coluna, a literatura descreve que o volume a ser aplicado deve ser de 2 % do volume total da coluna. Contudo é necessário observar outro fator importante, que é a viscosidade das amostras a serem aplicadas, pois amostras com muita viscosidade, como mucos de animais ou extratos de plantas e fungos com muita cor e pigmentação, poderão obstruir e até mesmo manchar a matriz estacionária causando danos à mesma (NGOC et al., 2015; ODDEPALLY et al., 2013; ZHAO et al., 2015; NASCIMENTO et al., 2016; SANTOS, 2016).

Tendo em vistas as cromatografias utilizadas para purificação de proteínas, a gel filtração se mostra de grande importância, devido ao seu potencial de separação de moléculas por sua massa molecular, que irá variar de acordo ao tamanho dos *bids* (poros) da fase estacionária, podendo esses ser maiores ou menores. Mas a gel filtração é indicada principalmente pra amostras advindas de um processo de fracionamento, pois ainda que não atinja o êxito com apenas esse processo, a sua escolha influência em grandes proporções a separação de proteínas e demais contaminantes, e vale salientar que o valor que as colunas de gel filtração ou sua matriz têm são mais acessíveis que outras matrizes de diferentes técnicas.

A literatura tem retratado o grande uso de colunas de gel filtração, para purificação de lectinas em apenas um só passo, a exemplo da lectina purificada da semente de *Borreria hispida*, purificada a partir de uma matriz Sephadex G-100 (RUPACHANDRA et al., 2014). E a partir da junção de outras cromatografias, é descrito a purificação da lectina Lunati, a partir de uma leguminosa *Phaseolus lunatus billb* (WU et al., 2016).

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

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

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

E sem dúvida e não menos importante, outro método extensivamente utilizado na purificação de lectinas tem sido a cromatografia de afinidade, que consiste em uma fase estacionária com altíssima afinidade a molécula de interesse, esse tipo técnica cromatográfica, não é indicada para extratos muito complexos, tendo em vista o custo relativamente alto da matriz, assim como a alta especificidade pela molécula de interesse no isolamento. A proteína de interesse se liga a matriz através de interações fracas. As proteínas que não possuem afinidade são eluídas juntamente ao tampão de corrida e apenas as proteínas de interesse ficam ligadas a matriz, para que essas moléculas sejam desligadas se faz necessário um novo eluente que possua alterações brandas no pH, na concentração de sal ou a utilização de uma molécula com maior afinidade a matriz estacionária que a proteína ligada a ela (XIU et al., 2015; VASCONCELOS et al., 2015; SANTOS, 2016).

Muitos trabalhos destacam o uso da cromatografia de afinidade para a purificação de lectinas, sendo esta uma das proteínas com maior índice de

purificação destacado na literatura por cromatografia de afinidade. Diversas lectinas foram isoladas por meio de cromatografia de afinidade, a exemplo da SteLL, extraída da folha de *Schinus terebinthifolius*, e WSMoL, isolada a partir de sementes de *Moringa oleífera*, ambas as lectinas purificadas com um único passo cromatográfico, utilizando matriz de quitina, em função de suas afinidades aos resíduos de N-acetilglicosamina (monossacarídeo constituinte da quitina), (GOMES et al., 2013. OLIVEIRA et al., 2016), assim como trabalhos de revisão que citam o grande uso de cromatografia de afinidade, como os descritos por Nascimento e Coelho (2012).

Para que um processo cromatográfico venha apresentar excelentes resultados e a metodologia venha ter êxito quatro variáveis deve ser levadas em consideração, são elas: a “Capacidade de separação”, ou seja, a quantidade de proteína que a coluna é capaz de suportar no processo de separação, evitando com isso a perda de material e diminuindo a vida útil da coluna. “Velocidade”, essa variável e muito importante, tendo em vista que cromatografias muito demoradas requerem mais gastos e muitas vezes inviabilizam o processo, o que pensando de forma econômica passa a ser inviável e se tratando da purificação de biomoléculas, o tempo pode ser uma variável de extrema importância, pois as proteínas podem sofrer desnaturação.

“Resolução” pode ser definida como a capacidade de separação da proteína em uma região específica distante ou até mesmo ausente de outras proteínas de um mesmo extrato. E por fim e tão importante quanto às três variáveis, temos a “Recuperação”, um passo imprescindível e sem dúvidas que culmina na avaliação de um protocolo bem estabelecido ou não, pois o fato de purificar, por mais complexo que seja, ou não, ele deve ser viável no sentido de proporcionar níveis de recuperação aceitáveis em um processo. Logo podemos definir que a purificação de proteína não é apenas uma técnica, mas uma ciência, onde pesquisadores que possuem uma maior e melhor compreensão sobre quais metodologias e processos usar poderá ter melhor e maiores resultados em tempo hábil.

3.3.4 Lectinas de plantas e suas aplicações

As plantas produzem uma variedade de proteínas, e dentre essas as lectinas constitutivamente expressas. Nas plantas as lectinas estão intrinsicamente ligadas a processos de germinação, manutenção ao estresse biótico e abiótico, proteção, e podem executar funções como: transporte de substâncias, armazenamento, função estrutural, reguladora, enzimáticas e de proteção contra patógenos parasitas como vírus, fungos e bactérias. (SANTOS et al., 2009; RATANAPO et al., 2001; RUDIGER et al., 1998; SINGH et al., 2012; LANNOO; VAN DAMME, 2014).

As lectinas de plantas se caracterizam como um grupo muito heterogêneo de proteínas, por apresentarem diferenças quanto a suas origens, relação evolucionária, propriedades bioquímicas e físico-químicas, estrutura molecular, função, especificidade a moléculas e atividades biológicas. É notório que há décadas muitos trabalhos já demonstraram maior quantidade de lectinas extraídas e purificadas das sementes (WONG et al., 2006; SINGHA et al., 2007; SITOHY et al., 2006; BRUSTEIN, 2012; SANTOS, 2009; SILVA, 2012; SILVA, 2014). Contudo, estudos das últimas décadas mostram que outros tecidos têm sido destacados como estruturas promissoras na extração de lectinas, tais como raízes (SOUZA, 2011), casca (Vaz, 2010; Araújo, 2012), bulbo (PARISI, 2006), fruto (WANG, 2006), látex (OTA, 2013), folhas (OOI, 2004; RAMESHWARAM, 2008; COSTA, 2010), rizoma (KAUR, 2005; CHU, 2006; YAO, 2010; SHAO, 2000), cerne (SÁ; NAPOLEÃO, 2008), tubérculos (KAUR, 2006) e flores (DIAS et al., 2015). Líquens associados a plantas também são fontes de lectinas (LEITE, 2005; RIVANOR, 2014).

Trabalhos mostram que as lectinas extraídas de plantas apresentam incidência em grupos específicos devido às características evolutivas e estruturais, sendo então classificadas em sete famílias, as quais são denominadas como lectinas de floema de Cucurbitaceae (NARAHARI et al., 2011) lectinas de ligação à quitina contendo domínios de heveína; lectinas de leguminosas (PENG, et al., 2006) lectinas inativadoras de ribossomos Rip2 (STIRP et al., 2007) lectinas ligadoras de manose; lectinas homólogas a jacalina (BARRE et al., 2004) e lectinas da família das Amarantinas. Contudo, existe uma maior incidência de lectinas da família das leguminosas, sendo esta família a mais bem estudada e caracterizada até os dias atuais.

Tabela 01. Classificação de lectinas quanto à especificidade ao ligante.

Famílias			Exemplos		Fonte
Lectinas glicose/manose	ligadoras de	Cratylia mollis	seeds	Lectin	DE Melo et al., 2011
		(CramoLL)			
Lectinas acetilglicosamina	ligadoras de N-	Schinus terebinthifolius	Leaves	Lectina	Gomes et al., 2013
		(SteLL)			
Lectinas galactose	ligadoras de	Bothrops leucurus	venon	Lectin	Nunes et al., 2015
		(BIL)			
Lectinas acetilgalactosamina	ligadoras de N-	Lectina de	macrófago humano		Takada et al., 2004
		(hMGL)			
Lectinas ligadoras de fucose		Colossoma macropomum	Serum	Lectin	Carvalho et al., 2012
		(ComaSeL)			
Lectinas siálico	ligadoras de ácido	Gymnopilus spectabilis		Lectin	Alborés et al., 2014
		(GSL)			
Lectinas glicoproteínas	ligadoras de	Sebastiania jacobinensis	Bark	Lectin	Vaz et al., 2010
		(SejaBL)			
Lectinas ligadoras de mucina		Aspergillus gorakhpurensis		Lectin	Singh et al., 2017

Além disso, as lectinas de plantas também são classificadas de acordo com a especificidade de suas interações com manose / glicose (BARI, 2013), manose / maltose, galactose / N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina / N-acetilglucosamina, galactose (WONG, 2006), manose, fucose e ácido siálico entre outros.

Devido à intrínseca capacidade e habilidade de ligação a mono, oligo ou polissacarídeos, as lectinas tem mostrado uma gama de atividades biológicas (Tabela 2), dando destaque aos processos de endocitose e mecanismo de transporte intracelular, adesão a células tumorais, indução de apoptose por intermédio de caspases em células tumorais, bloqueio de infecções causadas por microrganismos, regulação o processo de adesão e migração de células bacterianas além de desempenhar um papel essencial no sistema imune, identificando carboidratos que são exclusivos de patógenos (DIAS et al., 2015).

Tabela 2. Atividades biológicas de lectinas em diferentes tecidos vegetais

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

Fonte: Adaptado de SANTOS et al., (2014).

Moléculas que apresentem um potencial antimicrobiano tem sido um grande alvo de muitos pesquisadores, pois há necessidade constante de se conhecer sobre moléculas que apresentem essa característica. As lectinas têm mostrado um enorme potencial, devido as suas características biológicas contra esses organismos, quer seja contra infecções fúngicas, bacterianas e virais em plantas, animais ou em seres humanos.

Trabalhos recentes têm mostrado que uma lectina purificada de planta *Calliandras urinamensis*, apresenta atividade antibacteriana e efeito antibiofilme contra *S. saprophyticus*, e atividade antifúngica contra *Candida krusei*. Os resultados indicam que CasuL afetou a integridade da parede de *C. krusei* (PROCÓPIO et al., 2017).

A lectina purificada da semente de *Phaseolus lunatus* L., com massa molecular de aproximadamente 128 kDa, mostrou atividade antioxidante, antitumoral, frente a linhagens de células de melanoma, e atividade gastroprotetora *in vivo*. (E LACERDA et al., 2017).

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

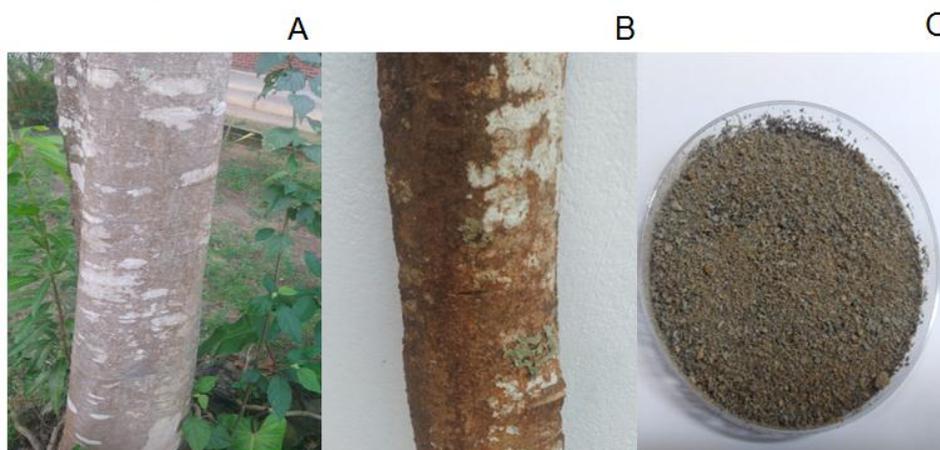
do crescimento de carcinoma, assim como controle de fungos fitopatogênicos, que tem sido alvo de grandes transtornos, principalmente para culturas perenes (WU, JINHONG et al., 2016)

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção do Material e Identificação

Após a identificação visual da planta *Genipa americana* L. em área de mata atlântica, no município de Coruripe, Alagoas, por observação de suas características morfológicas, a casca foi coletada e armazenada em sacos plásticos transparentes. O material foi conduzido até o laboratório de bioquímica da Universidade Federal de Alagoas, onde foi limpa, separada, cortada e triturada em liquidificador até a condição de pó e então colocado para secagem, em bandejas plásticas esterilizadas, que foram levadas a estufa a 35°C e permaneceram por sete dias até estarem totalmente secas (Figura 5). O pó foi acondicionado no freezer a - 20°C.

Figura 5: Estruturas e processos utilizados pra preparação do extrato - A) Caule de Genipa americana. B) Casca C) Pó da casca.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Para a identificação, as exsiccatas de *G. americana* foram levadas para herbário do Instituto de Meio Ambiente de Alagoas – IMA, sendo previamente identificada como *Genipa americana*. As coletas do material vegetal foram realizadas sob autorizações (número de processo 61847-2) do Instituto Chico Mendes (ICMBIO).

4.2 Preparo do Extrato

O pó da casca de *Genipa americana* foi retirado do freezer e deixado na bancada por 30 minutos, em temperatura ambiente, em recipiente de acondicionamento. Em seguida foi pesado 10g de pó, em uma balança analítica (Marte AY220) e transferido para um Béquer de 50,0 mL, logo após foram adicionados 40,0 mL de solução tampão de extração (Tris-HCl 50 mM pH 8,0). Para a extração dos compostos, a amostra ficou sobre agitação magnética por 12hs (Agitador magnético, IKA IKAMAG C-MAG HS7), a 4°C para evitar uma possível desnaturação da proteína de interesse, e, por fim, a amostra foi transferida para um tubo falcon de 50,0 mL e centrifugada em centrífuga refrigerada (HERMLE- Z236K), durante cinco minutos a 15.000 g, sob temperatura de 4°C. O sobrenadante foi retirado do tubo falcon, acondicionado em um novo recipiente e definido como extrato bruto.

4.3 Precipitação

A partir de 10 g de casca de *G. americana*, extraiu-se 24 mg de proteína totais, utilizando Tris-HCl 0,05 M (pH 8,0). Inicialmente, o extrato bruto foi submetido a uma série de três fracionamentos diferentes: etanol, acetona e sulfato de amônio- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, para verificar qual ou quais dos fracionamentos teria a capacidade de eliminar o maior número de contaminantes e concentrar a amostra em apenas uma fração.

4.3.1 Precipitação com solventes orgânicos (acetona e etanol)

Para avaliar e comparar outras formas de fracionamento protéico, foi realizado fracionamento com solventes orgânicos, como é mostrado na Tabela 3. As etapas de precipitação foram realizadas partindo de um volume inicial de 25,0 mL de extrato bruto, utilizando os critérios a seguir: 15.000 g a 4°C por 10 min, utilizando centrífuga refrigerada (HERMLE- Z236K).

Tabela 3. Precipitação com acetona e etanol.

Fração (%)	Volume de acetona (v/v)
20	0,25 mL/mL
40	0,5 mL/ml
60	1,0 mL/ml
80	2,0 mL/ml
100	_____

Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

4.3.2 Precipitação com sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄)

O fracionamento protéico foi realizado como é mostrado na Tabela 4. As etapas de precipitação foram realizadas a 15.000 g a 4°C por 10 min, utilizando centrífuga refrigerada (HERMLE- Z236K).

Tabela 4. Precipitação Salina

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

Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

4.4 Cromatografia Líquida

A fração (0,3 mL; 0, 512 mg de proteína) de maior atividade advinda do fracionamento salino (Precipitado 20 %) foi aplicada em uma coluna cromatográfica (60x1cm) de gel filtração em matriz Sephacryl S-100 (Figura 6), automatizada ao FPLC (ÄKTA Pure M1, GE Healthcare Life Science), onde o tampão de equilíbrio foi Tris-HCl pH 8,0 50 mM (A), e o mesmo foi utilizado para eluição, a um fluxo de 0,1mL/min em 2,0 volumes de coluna, sendo coletadas frações de 2 mL, a 25°C. A

eluição foi monitorada a 280 nm e, ao final, as frações foram avaliadas quanto à atividade hemaglutinante (AH) e dosagem protéica. As frações que apresentaram maior atividade hemaglutinante foram reunidas e denominadas lectina de casca de *G. americana* (GaBL).

Figura 6: Coluna cromatografica de Exclusão Molecular Sephacril S-100, com amostra de *Genipa americana*.

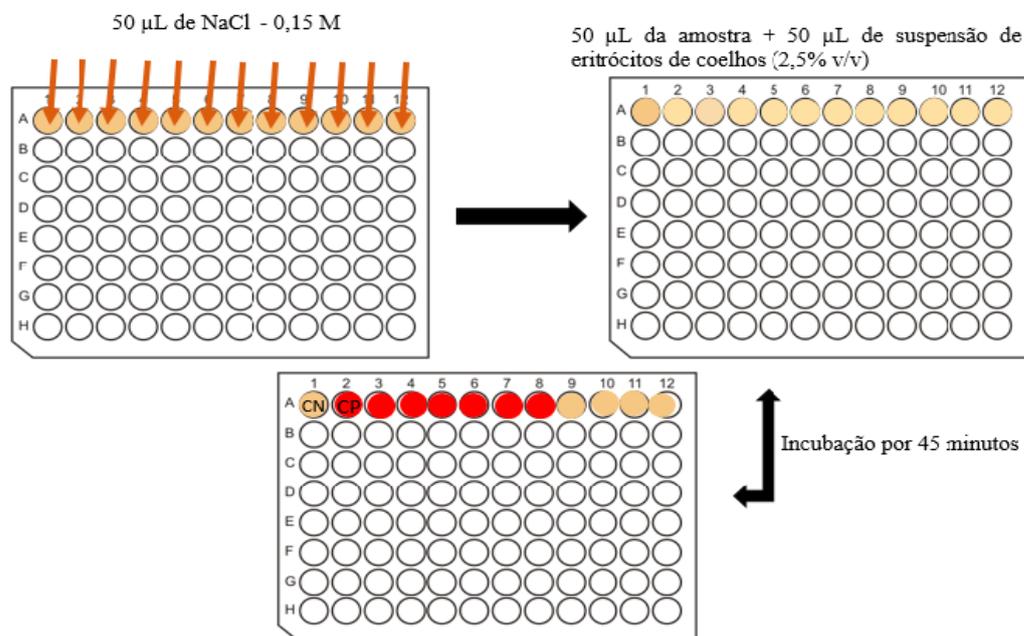


Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

4.5 Ensaio de atividade Hemaglutinante

O ensaio de atividade hemaglutinante (AH) foi realizado em placas de microtitulação (Figura 7), de acordo com a metodologia descrita por Paiva e Coelho (1992). Alíquota (50 μL) da amostra foi diluída serialmente em NaCl 0,15 M antes da adição de 50 μL de suspensão (2,5 % v/v) de eritrócitos de coelho tratados com glutaraldeído. A AH (título⁻¹) foi expressa como o inverso da maior diluição da amostra que promoveu hemaglutinação, (Figura 4). AH específica (AHE) foi definida pela razão entre o título e a concentração protéica (mg/mL).

Figura 7: Imagem ilustrativa da atividade Hemaglutinante.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

4.6 Eletroforese

O maior pico protéico mostrado através do cromatograma foi o que coincidiu com a maior atividade hemaglutinante e portanto este foi submetido à eletroforese para confirmar o grau de pureza da amostra, assim como demonstrar se a metodologia de purificação poderia ser efetivamente confirmada.

GaBL foi então avaliada por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) contendo dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) usando um gel a 10 % (p/v) sob condição não redutora e redutora em presença de β -mercaptoetanol (LAEMMLI, 1970). As bandas de polipeptídeos foram coradas com Coomassie Brilliant Blue (0,02 %, v/v) em ácido acético a 10 % (v/v). Os padrões de massa molecular (2,5-200 kDa, Invitrogen) também foram sujeitos a eletroforese. Os géis foram corados com azul de Coomassie dissolvido em ácido acético a 10 % (v/v), por 4hs e em seguida revelado com solução descorante (10 % ácido acético, 40% de metanol e 50 % água destilada).

4.7 Determinação da Concentração de Proteína

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

4.8 Ensaio de Inibição e Especificidade a Carboidratos e Glicoproteínas

A inibição da AH foi avaliada utilizando carboidratos e glicoproteínas como descrito por Carvalho et al. (2015). Alíquotas de 50 µL da amostra foram submetidas à incubação inicial em solução de carboidrato 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 de micro titulação 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.

As concentrações de soluções inibidoras foram 0,2; 0,1; 0,5 e 0,25 M para carboidratos D – Galactose, D – Glicose, Maltose, Fucose, Ribose, Raminose, Glicopiranoose, Piranoose, D – Frutose, D – Arabinose, D – Lactose, Manose, N-acetil-monosamina, N-acetil-glicosamina, N-acetil-galactose e 500, 250 e 125 µg/mL para glicoproteína (fetuína). A inibição é quantificada em razão da redução da AH quando comparado com o controle negativo.

4.9 Ensaio de avaliação de temperatura, estabilidade térmica e efeito do pH na atividade hemaglutinante

O ensaio para avaliar a estabilidade da lectina isolada da casca de *Genipa americana* L.(GaBL) em diferentes valores de pH foi feito com alíquotas de 200 µL que foram colocadas em membranas semipermeáveis (poros de 12 kDa e diâmetro de 2,5 cm) para dialisar por 6 horas, com trocas a cada 2 horas, contra vários

tampões com pH variando de 3 a 12: Tampão Citrato-fosfato 100mM (pH 3,0 – 4,0), Acetato de sódio 100 mM (pH 5,0 - 6,0) Fosfato de sódio 100 mM (pH 7,0), Tris-HCl 100 mM (pH 8,0) e Glicina-NaOH 100 mM (pH 9,0 a 12,0). Em seguida todas as amostras foram submetidas aos testes de atividade hemaglutinante com suspensão (2,5 % v/v) de eritrócitos de coelhos, para verificação da melhor atividade hemaglutinante.

O teste de temperatura e estabilidade térmica foi avaliado mantendo alíquotas de 200 μ L (GaBL) em tubos de 1,5mL, a temperaturas que variaram gradativamente entre 20 a 120°C, em banho maria com óleo mineral, devido ao seu maior ponto de ebulição, durante 30 e 60 minutos respectivamente. 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.

4.10 Quantificação de Fenóis totais

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

4.11 Efeito do EDTA e de Cátions divalentes sobre a Atividade Hemaglutinante

A dependência de cátions divalentes (Ca^{2+} e Mn^{2+}) para a atividade hemaglutinante da GaBL foi determinada pelo método de dupla diluição seriada usando EDTA como agente quelante, conforme PAJIC et al. (2002). Alíquotas de 200 μ L foram colocadas em membranas semipermeáveis com poros de 12 kDa, apresentando diâmetro de 2,5 cm, e dialisadas por 6 horas, com troca a cada 2

horas, frente ao EDTA e as soluções de Ca^{2+} e Mn^{2+} , e em seguida avaliada no teste hemaglutinante.

4.12 **Análise da conformação da lectina sob ação de pH**

Para analisar o equilíbrio conformacional da lectina GaBL, tanto nas formas nativa quanto na promovida pela ação de agente externo (variações de pH) foram utilizadas as espectroscopias de dicroísmo circular (nas regiões Far-UV para conformação secundária e Near-UV para vizinhanças terciárias). Brevemente, para a variação de pH foi utilizado o tampão PAB (Phosphate Acetate Buffer), contendo acetato, borato e fosfato, todos sais de sódio, a 20mM, com valores de pH ajustados utilizando-se HCl (para pH 7, 6, 5, 4, 3, 2) ou NaOH (para pH 8, 9, 10, 11, 12). Os experimentos de dicroísmo circular foram realizados em equipamento J810 (JASCO inc. Japão) na C.A. (IQ/USP), sob a supervisão e colaboração da Profa Patricia Targon Campana (EACH-USP).

4.13 **Ensaio de Atividade Antimicrobiana**

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

Todos os poços foram inoculados com 50 μL da cultura de fungos e as microplacas foram incubadas a 35°C por 24 h. Os ensaios foram feitos em duplicata. A determinação de 100 % de crescimento fúngico (controle negativo) foi feita através da inoculação de 50 μL da cultura de fungos em um poço contendo somente Meio de cultura RPMI. Para confirmar que o meio RPMI não estava contaminado, 50 μL de Meio RPMI foram incubados com 50 μL de solução fisiológica 0,9 % estéril. Após incubação, a densidade ótica a 530 nm (DO530) foi medida utilizando espectrofotômetro para microplacas. A CMI foi determinada como a menor

concentração na qual ocorreu a diminuição maior ou igual a 99 % em relação à DO 530 no controle negativo (NCCLS, 2003).

4.14 Ensaio de Viabilidade Celular

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

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Extração e Fracionamentos

As AH correspondentes aos fracionamentos são mostradas nas tabelas abaixo (Tabela 5-7), assim como as frações com maior atividade.

Diante dos relatos literários sobre a eficiência dos processos de purificação utilizando os solventes orgânicos, iniciamos a precipitação com etanol (Tabela 5).

A Tabela 5 ilustra o resultado do fracionamento. Pode-se perceber uma segmentação da atividade hemaglutinante em duas frações distintas (20 e 40 %).

Tabela 5. Fracionamento do extrato bruto com Etanol - AHE: Atividade Hemaglutinante Específica

Amostras	Proteína (mg/mL)	Proteínas Totais (mg)	AHE
Extrato Bruto	0,8	20,0	1280
F1- 0-20% (Precipitado)	1,14	2,28	449
F2- 20-40% (Precipitado)	0,97	1,95	264
F3- 40-60% (Precipitado)	0,22	0,458	0
F4- 60-80% (Sobrenadante)	0,33	7,624	0
F5- 80-100% (Sobrenadante)	0,35	7,713	0

Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Em seguida foi realizado outro processo de precipitação com solvente orgânico, utilizando acetona (Tabela 6), onde foram mantidas as mesmas condições no processo de fracionamento, sendo mudada apenas a solução orgânica. Pode-se perceber novamente uma segmentação da atividade hemaglutinante em duas frações distintas (20 e 40 %).

Tabela 6. Fracionamento do extrato bruto com Acetona - AHE: Atividade Hemaglutinante Específica

Amostra	Proteína (mg/mL)	Proteínas totais (mg)	AHE
Extrato Bruto	0,8	20, 0	1280
F1- 0-20% (Precipitado)	1,1	2, 112	232
F2- 20-40% (Precipitado)	0,9	1, 957	284
F3- 40-60% (Precipitado)	0,5	1, 116	0
F4- 60-80% (Sobrenadante)	0,3	7, 282	0
F5- 80-100% (Sobrenadante)	0,3	7, 355	0

Fonte: elaborado pelo autor, 2018.

Segundo Costa (2016), o uso de solventes orgânicos para precipitação de proteínas apresenta várias vantagens, podendo citar a sua fácil remoção, recuperação e reciclo e as suas propriedades bactericidas. Outro fator determinante na precipitação com solvente orgânico, segundo Scopes (1987), é o tamanho das moléculas de proteína. Em seus trabalhos, o mesmo observou que as moléculas de menor tamanho necessitam de uma concentração maior de solvente para a sua

precipitação. A presença de atividade hemaglutinante nas frações com menor concentração de solvente indicava que a lectina a ser isolada provavelmente era de elevado peso molecular.

Oh et al., (2011) conseguiram separar proteínas de massa moleculares diferentes, presentes em uma solução, variando apenas a concentração do solvente. Os mesmos observaram que, proteínas com massa molecular de 200 KDa foram precipitadas com a concentração de etanol de 25% (v/v), enquanto proteínas com massa molecular na faixa de 37 a 174 kDa foram precipitadas quando a concentração de etanol foi elevada a 75% e as proteínas com massa molecular de 23 kDa não foram racionadas com esse processo de separação.

No entanto, o uso de solventes orgânicos pode apresentar desvantagens, como à tendência a causar danos estruturais à proteína e muitas vezes afetar a atividade da mesma, fazendo com que essa perca totalmente sua atividade ou venha reluzi-la drasticamente (COSTA et al., 2016).

O extrato bruto de *G. americana* (atividade hemaglutinante específica: 640) foi fracionado com 20% de sulfato de amônio (F1) (Tabela 7), sendo observada que a fração precipitada apresentou maior atividade hemaglutinante específica (1.561), como mostrado na Tabela 8. Desta forma, ficou evidenciada maior efetividade do sulfato de amônio em concentrar a lectina.

Extrato e F1 apresentaram conteúdo de fenol de 6,59 e 14,85 mM, respectivamente. Apesar do conteúdo de fenóis também ter se elevado no fracionamento, após o procedimento cromatográfico que ocorreu em seguida houve eliminação total desses metabólitos.

Tabela 7. Fracionamento do extrato bruto com Sulfato de Amônio - AHE: Atividade Hemaglutinante Específica

Amostra	Proteína (mg/mL)	Proteínas totais (mg)	AHE
Extrato Bruto	0,8	20	1280
F1- 0-20% (Precipitado)	1,6	3, 28	1280
F2- 20-40% (Precipitado)	0,8	1, 692	40
F3- 40-60% (Precipitado)	0,3	0, 531	0
F4- 60-80% (Sobrenadante)	0,3	7, 266	0
F5- 80-100% (Sobrenadante)	0,3	7, 311	0

Fonte: elaborado pelo autor, 2018.

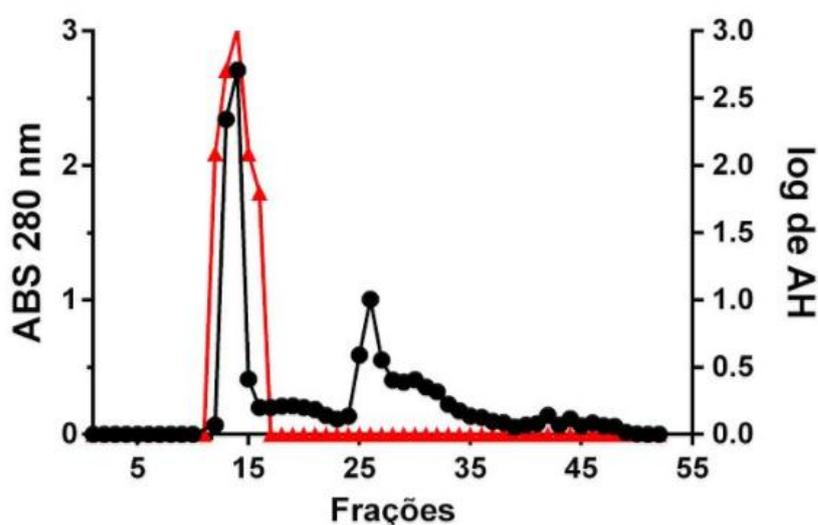
O sulfato de amônio mostrou ser mais estável e menos agressivo a essas biomoléculas (lectinas). Além disso, a precipitação com sulfato de amônio não requer uma diálise do conteúdo protéico para os ensaios de hemaglutinação, tendo em vista que não é comprometido por esses sais, o que não pode ser verificado nas etapas anteriores de fracionamento com os solventes orgânicos.

Diante dos resultados expressos podemos constatar que para GaBL, o fracionamento mais viável e promissor foi com sulfato de amônio, sendo possível obter através deste, em apenas uma fração a lectina com elevada atividade específica (1.561), como mostrada na Tabela 8. Além de ter evitado o processo de diálise posterior a pré-purificação, esse dado corrobora com os dados obtidos por Silva (2015) e Oliveira (2017), que também obtiveram êxito no fracionamento salino, pré-purificando sua amostra em apenas uma fração.

5.2 Isolamento de GaBL

A lectina foi purificada por cromatografia da F1 em uma coluna Sephacryl S-100 equilibrada com Tris-HCl 0,05 M pH 8,0. Um único pico protéico ativo (GaBL, atividade hemaglutinante específica de 1.838) foi eluído usando Tris-HCl 0,05 M pH 8,0 (Fig. 8).

Figura 8: Perfil cromatográfico da cromatografia de Exclusão Molecular Sephacryl S-100 - ▲ Atividade Hemaglutinante de GaBL (Genipa americana bark lectin). ● Leitura da abs 280 nm (Perfil Protéico).



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

A cromatografia apresentou um excelente perfil de eluição, com ótima resolução e com poucos picos eluídos. A partir de 10 g de casca em pó isolou-se 8,35 mg de GaBL com um rendimento de purificação de 100% e um fator de purificação de 2,9 vezes em relação ao extrato bruto (Tabela 8).

Tabela 8. Purificação lectina da casca de *Genipa americana* - AHE: Atividade Hemaglutinante específica determinada com eritrócitos de coelhos. Fator de Purificação: Relação entre a AHE da etapa e a AHE do extrato. Rendimento: Relação entre a atividade hemaglutinante total da etapa e a atividade hemaglutinante do extrato.

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

Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

O passo inicial para a investigação do potencial biotecnológico das lectinas é o isolamento dessas biomoléculas (PROCÓPIO et al., 2017). Através de um único procedimento cromatográfico, por gel filtração, foi possível isolar com 100% de rendimento a lectina da casca de *G. americana* (GaBL).

Outras lectinas de origem vegetal foram isoladas usando apenas um passo cromatográfico, por cromatografia de afinidade com matriz de quitina, a exemplos das lectinas: SteLL, isolada de folhas de *S. terebinthifolius*, MuBL e MuHL, ambas extraídas da casca e do cerne da *Myracrodruon urundeuva* respectivamente e WSMoL, isolada de sementes de *Moringa oleífera* (GOMES et al., 2013; SÁ et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2017).

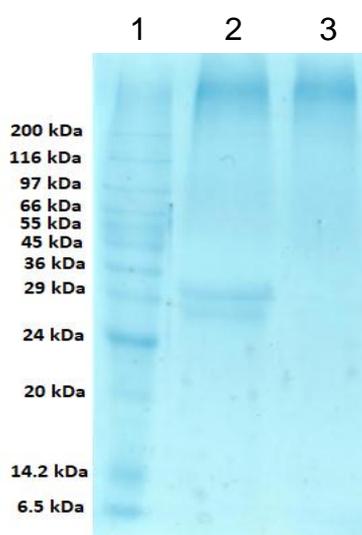
Os compostos fenólicos não foram detectados no material coletado da cromatografia de gel de filtração contendo GaBL. O alto rendimento obtido no procedimento de isolamento de GaBL provavelmente reflete a eliminação total de fenóis da F1 após a coluna Sephacryl S-100. Os lipídios ou polifenóis, como os taninos, que muitas vezes são abundantes em tecidos vegetais, podem formar complexos solúveis ou insolúveis com proteínas, interferindo assim com sua atividade biológica e resultando em um falso positivo (Jakobek, 2015). Araujo et al. (2012), usando a coluna CM-Cellulose, isolou uma lectina da casca de *Crataeva*

tapia (CrataBL) com um rendimento de 100 %. Os autores sugeriram a presença de compostos fenólicos no extrato que foram removidos após o procedimento de purificação.

5.3 Eletroforese SDS-PAGE

Os resultados expressos na (Fig. 9), mostram que GaBL é um polipeptídeo de 242,5 kDa em condições não redutoras. Na condição redutora, o polipeptídeo apresentou duas bandas de 42,1 e 38,4 kDa. Desta forma, GaBL é uma lectina com alta massa molecular formada por diferentes subunidades ligadas por ligações dissulfeto de duas subunidades de 42,1 e 38,4 kDa. Gel a 10% também foi feito para que a proteína pudesse se deslocar mais pelo gel de separação e os dados de pesos moleculares e padrão de bandas novamente foram confirmadas (Fig. 9).

Figura 9: Eletroforese com gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 10 % - 1: marcador de peso molecular, 2: GaBL em condições desnaturantes e redutora; 3: não redutora



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

A massa molecular das lectinas de casca pode variar amplamente, como lectinas de cascas de *Myracrodruon urundeuva*, *Crataeva tapia* e *Sebastiania jacobinensis* com 14, 40 e 52 kDa, respectivamente (Sá et al., 2009; Vaz et al., 2010; Araújo et al., 2012).

No entanto, foram relatadas poucas lectinas de plantas com massa molecular maior que 100 kDa, como as duas lectinas isoladas a partir de sementes de

Araucaria brasiliensis (200 kDa), formadas por dez e seis subunidades respectivamente (DATTA et al., 1991). Em animais, as lectinas com alto peso molecular foram isoladas do muco de *Achatina fulica* (350kDa) e da pele de *Aplysia kurodai*, com 200kDa (OSEKI, 1998; ITO et al., 2011). O alto tamanho da GaBL pode oferecer a esta lectina características estruturais únicas e funções diferentes.

5.4 Teste de Inibição da AH de GaBL com Carboidratos e Glicoproteínas

Para caracterizar a lectina quanto à especificidade a carboidratos, a AH de GaBL foi avaliada na presença de carboidratos e glicoproteína (Tabela 9). A lectina mostrou uma forte especificidade por lactose e foi inibida pela fetuína de soro bovino, uma glicoproteína constituída por galactose, manose, glicosamina, galactosamina e ácidos siálicos. Frutose, ribose, glicose e arabinose também mostraram capacidade de reduzir a AH de GaBL. O processo de inibição por carboidratos ocorre em função do comprometimento do domínio de reconhecimento a carboidratos – DRC, uma vez que, os carboidratos livres em solução interagem com os sítios de ligação de lectinas impedindo parcialmente a interação da lectina com glicídios ou glicoconjugados presente na superfície da membrana plasmática dos eritrócitos, levando a uma redução significativa da atividade da lectina.

Tabela 9: Teste de inibição da Atividade Hemaglutinante de GaBL por carboidratos e glicoproteína - NI = Não inibiu.

LIGANTE	AHE GaBL
Controle Negativo	2048
D-Frutose	256
D-Ribose	256
D-Glicose	512
D-Arabinose	512
D-Fucose	NI
D-Galactose	NI
D-Manose	NI
Raminose	NI
Piranose	NI
Glicopiranose	NI
N-acetilglicosamina	NI
N-acetilmonosamina	NI
N-acetilgalactosamina	NI
D-Maltose	NI
D-Lactose	32
Fetúina (glicoproteína)	32

Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Outras lectinas apresentam a mesma característica quanto à especificidade, sendo denominadas lectinas ligadoras de lactose, a exemplo da brosimin, extraída da planta *Brosimum gaudichaudii*, que apresentou uma forte inibição em sua atividade hemaglutinante quando tratada com baixas concentrações de lactose (BATISTA et al., 2017).

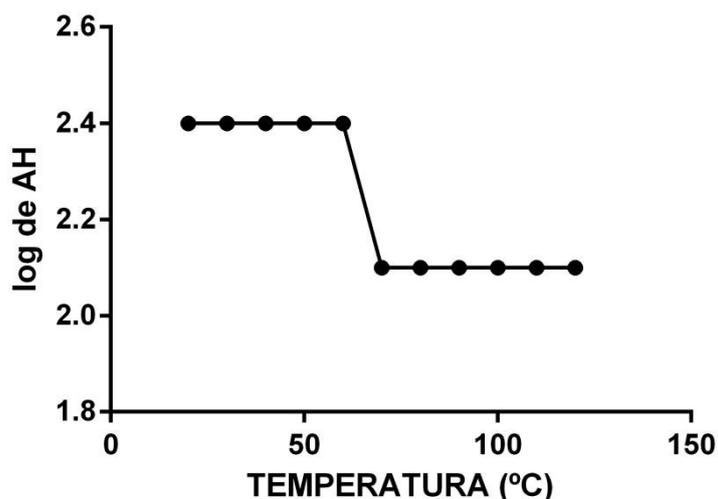
5.5 Teste de Termoestabilidade

Diversos fatores influenciam a estabilidade de uma proteína, dentre estes podemos destacar a temperatura, que é um componente físico determinante na estrutura nativa de proteínas, uma vez que é essencial que cada proteína possa melhor se estabelecer em sua faixa de temperatura ótima (NELSON e COX, 2014).

GaBL teve sua atividade avaliada em diferentes temperaturas, 20–120°C, para especificar sua termoestabilidade. O teste foi realizado em banho-maria contendo óleo mineral.

Com base nos valores expressos na figura 10, GaBL apresenta-se como uma proteína muito estável em uma extensa faixa de temperatura quando incubada por 60 min, inclusive estável em faixas de temperaturas acima da média, para diversas lectinas conhecidas. GaBL manteve sua AH intacta até 70°C e apresentando uma pequena queda entre 80 -120°C. Dessa forma, GaBL se mostrou muito estável em temperaturas acima de 100°C, por 60 min, um intervalo de tempo muito longo para uma proteína. Segundo Campana et al. (2011) a estrutura secundária rica em β -folha e a presença de ligações dissulfeto estão relacionadas a maior termoestabilidade de lectinas.

Figura 10: Teste de Termoestabilidade. As amostras foram incubadas por 60 minutos.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

A termoestabilidade de proteínas tais como lectinas, pode estar relacionada com a natureza das interações que mantêm a sua estrutura tridimensional, bem como o ambiente onde estão inseridas. Lectinas de origem vegetal na sua grande maioria apresentam maior proporção de estruturas secundárias do tipo β -folha em sua organização tridimensional, conectadas por alças, conferindo maior estabilidade frente à temperatura (BOSE et al., 2016).

Lectinas isolada de sementes de *Centrolobium microchaete*, a lectina purificada de sementes de *Platypodium elegans* e a lectina de *Punica granatum L.*

(PgTeL), diminuíram suas atividades e/ou sofreram desnaturação a 80°C (SILVA, et al., 2015, VASCONCELOS-FILHO et al., 2015. ARARIPE et al., 2017). Embora sejam pouco comuns, alguns trabalhos descritos na literatura mostram lectinas que mantiveram a atividade hemaglutinante mesmo ao serem submetidas à temperatura de 100°C, a exemplo da lectina CNA, isolada de sementes de *Clathrotropis nítida* (ALVES et al., 2015) e CasuL, uma lectina isolada de *Calliandra surinamensis*, que foi estável em uma faixa de temperatura bem ampla, quando submetidas a temperatura de até 100°C (PROCÓPIO, et al., 2017). Contudo, não é comum observar lectinas estáveis em temperaturas extremas acima dos 100°C.

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

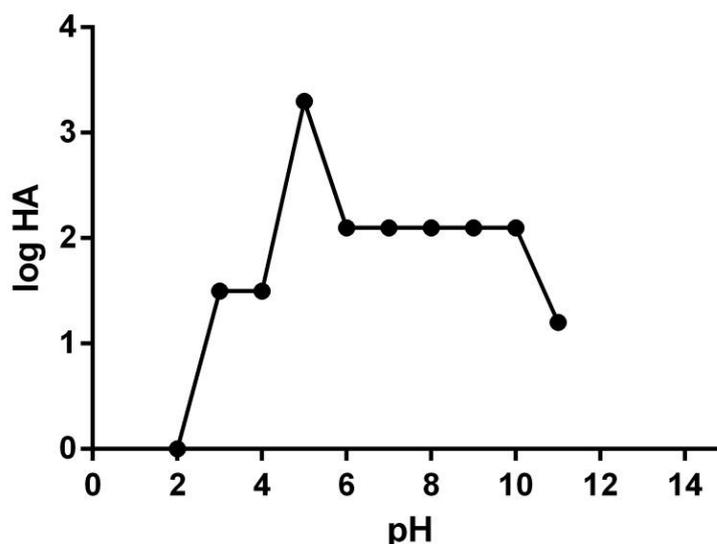
A GaBL mostrou uma estabilidade notável em sua atividade hemaglutinante em amplos intervalos de temperatura, mantendo-se ativa até 120°C, intervalo a que foi submetida.

5.6 Teste de Estabilidade a Variação do pH

O teste de estabilidade a diferentes valores de pH (Fig. 11), demonstrou notável estabilidade da GaBL. A AH de GaBL foi maior em pH 5,0 (AH: 1024), reduzindo para 128 entre pH 6,0 e 10,0 e para 16 em pH 11,0. Em valores de pH inferiores a 5,0, houve redução na AH para 32 (pH 4,0 e 3,0) e só perdendo totalmente a atividade em pH 2,0. Esse ensaio de verificação de estabilidade ao pH, dializando a lectina ao tampão por maior tempo, permite que a molécula possa realmente ter total interação com o meio a qual foi submetido, tendo em vista que esse tempo de incubação irá permitir as possíveis modificações e variações na

estrutura da proteína. A adição de íons H^+ na solução reacional tende a favorecer a protonação de alguns grupos ionizáveis presentes na cadeia primária (amino-terminal, carboxi-terminal e cadeias alquilas laterais) das proteínas podendo provocar possíveis variações na estrutura e função das mesmas, assim como pode melhorar ou dificultar a atividade exercida pelas proteínas (NELSON e COX, 2014).

Figura 11: Teste de estabilidade a pH. A lectina foi dializada por 6 horas em todos os valores de pH.



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2018.

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

A literatura tem reportado que lectinas vegetais apresentam uma maior estabilidade em pH neutro e alcalino, principalmente as lectinas extraídas e purificadas de plantas leguminosas, a exemplo da lectina de *Morus alba*– MaL, que apresenta seu pH ótimo entre 7,0 – 8,0, e a lectina purificada de sementes de *Platypodium elegans* (PeLa), que apresentou sua atividade majoritariamente em pH básico 9,0 e 10,0 (KHURTSIDZE et al., 2017; ARARIPE, et al., 2017). Contudo diante dos resultados expressados na Figura 11, GaBL apresentou seu pH ótimo em torno de 5,0 e 6,0 apresentando relativa estabilidade em pH neutro e básico.

A estabilidade de pH e temperatura de GaBL pode ser devido às suas ligações dissulfeto e do seu alto peso molecular. Pois um maior número de ligações covalentes (ligações dissulfeto) e não covalentes podem aumentar a estabilidade de uma proteína. Em um estudo anterior, duas lectinas isoladas das sementes de *A. brasiliensis*, ambas com 200 kDa, apenas tiveram a sua atividade hemaglutinante abolida a 80°C (DATTA et al., 1991).

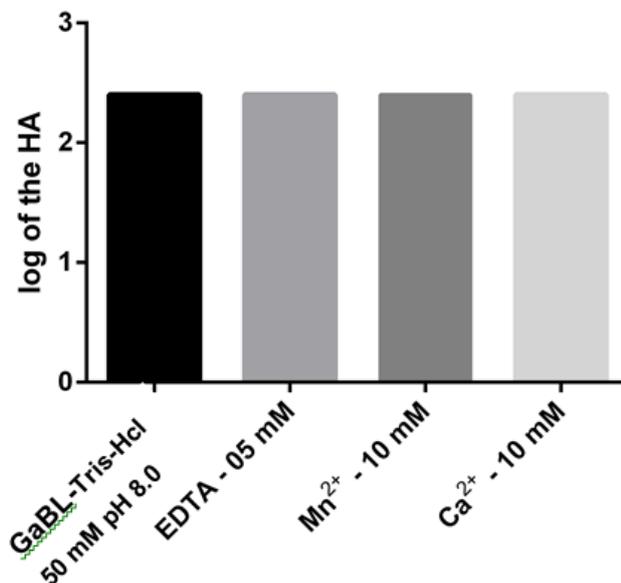
A estabilidade de GaBL a diferentes valores de pH e temperatura é uma característica físico-química desejável para sua utilização no tratamento de doenças infecciosas humanas e estimular futuros testes *in vivo* e *in vitro* com GaBL uma vez que não seria afetada por mudanças de pH que poderiam ocorrer durante a realização desses testes (LUDINGTON et al., 2016).

5.7 Efeito de Íons na AH de GaBL

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

Algumas lectinas apresentam sua atividade regulada e influenciada por grupos prostéticos como (cátions Mn^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+}). A literatura retrata que tanto lectinas animais como vegetais podem apresentar a dependência desses íons para promover suas funções e atividades. Essa interferência não ocorreu com GaBL, já que Ca^{2+} e Mn^{2+} não afetaram sua atividade, como mostra a figura 12. GaBL se mostrou resistente ao quelante de metais EDTA, quando tratada exaustivamente em diálise por 24 hs, assim como quando tratada com os íons Ca^{2+} e Mn^{2+} , sobre mesmo período de tempo.

Figura 12: Avaliação do efeito de íons na AH



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Foi observado por Carneiro et al. (2017) um resultado similar para a lectina isolada da *Aplysina lactuca* (esponja marinha), que apresentou atividade estável mesmo após o tratamento com EDTA e cátions divalentes. Um trabalho recente retrata que uma lectina obtida do cogumelo *Laetiporus sulphureus*, denominada LSL demonstrou que sua atividade relativa de aglutinação foi reduzida por íons Fe³⁺ e Al³⁺. No entanto os íons Ca²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺ e Mn²⁺ não inibiram a atividade, sendo LSL uma lectina não dependente de íons (WANG et al., 2018).

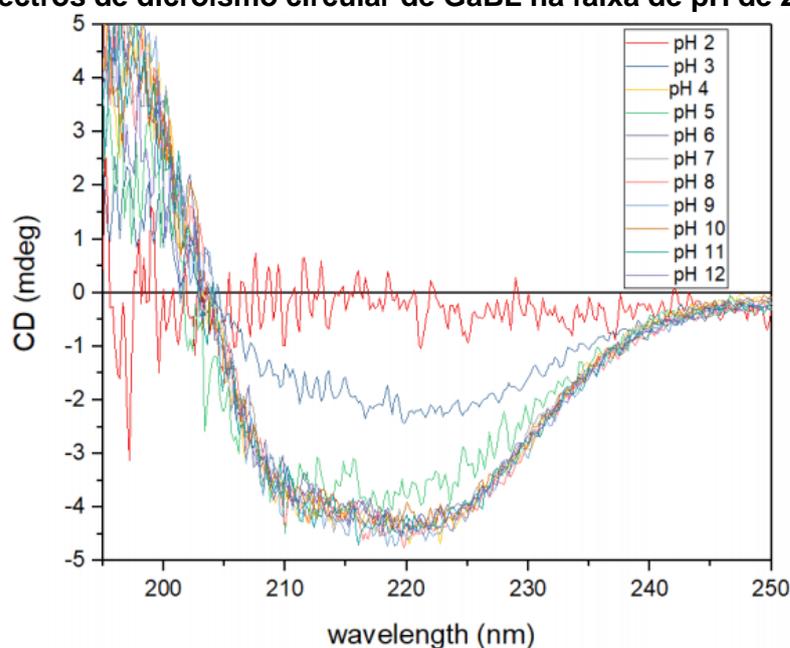
Contudo, existem diversas lectinas que se apresentam como dependente de íons como mostra o trabalho com esponja marinha *Stylissa flexibilis*, que mostrou ser uma lectina dependente do íon Ca²⁺ (LY, BUI MINH et al., 2018). A literatura retrata que lectinas de origem animal denominadas lectinas do tipo C, detêm essa característica, como mostra a lectina isolada da peçonha da cobra *Bothrops leucurus* –BIL, que se apresenta como uma lectina dependente de Ca²⁺ (DOS SANTOS NUNES et al., 2011).

5.8 Análise da conformação da lectina sob ação de pH

Por dicroísmo circular, GaBL demonstrou que tem elevado conteúdo de β -folha. Diversos valores de pH foram avaliados e a estrutura de GaBL não sofreu alterações significativas na faixa de pH de 4-11 (Figura 13). Apenas nos extremos de

pH (2,0, 3,0 e 12,0), observou-se a perda de estrutura conformacional da lectina destacando-se o pH 2,0, onde essa perda ficou mais evidente. Esse resultado corrobora com o que foi observado no teste de estabilidade de GaBL ao pH, em que o pH 2,0 aboliu a atividade hemaglutinante da lectina e reforça a elevada estabilidade da lectina frente à diferentes valores de pH. GaBL foi mais estável que a lectina ligadora de galactose de *Morus indica* (MLGL), cuja estrutura secundária é inalterada na faixa de pH de 6,2 a 8,5, mas com diminuição da atividade da lectina (~50%) em pH 6,2 (SWAMY, 2017).

Figura 13: Espectros de dicroísmo circular de GaBL na faixa de pH de 2,0 até 12,0.

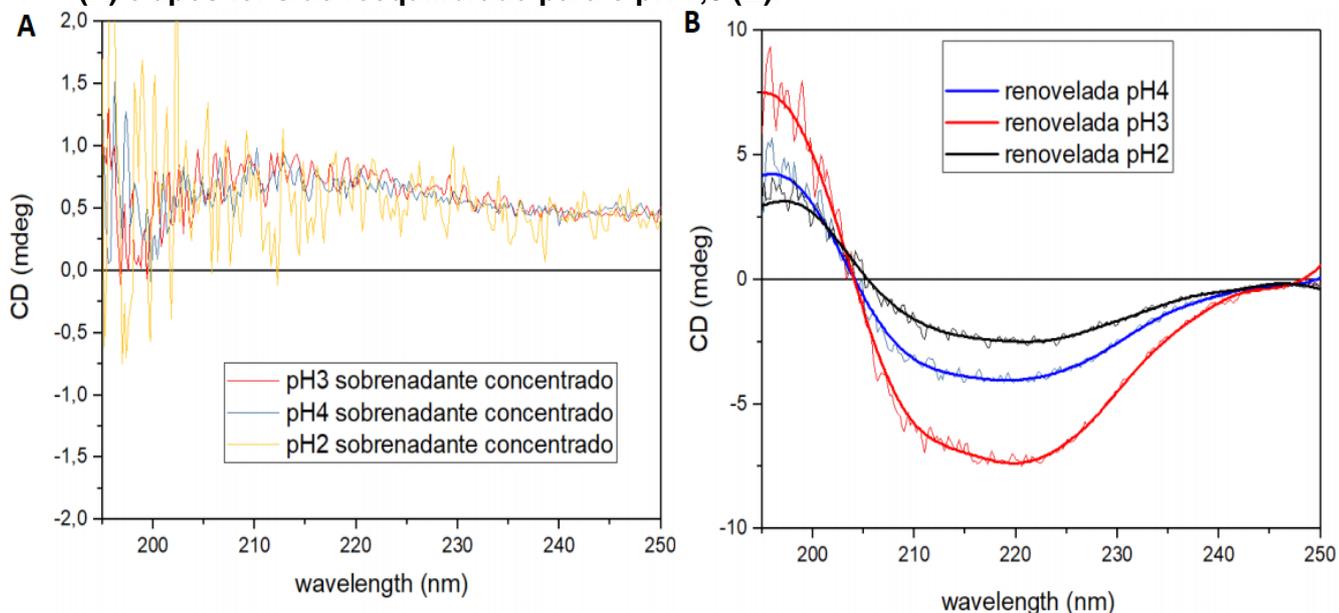


Fonte: elaborada pelo autor, 2018.

Foi possível observar que GaBL sofreu rápida aglomeração e precipitação durante a realização do teste de dicroísmo circular em pH 2,0 e 3,0 e, de forma menos intensa, em pH 4,0. Coletando-se esse material precipitado e ressolubilizando-o em tampão PBS pH7,0, foi possível perceber que GaBL foi capaz de sofrer renaturação, retomando parcial ou totalmente a sua estrutura conformacional secundária quando comparada aos espectros de dicroísmo circular da GaBL nos pH avaliados (Figuras 14 A e B). Quando a ressolubilização foi feita em pH 7,0, foi possível observar que o aglomerado que havia precipitado imediatamente voltou a tornar-se solúvel. Desta forma, apesar de GaBL apresentar uma estrutura molecular bastante complexa, demonstrada pelo elevado peso

molecular, ela apresenta uma elevada capacidade de sofrer renaturação quando reestabelecida as condições ideais para sua atividade.

Figura 14: Espectros de dicroísmo circular de GaBL nos valores de pH 2,0, 3,0 e 4,0 (A) e após ter sido reequilibrado para o pH 7,0 (B).



Fonte: elaborado pelo autor, 2018.

5.9 Testes Biológicos

5.9.1 Atividade Antifúngica

Os fungos do gênero *Candida* são de grande importância médica, uma vez que organismos desse gênero são agentes causadores de vários tipos de infecções, especialmente na boca, olhos e mucosa genital, bem como infecções sistêmicas em indivíduos imunocomprometidos como pacientes com HIV ou câncer (LIMA, K.M., 2008). O desenvolvimento da resistência por estes agentes quimioterapêuticos fungos também é relatado, o que incentiva a busca de novos agentes antifúngicos (PFALLER, M.A., 2011; EDGAR, R., 2012).

As lectinas têm mostrado uma potente atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-negativas, Gram-positivas e fungos, através da interação com peptidoglicanos, polissacarídeos, lipopolissacarídeos, ácidos teicoicos na parede celular bacteriana e fúngica (IORDACHE et al., 2015).

A atividade antifúngica foi avaliada frente ao extrato bruto, F1 e GaBL, tendo em vista os inúmeros relatos da literatura sobre as propriedades de *Genipa americana*, assim como o tratamento de diversas infecções de origem patológica por fungos e bactérias. O ensaio foi realizado por microdiluição em placa. As leveduras avaliadas, a princípio, foram *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*, como mostra a Tabela 10 abaixo.

Tabela 10: Atividade antifúngica de GaBL fungos patogênicos - ND: Não detectado atividade na concentração testada.

Microorganismo	Amostra	MIC (ug/mL)
<i>Candida albicans</i>	Extrato	ND
	F1 0-20%	ND
	GaBL	25
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Extrato	3
	F1 0-20%	12,5
	GaBL	12,5

Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

C. albicans e *C. neoformas* possuem características diferentes, quanto à estrutura e mecanismos de ação. Isso mostra a versatilidade que GaBL apresentou em inibir organismos patogênicos distintos, demonstrando que GaBL é uma promissora ferramenta contra agentes patológicos.

Em trabalhos recentes foi observada a presença de atividade antifúngica de uma lectina isolada da folha de *Calliandra surinamensis* (CasuL), onde esta foi avaliada contra quatro espécies de *Candida*, mas apenas *C. krusei* foi sensível a esta lectina (MIC e MFC de 125 e 250 g / mL, respectivamente) (PROCÓPIO et al., 2017), embora menos eficientes que GaBL.

A lectina isolada da citobactéria *Scytovirina* mostrou atividade antifúngica contra criptococos patogênicos *Cryptococcus neoformans var. neoformans* e *C. gattii*. Os autores relatam que a lectina inibiu o crescimento de células fúngicas através da ligação à parede celular (JONES et al., 2017).

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

Outras lectinas fúngicas de corpos frutíferos do cogumelo *Sparassis latifolia* demonstraram atividade antibacteriana contra *E. coli* e cepas resistentes de *S. aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* e atividade antifúngica em espécies de *Candida* e *Fusarium* (CHANDRASEKARAN et al., 2016).

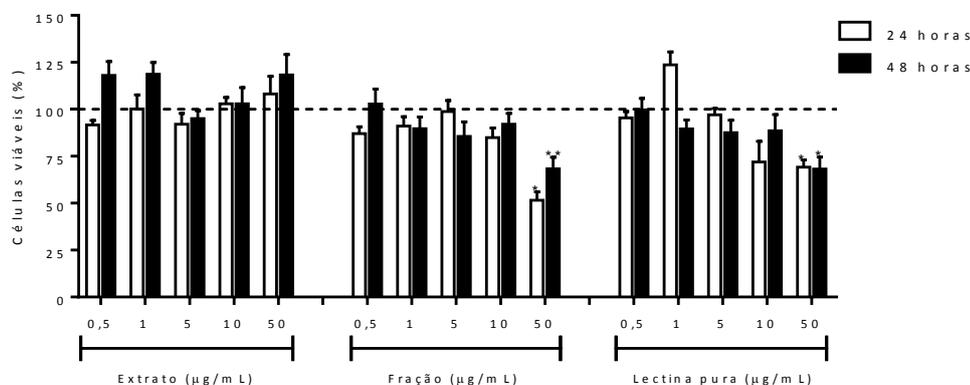
Com base nos dados representados e nos estudos descritos na literatura, é essencial que novas pesquisas possam ser realizadas com GaBL, frente a outros organismos patológicos, pois a mesma apresentou dados muito promissores, não só para a compreensão do papel fisiológico de lectina, mas para futuras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

5.9.2 Teste de Citotoxicidade e Viabilidade Celular

Nesse teste foi avaliado a viabilidade e citotoxicidade do Extrato bruto, F1-20% e GaBL, frente a fibroblastos 3T3, por MTT. O tratamento por 24 ou 48 horas com o extrato bruto da casca de *Genipa americana*, em todas as concentrações testadas, não alterou a viabilidade das células (Fig. 14).

No entanto, quando as células foram expostas a maior concentração da fração (50 µg/mL) houve uma redução na viabilidade de 48,4% ($p < 0,001$) e 31,7% ($p < 0,05$) nos tempos de 24 e 48h, respectivamente. Nas demais concentrações, a fração não ocasionou alterações na viabilidade celular.

Figura 15: Efeito da lectina pura, do extrato bruto da casca de *Genipa americana* e da fração sobre a viabilidade de fibroblastos 3T3 em 24 e 48 horas - As barras representam a média \pm EPM. A linha tracejada representa o grupo controle (tratado com meio de cultivo DMEM). ANOVA one-way seguido do pós-teste de Newman-Keuls, * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$ (Controle vs. tratamento).



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

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

Valores semelhantes foram observados em CasuL, quando a lectina foi usada no tratamento das células K562 e T47D em quantidades menores que 100ug/ml, não mostrando efeito citotóxico. Dessa forma se faz necessário destacar que o grau de citotoxicidade das lectinas é geralmente variável e seu potencial para uso efetivo como agente antitumoral é dependente de sua especificidade com as células de câncer em comparação com as células normais (PROCÓPIO et al., 2017).

Diante dos dados mostrados é notório o potencial de GaBL. Quando comparado com outras lectinas, GaBL se mostra como uma interessante molécula a ser estudada, contra novas linhagens celulares, principalmente em linhagens carcinogênicas. Portanto, novos trabalhos devem ser explorados na busca de obter respostas ainda não conhecidas, principalmente sobre os mecanismos de ação dessas moléculas frente a células tumorais.

6 CONCLUSÃO

- ✓ Nesse estudo foi possível purificar e caracterizar uma lectina (GaBL) a partir da casca de *Genipa americana*, utilizando procedimento constituído de duas etapas de purificação.
- ✓ A proteína purificada mostrou notável atividade específica ao final do processo de purificação e elevado rendimento.
- ✓ GaBL mostrou alta atividade entre pHs 5,0-11,0 e manteve sua atividade em uma faixa de temperatura entre 20°C-120°C.
- ✓ Dicroísmo circular de GaBL demonstrou a presença de elevado conteúdo de β -folha e estabilidade conformacional em ampla faixa de pH (4,0-11,0).
- ✓ GaBL mostrou potente atividade contra organismos patogênicos das espécies *Cryptococcus neoformans* e *Cândida albicans*.
- ✓ GaBL não se mostrou tóxica para linhagens celulares de fibroblastos 3T3. Com isso podemos destacar que GaBL é um biomaterial de elevado potencial antifúngico e antitumoral.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIFISA- Associação Brasileira das Empresas do Setor Fitoterápico, Suplemento Alimentar e de Promoção da Saúde. 2012. Disponível em: Acesso em: dezembro de 2017.

ABRÃO, R. As ervas e a saúde: A farmácia no cerrado. **Edição de autor**, 2010.

AGRA, Maria de Fátima et al. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista brasileira de farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 472-508, 2008.

AGRAWAL, B. B.; GOLDSTEIN, I. J. Specific binding of concanavalin A to cross-linked dextran gels. **Biochemical Journal**, v. 96, n. 3, p. 23contd, 1965.

AL ATALAH, Bassam; SMAGGHE, Guy; VAN DAMME, Els JM. Oryzata, a jacalin-related lectin from rice, could protect plants against biting-chewing and piercing-sucking insects. **Plant Science**, v. 221, p. 21-28, 2014.

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

ALENCAR, Veruska BM et al. Pro-inflammatory effect of *Arum maculatum* lectin and role of resident cells. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 37, n. 9, p. 1805-1814, 2005.

ALMEIDA, E. R. de. Plantas medicinais brasileiras: conhecimentos populares e científicos. **Sao Paulo: Hemus 341p.-illus.. ISBN 8528903095 Por Plant records. Geog**, v. 4, 1993.

ALMOG, Joseph et al. Genipin—a novel fingerprint reagent with colorimetric and fluorogenic activity. **Journal of Forensic Science**, v. 49, n. 2, p. 1-3, 2004.

ALVES, Edna Ursulino et al. Substratos para testes de emergência de plântulas e vigor de sementes de *Erythrina velutina* Willd., Fabaceae. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, n. 1, p. 69-82, 2008.

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

ALVIM, Neide Aparecida Titonelli et al. The use of medicinal plants as a therapeutical resource: from the influences of the professional formation to the ethical and legal implications of its applicability as an extension of nursing care practice. **Revista latino-americana de enfermagem**, v. 14, n. 3, p. 316-323, 2006.

ANDRADE, A. C. S. de et al. Germinação de sementes de jenipapo: temperatura, substrato e morfologia do desenvolvimento pós-seminal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 3, 2000.

ANDRADE, Samara Alvachian Cardoso et al. Desidratação osmótica do jenipapo (*Genipa americana* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 2, p. 276-281, 2003.

ANDRADE, Samara Alvachian Cardoso et al. Evaluation of water and sucrose diffusion coefficients during osmotic dehydration of jenipapo (*Genipa americana* L.). **Journal of food engineering**, v. 78, n. 2, p. 551-555, 2007.

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

ASSREUY, A. M. S. et al. Anti-inflammatory effect of glucose—mannose binding lectins isolated from Brazilian beans. **Mediators of inflammation**, v. 6, n. 3, p. 201-210, 1997.

ASSIS, Cinthya Saraiva de. **Avaliação dos efeitos tóxicos in vitro e in vivo do extrato hidroetanólico dos frutos de *Genipa americana* L.(Rubiaceae) em camundongos Swiss**. 2015. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

AUB, Joseph C.; TIESLAU, Carol; LANKESTER, Ann. Reactions of normal and tumor cell surfaces to enzymes, I. Wheat-germ lipase and associated mucopolysaccharides. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 50, n. 4, p. 613-619, 1963.

AUB, Joseph C.; SANFORD, Barbara H.; COTE, Marilyn N. Studies on reactivity of tumor and normal cells to a wheat germ agglutinin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 54, n. 2, p. 396-399, 1965.

BADKE, Marcio Rossato et al. Plantas medicinais: o saber sustentado na prática do cotidiano popular. **Escola Anna Nery Revista de Enfermagem**, v. 15, n. 1, p. 132-139, 2011.

BARBOSA, D. A. **Avaliação fitoquímica e farmacológica de Genipa americana L.(Rubiaceae)**. 2008. Tese de Doutorado. Master dissertation, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil.

BARBOSA, Theolis et al. In vivo lymphocyte activation and apoptosis by lectins of the Diocleinae subtribe. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 5, p. 673-678, 2001.

BARI, Alfa U. et al. Purification and partial characterization of a new mannose/glucose-specific lectin from *Dialium guineense* Willd seeds that exhibits toxic effect. **Journal of Molecular Recognition**, v. 26, n. 8, p. 351-356, 2013.

BARRE, Annick et al. Artocarpin is a polyspecific jacalin-related lectin with a monosaccharide preference for mannose. **Biochimie**, v. 86, n. 9-10, p. 685-691, 2004.

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

BASAR, Simla et al. Analgesic and antiinflammatory activity of *Morinda citrifolia* L.(Noni) fruit. **Phytotherapy research**, v. 24, n. 1, p. 38-42, 2010.

BATISTA, Eneury Martins Cezar et al. COMPOSIÇÃO DE ESPÉCIES E ÍNDICES ARBÓREOS NOS PÁTIOS DE TRÊS ESCOLAS DE GURUPI-TOCANTINS. **Revista de Estudos Ambientais**, v. 18, n. 2, p. 6-15, 2017.

BELL, D. J.; HOARE, M.; DUNNILL, P. The formation of protein precipitates and their centrifugal recovery. In: **Downstream processing**. Springer, Berlin, Heidelberg, 1983. p. 1-72.

BENJAMIN, C. F. et al. Inflammatory and anti-inflammatory effects of soybean agglutinin. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, p. 873-881, 1997.

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.

BETTEGA, Patrícia Vida Cassi et al. Fitoterapia: dos canteiros ao balcão da farmácia. **Archives of Oral Research**, v. 7, n. 1, 2017.

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

BOCHNER, Rosany et al. Problemas associados ao uso de plantas medicinais comercializadas no Mercado de Madureira, município do Rio de Janeiro, Brasil. 2012.

BOLZANI, Vanderlan Da S. et al. Secondary metabolites from Brazilian Rubiaceae plant species: Chemotaxonomical and biological significance. **Recent research developments in phytochemistry**, p. 19-31, 2001.

BORGES, Eric S.; REZENDE, Claudia M. Main aroma constituents of genipap (*Genipa americana* L.) and bacuri (*Platonia insignis* M.). **Journal of Essential Oil Research**, v. 12, n. 1, p. 71-74, 2000.

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.

BOYD, William C.; SHAPLEIGH, Elizabeth. Specific Precipitating Activity of Plant Agglutinins (Lectins). **Science (New York, NY)**, v. 119, n. 3091, p. 419-419, 1954.
BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. 72, 248-254. 1976.

BRAKHAGE, Axel A. Regulation of fungal secondary metabolism. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 21, 2013. BROWN, Amy C. Anticancer activity of Morinda citrifolia (Noni) fruit: a review. **Phytotherapy Research**, v. 26, n. 10, p. 1427-1440, 2012.

BRUSOTTI, Gloria et al. Isolation and characterization of bioactive compounds from plant resources: the role of analysis in the ethnopharmacological approach. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 87, p. 218-228, 2014.

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

CAMPANA, Patricia Targon; BARBOSA, Leandro Ramos Souza; ITRI, Rosangela. Conformational stability of peanut agglutinin using small angle X-ray scattering. **International journal of biological macromolecules**, v. 48, n. 3, p. 398-402, 2011.

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

CARVALHO, José Carlos Tavares. **Fitoterápicos: anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. Tecmedd, 2004.

CARVALHO, Melissa Mello de. Dificuldades na aquisição de medicamentos fitoterápicos para o componente básico da assistência farmacêutica no estado do Paraná. 2017.

CAVADA, Benildo S. et al. cDNA cloning and 1.75 Å crystal structure determination of PPL2, an endochitinase and N-acetylglucosamine-binding hemagglutinin from *Parkia platycephala* seeds. **The FEBS journal**, v. 273, n. 17, p. 3962-3974, 2006.

CHANDRASEKARAN, Gayathri et al. Antibacterial and antifungal activities of lectin extracted from fruiting bodies of the Korean cauliflower medicinal mushroom, *Sparassis latifolia* (Agaricomycetes). **International journal of medicinal mushrooms**, v. 18, n. 4, 2016.

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

CHIQUIERI, Abner; DI MAIO, Fernando Régis; PEIXOTO, Ariane Luna. A distribuição geográfica da família Rubiaceae Juss. na Flora Brasiliensis de Martius. **Rodriguésia**, p. 47-57, 2004.

CHU, K. T.; NG, T. B. Smilaxin, a novel protein with immunostimulatory, antiproliferative, and HIV-1-reverse transcriptase inhibitory activities from fresh *Smilax glabra* rhizomes. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 340, n. 1, p. 118-124, 2006.

COELHO, Luana CBB; DA SILVA, Maria BR. Simple method to purify milligram quantities of the galactose-specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*. **Phytochemical Analysis**, v. 11, n. 5, p. 295-300, 2000.

COELHO, L. CBB et al. Protein purification by affinity chromatography. Intech-Open Access Publisher, 2012.

CORRÊA, Manuel Pio. Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. In: **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Imprensa Nacional Brasília, 1984.

CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G. Lectins, carbohydrate recognition molecules: Are they toxic. **Recent trends in toxicology**, v. 37, p. 47-59, 2008.

COSTA, Romero MPB et al. A new mistletoe *Phthirusa pyrifolia* leaf lectin with antimicrobial properties. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 4, p. 526-533, 2010.

COSTA, Djerson Mateus Alves da. Impactos do estresse salino e da cobertura morta nas características químicas do solo e no desenvolvimento do amaranto. 2007.

COSTA, Max Adilson Lima et al. Estudo da precipitação com etanol de xilanases de complexos enzimáticos produzidos por *Aspergillus niger* em fermentação no estado sólido e fermentação submersa. 2016.

CORDEIRO, J. M. P.; FÉLIX, L. P. Conhecimento botânico medicinal sobre espécies vegetais nativas da caatinga e plantas espontâneas no agreste da Paraíba, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 3 suppl 1, p. 685-692, 2014.

CROWELL, Andrew MJ; WALL, Mark J.; DOUCETTE, Alan A. Maximizing recovery of water-soluble proteins through acetone precipitation. **Analytica chimica acta**, v. 796, p. 48-54, 2013.

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

DAMME, Els JM Van et al. Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 17, n. 6, p. 575-692, 1998.

DA SILVA, A. P. et al. Caracterização química e física do jenipapo (*Genipa americana* L.) armazenado. **Scientia Agricola**, v. 55, n. 1, p. 29-34, 1998.

DA SILVA, Luzimar C. et al. Micromorphological and anatomical alterations caused by simulated acid rain in restinga plants: *Eugenia uniflora* and *Clusia hilariana*. **Water, air, and soil pollution**, v. 168, n. 1-4, p. 129-143, 2005.

DA SILVA, Pollyanna Michelle et al. PgTeL, the lectin found in *Punica granatum* juice, is an antifungal agent against *Candida albicans* and *Candida krusei*. **International journal of biological macromolecules**, v. 108, p. 391-400, 2018.

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

DATTA, Pradip K.; FIGUEROA, Maria ODCR; LAJOLO, Franco M. Purification and characterization of two major lectins from *Araucaria brasiliensis* syn. *Araucaria angustifolia* seeds (pinhao). **Plant physiology**, v. 97, n. 3, p. 856-862, 1991.

DE ALBUQUERQUE, Ulysses Paulino; HANAZAKI, Natália. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Rev. Bras. Farmacogn**, v. 16, p. 678-689, 2006.

DE ALBUQUERQUE, Lidiane Pereira et al. Effect of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin on survival and digestive enzymes of *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae). **International biodeterioration & biodegradation**, v. 75, p. 158-166, 2012.

DE ALMEIDA VIEIRA, Fábio; GUSMÃO, Eduardo. Efeitos de giberelinas, fungicidas e do armazenamento na germinação de sementes de *Genipa americana* L.(Rubiaceae). **Cerne**, v. 12, n. 2, 2006.

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

DE MELO, Cristiane Moutinho Lagos et al. Healing activity induced by Cramoll 1, 4 lectin in healthy and immunocompromised mice. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 408, n. 1-2, p. 113-119, 2011.

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

DEHARO, Eric et al. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part V. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Tacana Indians. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, n. 1, p. 91-98, 2001.

DELPRETE, P. G.; SMITH, L. B.; KLEIN, R. M. Flora ilustrada Catarinense. 1 parte. As plantas. Rubiaceas. Volume 2. Generos de HT: 20 Gardenia ate 46. Tocoyena. 2005.

DE SOUSA, BRUNO LOPES. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DAS FORMAS SILVESTRE E RECOMBINANTE DE UMA LECTINA DE SEMENTES DE *Vatairea macrocarpa* Benth E ANÁLISE DAS SUAS BASES MOLECULARES DE LIGAÇÃO AO ANTÍGENO TN. 2014.

DJERASSI, CARL; GRAY, J. D.; KINCL, FRED A. Naturally Occurring Oxygen Heterocyclics. IX. 1 Isolation and Characterization of Genipin2. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 25, n. 12, p. 2174-2177, 1960.

DJERASSI, Carl et al. Terpenoids. XLVII. 1 The structure of genipin2. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 26, n. 4, p. 1192-1206, 1961.

DIAS, Renata de Oliveira et al. Insights into animal and plant lectins with antimicrobial activities. **Molecules**, v. 20, n. 1, p. 519-541, 2015.

DIAS, L. S.; DIAS, A. S. Metabolitos secundários como fontes de bioherbicidas: situação actual e perspectivas. 2007.

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

DONADIO, L. C.; NACHTIGAL, J. C.; SACRAMENTO, C. R. *Frutas exóticas*. Jaboticabal: FUNEP, 1998. 278p.

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

EDGAR, Rotem et al. Reversing bacterial resistance to antibiotics by phage-mediated delivery of dominant sensitive genes. **Applied and environmental microbiology**, v. 78, n. 3, p. 744-751, 2012.

E LACERDA, Rodrigo Rodrigues et al. Lectin from seeds of a Brazilian lima bean variety (*Phaseolus lunatus* L. var. cascavel) presents antioxidant, antitumour and gastroprotective activities. **International journal of biological macromolecules**, v. 95, p. 1072-1081, 2017.

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

ESTRELLA, Eduardo. **Plantas medicinales amazónicas: realidad y perspectivas**. TCA undp IDE FAO UNAMAZ DGIS, 1995.

EPSTEIN, L. Cultivo e aproveitamento do jenipapo. **Bahia Agrícola**, v. 4, n. 3, p. 23-24, 2001.

FARIAS, Daniel Lima de et al. Isolamento, purificação e atividades biológicas de uma nova lectina de sementes de feijão da praia (*Canavalia Maritima*). 2013.

FERRERES, Federico et al. Ellagic acid and derivatives from *cochlospermum angolensis* welw. extracts: HPLC–DAD–ESI/MSn profiling, quantification and in vitro anti-depressant, anti-cholinesterase and anti-oxidant activities. **Phytochemical Analysis**, v. 24, n. 6, p. 534-540, 2013.

FERREIRA DOS SANTOS, Allívia Rouse; SILVA-MANN, Renata; FERREIRA, Robério Anastácio. Restrição hídrica em sementes de jenipapo (*Genipa americana* L.). **Revista Árvore**, v. 35, n. 2, 2011.

FERMINO SOARES, A. C. et al. Fungos micorrízicos arbusculares no crescimento e nutrição de mudas de jenipapeiro. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 1, 2012.

FILHO, Pedro Germano. Estudos taxonômicos do gênero *Bathysa* C. Presl (Rubiaceae, Rondeletieae), no Brasil. **Rodriguésia**, p. 49-75, 1998.

FRANCIS, John K. *Genipa americana* L. Jagua, genipa. Rubiaceae. Madder family. **New Orleans, LA: USDA Forest Service, International Institute of Tropical Forestry; 5 p.(SO-ITF-SM; 58).**, 1993.

FREIRE, M. G. M. et al. Inflammatory responses induced in mice by lectin from *Talisia esculenta* seeds. **Toxicon**, v. 42, n. 3, p. 275-280, 2003.

FREITAS-JÚNIOR, Augusto CV et al. Giant Amazonian fish pirarucu (*Arapaima gigas*): Its viscera as a source of thermostable trypsin. **Food chemistry**, v. 133, n. 4, p. 1596-1602, 2012.

GARCÍA-LAFUENTE, Ana et al. In vitro anti-inflammatory activity of phenolic rich extracts from white and red common beans. **Food chemistry**, v. 161, p. 216-223, 2014.

GUARNACCIA, R. et al. Geniposidic acid, an iridoid glucoside from *Genipa americana*. **Tetrahedron Letters**, v. 13, n. 50, p. 5125-5127, 1972.

GOLDSTEIN, Irwin J. What should be called a lectin. **Nature**, v. 285, p. 66, 1980.

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

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

GONÇALVES, Cristina; DINIS, Teresa; BATISTA, Maria Teresa. Antioxidant properties of proanthocyanidins of *Uncaria tomentosa* bark decoction: a mechanism for anti-inflammatory activity. **Phytochemistry**, v. 66, n. 1, p. 89-98, 2005.

HAMACEK, F. R. et al. Valor nutricional, caracterização física e físico-química de jenipapo (*Genipa americana* L.) do cerrado de Minas Gerais. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 24, n. 1, p. 78, 2013.

HAMACEK, Fabiana Rossi et al. Valor nutricional, caracterização física e físico-química de jenipapo (*Genipa americana* L.) do cerrado de Minas Gerais. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 24, n. 1, p. 78, 2013.

IDA, Soto R. et al. BENEFICIAL EFFECTS OF MORINDA CITRIFOLIA LINN.(NONI) LEAF EXTRACT ON OBESITY, DYSLIPIDEMIA AND ADIPONECTINEMIA IN RATS WITH METABOLIC SYNDROME. **INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES AND RESEARCH**, v. 8, n. 6, p. 2496-2503, 2017.

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

ISERHARD, Ana Rosa Müller et al. Práticas culturais de cuidados de mulheres mães de recém-nascidos de risco do sul do Brasil. **Esc Anna Nery**, v. 13, n. 1, p. 116-22, 2009.

ITO, Shigeru et al. High molecular weight lectin isolated from the mucus of the giant African snail *Achatina fulica*. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 75, n. 1, p. 20-25, 2011.

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

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

KAUR, M., SINGH, K., RUP, P. J., SAXENA, A. K., KHAN, R. H., ASHRAF, M. T., KAMBOJ, S. S.; SINGH, J. Arch. **Biochem. Biophys.**, 445, 156. 2006

KENNEDY, J. F. et al. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 26, n. 3, p. 219-230, 1995.

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

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

KIRBAG, Sevda et al. Antimicrobial activities of some Euphorbia species. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 10, n. 5, p. 305-309, 2013.

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

KIM, Byung-Chul et al. Genipin-induced apoptosis in hepatoma cells is mediated by reactive oxygen species/c-Jun NH2-terminal kinase-dependent activation of mitochondrial pathway. **Biochemical pharmacology**, v. 70, n. 9, p. 1398-1407, 2005.

KOO, Hye-Jin et al. Antiinflammatory effects of genipin, an active principle of gardenia. **European journal of pharmacology**, v. 495, n. 2-3, p. 201-208, 2004.

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

LANDSTEINER, K. The specificity of serological reactions. Baillie`re, Tindall and Cox, **London**, p. 5. 1936.

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

LANNOO, Nausicaä; VAN DAMME, Els JM. Lectin domains at the frontiers of plant defense. **Frontiers in plant science**, v. 5, p. 397, 2014.

LEITE, Yáskara Fabíola Monteiro Marques et al. Purification of a lectin from the marine red alga *Gracilaria ornata* and its effect on the development of the cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1724, n. 1-2, p. 137-145, 2005.

LEMAIRE, Irma et al. Stimulation of interleukin-1 and-6 production in alveolar macrophages by the neotropical liana, *Uncaria tomentosa* (una de gato). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64, n. 2, p. 109-115, 1999.

LIENER, Irvin (Ed.). **The lectins: properties, functions, and applications in biology and medicine**. Elsevier, 2012.

LIMA, Kedma Magalhães Lima et al. *Candida albicans* e *Candida tropicalis* isoladas de onicomicose em paciente HIV-positivo: co-resistência in vitro aos azólicos. **Revista de Patologia Tropical**, v. 37, n. 1, p. 57-64, 2008.

LIMA, Cinthia Celene Benck de et al. A fitoterapia na saúde pública: estudo de caso da fabricante municipal de medicamentos-FABRIMED (Telêmaco Borba, 1993-2008). 2017.

LORENZI, Harri. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. **Nova Odessa: Editora Plantarum 352p.-col. illus.. Por Geog**, v. 4, 1992.

LORENZI, Harri; MATOS, Francisco J. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2002.

LUDINGTON, Jacob G.; WARD, Honorine D. The *Cryptosporidium parvum* C-type lectin CpClec mediates infection of intestinal epithelial cells via interactions with sulfated proteoglycans. **Infection and immunity**, v. 84, n. 5, p. 1593-1602, 2016.

LY, Bui Minh et al. Purification, characterization and biological effect of lectin from the marine sponge *Stylissa flexibilis* (Lévi, 1961). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 216, p. 32-38, 2018.

MABBERLEY, David John. **The plant-book: a portable dictionary of the vascular plants**. Cambridge university press, 1997.

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

MACEDO, Maria Lígia R.; OLIVEIRA, Caio FR; OLIVEIRA, Carolina T. Insecticidal activity of plant lectins and potential application in crop protection. **Molecules**, v. 20, n. 2, p. 2014-2033, 2015.

MACHELEIDT, Juliane et al. Regulation and role of fungal secondary metabolites. **Annual review of genetics**, v. 50, p. 371-392, 2016.

MARGALHO, Luciano Ferreira; ROCHA, Antonio Elielson Sousa da; SECCO, Ricardo de Souza. Rubiaceae Juss. da restinga da APA de Algodual/Maiandeuá, Maracanã, Pará, Brasil. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi Ciências Naturais**, v. 4, n. 3, p. 303-339, 2009.

MARIKOVSKY, Y. et al. Distribution of surface charge and concanavalin A-binding sites on normal and malignant transformed cells. **Experimental cell research**, v. 89, n. 2, p. 359-367, 1974.

MARQUES, Gabriela FO et al. Contribution of the carbohydrate-binding ability of Vatairea guianensis lectin to induce edematogenic activity. **Biochimie**, v. 140, p. 58-65, 2017.

MARTINS, Diegue Henrique Nascimento. Avaliação da sazonalidade de compostos fenólicos e atividade antioxidante de folhas de *Erythroxylum daphnites* Mart. 2015.

MATOS, F. J. A. *Plantas da medicina popular do nordeste*. Fortaleza: UFC.

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

MEAGHER, Jennifer L. et al. Crystal structure of banana lectin reveals a novel second sugar binding site. **Glycobiology**, v. 15, n. 10, p. 1033-1042, 2005.

MESSIAS, M. C. T. B. et al. Uso popular de plantas medicinais e perfil socioeconômico dos usuários: um estudo em área urbana em Ouro Preto, MG, Brasil. **Rev. Bras. Pl. Med**, v. 17, n. 1, p. 76-104, 2015.

QI, Xiang-Ming; YAO, Shan-Jing; GUAN, Yi-Xin. Novel Isoelectric Precipitation of Proteins in a Pressurized Carbon Dioxide-Water-Ethanol System. **Biotechnology progress**, v. 20, n. 4, p. 1176-1182, 2004.

MITCHELL, S. W. **Researches Upon the Venom of the Rattlesnake; W. an Investigation of the Anatomy and Physiology of the Organs Concerned**. 1860.

MORAES, Roque. Análise de conteúdo. **Revista Educação, Porto Alegre**, v. 22, n. 37, p. 7-32, 1999.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MOURA, Raniere M. et al. CvL, a lectin from the marine sponge *Cliona varians*: Isolation, characterization and its effects on pathogenic bacteria and *Leishmania* promastigotes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 145, n. 4, p. 517-523, 2006.

NAIK, Sanjay et al. Biochemical characterisation of lectin from Indian hyacinth plant bulbs with potential inhibitory action against human cancer cells. **International journal of biological macromolecules**, v. 105, p. 1349-1356, 2017.

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

NARAHARI, A., NAREDDY, P. K.; SWAMY, M. J. *Biochimie*, 93, 1676.2011.

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

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

NÁTHIA-NEVES, Grazielle et al. Extraction of bioactive compounds from genipap (*Genipa americana* L.) by pressurized ethanol: Iridoids, phenolic content and antioxidant activity. **Food Research International**, v. 102, p. 595-604, 2017.

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

NGOC, Duan Pham et al. Characterization of immunogenic *Clonorchis sinensis* protein fractions by gel filtration chromatography. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 5, n. 4, p. 284-288, 2015.

NICOLSON, Garth L.; BLAUSTEIN, John; ETZLER, Marilyn E. Characterization of two plant lectins from *Ricinus communis* and their quantitative interaction with a murine lymphoma. **Biochemistry**, v. 13, n. 1, p. 196-204, 1974.

NIO-KOBAYASHI, Junko et al. Expression profiles and possible roles of galectins in the corpus luteum. **Trends in Glycoscience and Glycotechnology**, v. 28, n. 162, p. E71-E77, 2016.

NOGUEIRA, Flávia Aparecida et al. Efficacy of aqueous extracts of *Genipa americana* L. (Rubiaceae) in inhibiting larval development and eclosion of gastrointestinal nematodes of sheep. **Journal of Applied Animal Research**, v. 42, n. 3, p. 356-360, 2014.

NOWELL, Peter C. Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. **Cancer research**, v. 20, n. 4, p. 462-466, 1960.

NUNES, Natalia NS et al. Potential of the lectin/inhibitor isolated from *Crataeva tapia* bark (CrataBL) for controlling *Callosobruchus maculatus* larva development. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 63, n. 48, p. 10431-10436, 2015.

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

OH, Hanjin et al. Refining hot-water extracted silk sericin by ethanol-induced precipitation. **International journal of biological macromolecules**, v. 48, n. 1, p. 32-37, 2011.

OHIZUMI, Yuki et al. Mannose-binding lectin from yam (*Dioscorea batatas*) tubers with insecticidal properties against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, n. 7, p. 2896-2902, 2009.

OLIVEIRA, Helena. Chromium as an environmental pollutant: insights on induced plant toxicity. **Journal of botany**, v. 2012, 2012.

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

OLSNES, Sjur. The history of ricin, abrin and related toxins. **Toxicon**, v. 44, n. 4, p. 361-370, 2004.

ONO, Masateru et al. Iridoid glucosides from the fruit of *Genipa americana*. **Chemical and pharmaceutical bulletin**, v. 53, n. 10, p. 1342-1344, 2005.

ONO, Masateru et al. Iridoid glucosides from the fruit of *Genipa americana*. **Chemical and pharmaceutical bulletin**, v. 53, n. 10, p. 1342-1344, 2005.

OTA, Eiji et al. Purification, cDNA cloning and recombinant protein expression of a phloem lectin-like anti-insect defense protein BPLP from the phloem exudate of the wax gourd, *Benincasa hispida*. **Phytochemistry**, v. 89, p. 15-25, 2013.

OZEKI, Yasuhiro. Purification and cell attachment activity of a D-galactose-binding lectin from the skin of sea hare, *Aplysia Kurodai*. **IUBMB Life**, v. 45, n. 5, p. 989-995, 1998.

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, Patrícia 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 M.G et al. Protease inhibitors from plants: Biotechnological insights with emphasis on their effects on microbial pathogens. **Microbial pathogens and strategies for combating them: Science, Technology and Education**, v. 1, p. 641-649, 2013.

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.

PARISI, Mónica G.; MORENO, Silvia; FERNÁNDEZ, Graciela. Isolation and characterization of a dual function protein from *Allium sativum* bulbs which exhibits proteolytic and hemagglutinating activities. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 46, n. 4, p. 403-413, 2008.

PENG, H., LV, H., WANG, Y., LIU, Y., LI, C., MENG, L., CHEN, F. AND BAO, J. K. Peptides, 30, 1805.2006.

PEREIRA, Maria do Socorro; BARBOSA, Maria Regina de V. A família Rubiaceae na Reserva Biológica Guaribas, Paraíba, Brasil: Subfamílias Antirheoideae, Cinchonoideae e Ixoroideae. **Acta Botanica Brasilica**, 2004.

PEREIRA, Zefa Valdivina; KINOSHITA, Luiza Sumiko. Rubiaceae Juss. of Parque Estadual das Várzeas do Rio Ivinhema, Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Hoehnea**, v. 40, n. 2, p. 205-251, 2013.

PEUMANS, Willy J.; VAN DAMME, E. J. Lectins as plant defense proteins. **Plant physiology**, v. 109, n. 2, p. 347, 1995.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Prevalence, biological activity and genetic manipulation of lectins in foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 7, n. 4, p. 132-138, 1996.

PFALLER, Michael A. et al. Candida bloodstream infections: comparison of species distributions and antifungal resistance patterns in community-onset and nosocomial isolates in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2008-2009. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, n. 2, p. 561-566, 2011.

PINO, Jorge; MARBOT, Rolando; VAZQUEZ, Carlos. Volatile constituents of genipap (Genipa americana L.) fruit from Cuba. **Flavour and fragrance journal**, v. 20, n. 6, p. 583-586, 2005.

PINTO, E. G. Caracterização da espuma de jenipapo (Genipa americana L.) com diferentes aditivos visando à secagem em leito de espuma. **Dissertação de mestrado em engenharia de alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia–Itapetinga, BA**, 2009.

PORTO, R. G. C. L. et al. Composição química, determinação de fenólicos totais e atividade antioxidante em polpa e semente de Jenipapo (Genipa americana L.). **Universidade Federal do Piauí**, p. 1-4, 2010.

POWELL, A. E.; LEON, M. A. Reversible interaction of human lymphocytes with the mitogen concanavalin A. **Experimental cell research**, v. 62, n. 2-3, p. 315-325, 1970.

PRANCE, G.T. **Árvores de Manaus**. 17.ed. Manaus: INPA, 1975. p.223-225.

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

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

QUEIROZ, Sue Ellen Ester et al. Mechanism and control of *Genipa americana* seed germination. **Physiologia plantarum**, v. 144, n. 3, p. 263-276, 2012.

RAGUSA-NETTO, José; FECCHIO, Alan. Plant food resources and the diet of a parrot community in a gallery forest of the southern Pantanal (Brazil). **Brazilian Journal of Biology**, v. 66, n. 4, p. 1021-1032, 2006.

RAMESHWARAM, Nagender Rao; NADIMPALLI, Siva Kumar. An efficient method for the purification and quantification of a galactose-specific lectin from vegetative tissues of *Dolichos lablab*. **Journal of Chromatography B**, v. 861, n. 2, p. 209-217, 2008.

RANGEL, Thaiz Batista Azevedo et al. Crystallization and characterization of an inflammatory lectin purified from the seeds of *Dioclea wilsonii*. **Molecules**, v. 16, n. 6, p. 5087-5103, 2011.

RATANAPO, Sunanta; NGAMJUNYAPORN, Wayakorn; CHULAVATNATOL, Montri. Interaction of a mulberry leaf lectin with a phytopathogenic bacterium, *P. syringae* pv *mori*. **Plant Science**, v. 160, n. 4, p. 739-744, 2001.

RENHE, Isis Rodrigues Toledo et al. Extração e estabilidade do corante azul de jenipapo (*Genipa americana* L.). 2008.

RENHE, Isis Rodrigues Toledo et al. Obtention of blue colorant from jenipapo fruit. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 6, p. 649-652, 2009.

RIGDEN, Daniel J. et al. A cofactor-dependent phosphoglycerate mutase homolog from *Bacillus stearothermophilus* is actually a broad specificity phosphatase. **Protein Science**, v. 10, n. 9, p. 1835-1846, 2001.

RODRIGUES, VALÉRIA EVANGELISTA GOMES; CARVALHO, DA de. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do Alto Rio Grande–Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 25, n. 1, p. 102-123, 2001.

RÜDIGER, H. Plant lectins—more than just tools for glycoscientists: occurrence, structure, and possible functions of plant lectins. **Cells Tissues Organs**, v. 161, n. 1-4, p. 130-152, 1998.

RUPACHANDRA, S.; SARADA, D. V. L. Induction of apoptotic effects of antiproliferative protein from the seeds of *Borreria hispida* on lung cancer (A549) and cervical cancer (HeLa) cell lines. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.

SÁ, Roberto Araújo et al. Induction of mortality on *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae) by *Myracrodruon urundeuva* heartwood lectin. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 62, n. 4, p. 460-464, 2008.

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

SANDRI, S. Jenipapo. Ficha da planta. **Globo Rural**, v.13, n.147, p. 60-63, 1998.

SALLA, F. et al. Análise ecofisiológica e molecular em sementes de *Genipa americana* L. 2015.

SALOMÃO, A. N.; PADILHA, L. S. Avaliação preliminar da germinabilidade e da micoflora associada às sementes de *Genipa americana* em diferentes estágios de maturação. **Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia,(Série Embrapa-Circular Técnica 50)**, 2006.

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

SANTOS, A. F. S. et al. Detection of water soluble lectin and antioxidant component from *Moringa oleifera* seeds. **Water Research**, v. 39, n. 6, p. 975-980, 2005.

SANTOS, Andrea F.S. et al. Isolation of a seed coagulant *Moringa oleifera* lectin. **Process biochemistry**, v. 44, n. 4, p. 504-508, 2009.

SANTOS, Ravelly Lucena et al. Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no Sistema Único de Saúde. **Rev bras plantas med**, v. 13, n. 4, p. 486-91, 2011.

SANTOS, Andréa F.S. et al. Lectins: Function, structure, biological properties and potential applications. **Current topics in peptide & protein research**, v. 15, p. 41-62, 2014.

SANTOS, Claudio Wilian Vitor dos. **Purificação e caracterização de tripsina a partir do seco-pilórico do Pacamã (*Lophosilurus alexandri*)**. 82 f. Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia. Maceió, 2016.

SCOPES, R. K. Protein purification. 2ª Edição. Springer-Verlag, New York, 1987.

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

SHARON, N. Lectins: past, present and future. **Biochem Soc Trans**. 436:1457-1460. 2008.

SHAO, Biao et al. A novel lectin from fresh rhizome of *Alisma orientale* (Sam.) Juzep. **Process biochemistry**, v. 46, n. 8, p. 1554-1559, 2011.

SHOBA, S. Prakash; ROSE, MR Basil. Characterization of naturally occurring agglutinin in the crab *Varuna litterata*. **International Journal of Fisheries and Aquatic Studies**, v. 4, n. 2, p. 115-118, 2016.

SILVA, S; TASSARA, H. Frutas Brasil frutas, 4th edn. **Empresa das Artes**, São Paulo. 2005.

SILVA, Mariana CC et al. Purification, primary structure and potential functions of a novel lectin from *Bauhinia forficata* seeds. **Process biochemistry**, v. 47, n. 7, p. 1049-1059, 2012.

SILVA, Mariana CC et al. *Bauhinia forficata* lectin (BfL) induces cell death and inhibits integrin-mediated adhesion on MCF7 human breast cancer cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1840, n. 7, p. 2262-2271, 2014.

SILVA, Pollyanna Michelle da. Caracterização estrutural e avaliação da atividade antimicrobiana da lectina da testa de *Punica granatum* L. 2015.

SINGHA, Biswajit; ADHYA, Mausumi; CHATTERJEE, Bishnu P. Multivalent II [β -d-Galp-(1 \rightarrow 4)- β -d-GlcpNAc] and T α [β -d-Galp-(1 \rightarrow 3)- α -d-GalpNAc] specific Moraceae family plant lectin from the seeds of *Ficus bengalensis* fruits. **Carbohydrate research**, v. 342, n. 8, p. 1034-1043, 2007.

SINGH, R. S.; JAIN, P.; KAUR, H. P. Characterization and antimicrobial activity of lectins from *Penicillium* sp. 2013.

SINGH, Ram; THAKUR, Shivani. Antimicrobial activity and carbohydrate specificity of new mycelial lectins from *Fusarium* sp. **Biologia**, v. 69, n. 10, p. 1295-1302, 2014.

SINGH, Ram Sarup; KAUR, Hemant Preet; SINGH, Jatinder. Purification and characterization of a mucin specific mycelial lectin from *Aspergillus gorakhpurensis*: application for mitogenic and antimicrobial activity. **PloS one**, v. 9, n. 10, p. e109265, 2014.

SINGH, Ram Sarup; WALIA, Amandeep Kaur; KANWAR, Jagat Rakesh. Protozoa lectins and their role in host–pathogen interactions. **Biotechnology advances**, v. 34, n. 5, p. 1018-1029, 2016.

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

SITOHY, Mahmoud; DOHEIM, Mahmoud; BADR, Haitham. Isolation and characterization of a lectin with antifungal activity from Egyptian *Pisum sativum* seeds. **Food chemistry**, v. 104, n. 3, p. 971-979, 2007.

SOARES, Paulo AG et al. Purification of bromelain from pineapple wastes by ethanol precipitation. **Separation and purification technology**, v. 98, p. 389-395, 2012.

SOUSA-FILHO, Luis M. et al. Biochemical profile, biological activities, and toxic effects of proteins in the *Rhinella schneideri* parotoid gland secretion. **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology**, v. 325, n. 8, p. 511-523, 2016.

SOUZA, Jayra D. et al. A new Bauhinia monandra galactose-specific lectin purified in milligram quantities from secondary roots with antifungal and termiticidal activities. **International biodeterioration & biodegradation**, v. 65, n. 5, p. 696-702, 2011.

SPITELLER, Peter. Chemical ecology of fungi. **Natural product reports**, v. 32, n. 7, p. 971-993, 2015.

STIRP, F., BOLOGNESI, A., BORTOLOTTI, M., FARINI, V., LUBELLI, C., PELOSI, E., POLITO, L., DOZZA, B., STROCCHI, P., CHAMBERY, A., PARENTE, A.; BARBIERI, L. *Toxicon*, 50, 94. 2007.

STRYER, Lubert et al. **Bioquímica**. 2003.

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

SUMNER, James B.; HOWELL, Stacey F. Identification of hemagglutinin of jack bean with concanavalin A. **Journal of Bacteriology**, v. 32, n. 2, p. 227, 1936.

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

SWAMY, J. et al. Fluorescence and circular dichroism studies on the accessibility of tryptophan residues and unfolding of a jacalin-related $\hat{I}\pm$ -d-galactose-specific lectin from mulberry (*Morus indica*). **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, 2017.

SYROVÝ, I.; HODNÝ, Z. Staining and quantification of proteins separated by polyacrylamide gel electrophoresis. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 569, n. 1-2, p. 175-196, 1991.

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

TALLENT, W. H. Two new antibiotic cyclopentanoid monoterpenes of plant origin. **Tetrahedron**, v. 20, n. 7, p. 1781-1787, 1964.

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

TOMAZZONI, Marisa Ines; BONATO NEGRELLE, Raquel Rejane; CENTA, Maria de Lourdes. Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica. **Texto & Contexto Enfermagem**, v. 15, n. 1, 2006.

VALERI, Sérgio Valiengo; PUERTA, Rogério; DA CRUZ, Mara Cristina Pessôa. Efeitos do fósforo do solo no desenvolvimento inicial de *Genipa americana* L. **Scientia Forestalis/Forest Sciences**, p. 69-77, 2003.

VAN DAMME, Els JM et al. The bark of *Robinia pseudoacacia* contains a complex mixture of lectins (characterization of the proteins and the cDNA clones). **Plant physiology**, v. 107, n. 3, p. 833-843, 1995.

VARROT, Annabelle; BASHEER, Soorej M.; IMBERTY, Anne. Fungal lectins: structure, function and potential applications. **Current opinion in structural biology**, v. 23, n. 5, p. 678-685, 2013.

VASCONCELOS, Ilka M.; OLIVEIRA, José Tadeu A. Antinutritional properties of plant lectins. **Toxicon**, v. 44, n. 4, p. 385-403, 2004.

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

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

VIRGENS, I. O. et al. Revisão: *Jatropha curcas* L.: aspectos morfofisiológicos e químicos Review: *Jatropha curcas* L.: morphophysiological and chemical aspects. **Braz.J. Food Technol**, v. 20, p. e2016030, 2017.

UEDA, Shinichi; IWAHASHI, Yasuhiro; TOKUDA, Harukuni. Production of anti-tumor-promoting iridoid glucosides in *Genipa americana* and its cell cultures. **Journal of natural products**, v. 54, n. 6, p. 1677-1680, 1991. WANG, H.; NG, T. B. **Plant Physiol. Biochem.**, 44, 181. 2006

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

WATKINS, Winifred M.; MORGAN, W. T. J. Neutralization of the anti-H agglutinin in eel serum by simple sugars. **Nature**, v. 169, n. 4307, p. 825, 1952.

WINK, Michael. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. **Phytochemistry**, v. 64, n. 1, p. 3-19, 2003.

WONG, Jack H.; WONG, Clarence CT; NG, T. B. Purification and characterization of a galactose-specific lectin with mitogenic activity from pinto beans. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1760, n. 5, p. 808-813, 2006.

WU, Jinhong et al. Lunatin, a novel lectin with antifungal and antiproliferative bioactivities from *Phaseolus lunatus* billb. **International journal of biological macromolecules**, v. 89, p. 717-724, 2016.

WU, Mingjiang et al. A novel thyroglobulin-binding lectin from the brown alga *Hizikia fusiformis* and its antioxidant activities. **Food chemistry**, v. 201, p. 7-13, 2016.

XIU, Yunji et al. Isolation and characterization of two novel C-type lectins from the oriental river prawn, *Macrobrachium nipponense*. **Fish & shellfish immunology**, v. 46, n. 2, p. 603-611, 2015.

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

ZHAO, Mingzhi; WU, Feilin; XU, Ping. Development of a rapid high-efficiency scalable process for acetylated *Sus scrofa* cationic trypsin production from *Escherichia coli* inclusion bodies. **Protein expression and purification**, v. 116, p. 120-126, 2015.