

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E AMBIENTAIS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ÉVELYN SILVA DE AGUIAR

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO – QUÍMICA DE UMA LECTINA
LIGANTE À MANOSE DAS SEMENTES DE *Parkia pendula* (WILLD.) BENTH. ex
WALP.**

CHAPADINHA – MA

2021

ÉVELYN SILVA DE AGUIAR

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO – QUÍMICA DE UMA LECTINA
LIGANTE À MANOSE DAS SEMENTES DE *Parkia pendula* (WILLD.) BENTH. ex
WALP.**

Monografia apresentada à coordenação do curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial à obtenção do título de Licenciada em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Wellington Ferreira do Nascimento

Coorientador: Prof. Dr. Claudener Souza Teixeira

CHAPADINHA – MA

2021

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Aguiar, Évelyn Silva de.

Purificação e caracterização físico - química de uma lectina ligante à manose das sementes de *Parkia pendula* Willd. Benth. ex Walp / Évelyn Silva de Aguiar. - 2021.
45 f.

Coorientador(a): Claudener Souza Teixeira.

Orientador(a): Wellington Ferreira do Nascimento.

Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Maranhão, Chapadinha, 2021.

1. Aglutininas. 2. Glicocódigo. 3. Mimosoideae. 4. *Parkia*. I. Nascimento, Wellington Ferreira do. II. Teixeira, Claudener Souza. III. Título.

ÉVELYN SILVA DE AGUIAR

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO – QUÍMICA DE UMA LECTINA
LIGANTE À MANOSE DAS SEMENTES DE *Parkia pendula* (WILLD.) BENTH. ex
WALP.**

Monografia apresentada à coordenação do curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial à obtenção do título de Licenciada em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Wellington Ferreira do Nascimento

Coorientador: Prof. Dr. Claudener Souza Teixeira

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Wellington Ferreira do Nascimento (Orientador)
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Claudener Souza Teixeira (Coorientador)
Universidade Federal do Cariri

MSc. Ana Lúcia Estevam dos Santos (Examinadora)
Universidade Federal do Cariri

MSc. Valdenice Ferreira dos Santos (Examinadora)
Universidade Federal do Maranhão

AGRADECIMENTOS

Na realização deste trabalho, assim como em toda minha vida acadêmica, eu contei com muitas pessoas que gentilmente cederam um pouco de seu tempo e de seus conhecimentos para me ajudar. Dessa forma, gostaria de expressar os meus mais sinceros agradecimentos:

Primeiramente, a Deus, pelo dom da minha vida, por todo seu amor e providência.

À Maria Santíssima, por sua intercessão.

Aos meus pais, Valdivan Rêgo de Aguiar e Elizangela Souza da Silva Aguiar, e aos meus irmãos, Wesley Silva de Aguiar e Lara Beatriz Silva de Aguiar, por todo amor, carinho e pelo apoio incondicional.

Aos meus familiares, que direta ou indiretamente contribuíram, dentre eles, cito minha avó Naíde Silva, que vez ou outra perguntava: “O que é mesmo que tu faz com essas sementinhas?”.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Claudener Souza Teixeira, pela oportunidade de iniciação científica no Laboratório de Biologia Estrutural e Molecular (LaBEM), por sua paciência e ensinamentos que certamente levarei para a vida toda.

Ao Prof. Dr. Wellington Ferreira do Nascimento, minha gratidão por sua gentileza em ter aceitado ficar como meu orientador.

Aos amigos companheiros de laboratório: Ana Larissa Silva, Ana Lúcia Estevam, Maria Helena Cruz, Renato Roma, Romério Rodrigues, Sheylla Lira e Valdenice Santos.

À Ana Lúcia Estevam e à Valdenice Santos também agradeço por terem aceitado fazer parte da banca avaliadora, por todas as contribuições e sugestões de melhoria do trabalho.

Ao Sr. Walter dos Santos, por ter coletado as sementes.

Personificando, agradeço também aos coelhos Mateus e Pablo, pelos eritrócitos doados.

Ao Prof. Dr. Rômulo Farias Carneiro, da Universidade Federal do Ceará, pela colaboração.

À Prof. Dra. Michelle de Oliveira Maia Parente e aos demais integrantes do Laboratório de Produtos de Origem Animal, especialmente ao Ygor Portela.

Aos meus professores, que durante esses anos de curso contribuíram não apenas para minha formação profissional, mas também pessoal.

Aos funcionários do CCAA/UFMA, sempre muito solícitos.

À psicóloga Léa Furtado, pelos diálogos que tivemos no início do curso, em que pude construir e desconstruir muitas ideias.

A todos os amigos da turma de 2017.1 e aos outros que conheci, com os quais compartilhei tantos momentos, dos mais divertidos aos mais tensos, dentre eles: Fabrícia Lima, Pedro Victor Cardoso, John Lucas Vieira, Lucas Oliveira, Marciara Lopes e Justiane Viana.

Ao Maciel Garreto, por sua amizade, paciência e disponibilidade para ajudar sempre.

Aos meus amigos/irmãos do grupo de oração Renovados em Cristo, pelas orações e vivência fraterna.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e à Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão, pelo apoio financeiro.

*“O Senhor fez a terra produzir os medicamentos,
o homem sensato não os despreza”.*

Eclesiástico 38,4

RESUMO

As lectinas são um grupo de proteínas que apresentam como principal característica a capacidade de estabelecerem ligação específica e reversível a carboidratos, podendo aglutinar eritrócitos. Essa propriedade faz delas uma importante ferramenta biotecnológica, pois são capazes de decifrar o glicocódigo presente nas superfícies celulares. As proteínas com especificidade para carboidratos são encontradas de forma ubíqua na natureza, mas com teor variável entre os organismos. As sementes de leguminosas, família Fabaceae, apresentam abundância dessas proteínas e atualmente são as mais bem estudadas. Das três subfamílias de Fabaceae, Papilionoideae é a que possui um maior número de lectinas isoladas e as mais bem caracterizadas, quando comparadas com espécies das subfamílias Caesalpinoideae e Mimosoideae. Nesta última, encontra-se o gênero *Parkia*, cujas lectinas já isoladas de algumas espécies apresentam importantes papéis biológicos. Neste trabalho, o objetivo foi purificar e caracterizar em relação a alguns aspectos físico-químicos uma lectina a partir das sementes de *Parkia pendula*. O extrato bruto obtido a partir da homogeneização da farinha das sementes em tampão Tris – HCl 25 mM pH 7,6 com NaCl 150 mM foi aplicado em coluna de cromatografia de afinidade com matriz agarose-manose. A atividade hemaglutinante foi testada em eritrócitos de coelho sem tratamento e tratados com enzimas proteolíticas. O ensaio de inibição dessa atividade foi realizado com carboidratos e glicoproteínas. Para determinar a influência do pH e da temperatura sobre a atividade, o ensaio de hemaglutinação foi realizado em tampões com diferentes valores de pH e após aquecimento gradual da amostra. A lectina foi purificada por etapa única de cromatografia de afinidade em coluna agarose-manose. Por análise de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio, a proteína apresentou uma banda única com massa molecular aparente de 45 KDa, semelhante a outras lectinas do mesmo gênero. O teste de hemaglutinação obteve um melhor resultado em eritrócitos tratados com a enzima tripsina, esse efeito foi inibido por manose, glicose e seus derivados, especialmente por α -metil-D-manopiranosídeo. Os testes de hemaglutinação sob variação das condições de pH e temperatura demonstraram que a lectina é estável em uma faixa levemente ácida à neutra, entre 5 e 7, e tem sua atividade hemaglutinante inalterada até aos 50 °C. Os resultados alcançados neste trabalho agregam informações físico-químicas à lectina de *P. pendula* e ainda ampliam os estudos relacionados a lectinas da subfamília Mimosoideae.

Palavras-chave: Aglutininas. Glicocódigo. Mimosoideae. *Parkia*.

ABSTRACT

Lectins are a group of proteins that have as their main characteristic the ability to establish specific and reversible binding to carbohydrates, and can agglutinate erythrocytes. This property makes them an important biotechnological tool, because they are able to decipher the glycode present on cell surfaces. Carbohydrate-specific proteins are ubiquitously found in nature, but their content varies among organisms. The seeds of legumes, family Fabaceae, have an abundance of these proteins and are currently the best studied. Of the three subfamilies of Fabaceae, Papilionoideae is the one with the largest number of isolated lectins and the best characterized, when compared to species of the subfamilies Caesalpinoideae and Mimosoideae. In the latter, we find the *Parkia* genus, whose lectins already isolated from some species have important biological roles. In this work, the objective was to purify and characterize in relation to some physicochemical aspects a lectin from *Parkia pendula* seeds. The crude extract obtained from the homogenization of the seed flour in 25 mM Tris - HCl buffer pH 7.6 with 0.15 M NaCl was applied to an affinity chromatography column with an agarose-mannose matrix. The hemagglutinating activity was tested on untreated and proteolytic enzyme-treated rabbit erythrocytes. The inhibition assay of this activity was performed with carbohydrates and glycoproteins. To determine the influence of pH and temperature on the activity, the hemagglutination assay was performed in buffers with different pH values and after gradual heating of the sample. Lectin was purified by single-step agarose-mannose column affinity chromatography. By polyacrylamide gel electrophoresis analysis in the presence of sodium dodecyl sulfate, the protein showed a single band with apparent molecular mass of 45 KDa, similar to other lectins of the same genus. The hemagglutination test obtained a better result in erythrocytes treated with the enzyme trypsin, this effect was inhibited by mannose, glucose and their derivatives, especially by α -methyl-D-mannopyranoside. Hemagglutination tests under varying pH and temperature conditions demonstrated that the lectin is stable in a slightly acidic to neutral range, between 5 and 7, and has its hemagglutinating activity unchanged up to 50 °C. The results achieved in this work add physicochemical information to the lectin of *P. pendula* and also extend the studies related to lectins of the Mimosoideae subfamily.

Keywords: Agglutinins. Glycode. Mimosoideae. *Parkia*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação da interação lectina-carboidrato	18
Figura 2 - Classificação das lectinas vegetais segundo o domínio de reconhecimento a carboidrato.....	19
Figura 3 – A: Ilustração da interação entre lectina e carboidrato da membrana do eritrócito. B: Reversibilidade da interação.....	20
Figura 4 - Sementes de <i>P. pendula</i>	24
Figura 5 - Perfil cromatográfico da purificação da lectina de <i>P. pendula</i> em matriz agarose-manose.....	31
Figura 6 - Perfil eletroforético em SDS - PAGE	32
Figura 7 - Influência do pH sobre a AH da PpeL	35
Figura 8 - Influência da variação de temperatura sobre a AH da PpeL	35
Quadro 1 - Espécies do gênero <i>Parkia</i> com lectinas isoladas.....	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Processo de purificação da PpeL.....	33
Tabela 2 – Efeito inibitório de carboidratos e glicoproteínas sob a atividade hemaglutinante da PpeL	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AH	Atividade Hemaglutinante
AHE	Atividade Hemaglutinante Específica
CIM	Concentração Inibitória Mínima
ConA	Concanavalina A
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
DRC	Domínio de Reconhecimento a Carboidrato
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i> (Ácido etilenodiamino tetra-acético)
g	Força gravitacional
kDa	Kilodalton
M	Molar
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
Mr	Massa relativa
m/v	Massa/volume
NaCl	Cloreto de sódio
nm	Nanômetro
PAGE	<i>Polyacrilamide Gel Electrophoresis</i> (Eletroforese em Gel de Poliacrilamida)
pH	Potencial Hidrogeniônico
PpeL	Lectina de <i>Parkia pendula</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> (Dodecil Sulfato de Sódio)
TEMED	N, N, N', N' - Tetrametiletlenodiamina
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
UH	Unidades de Hemaglutinação
µL	Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	Aspectos históricos	15
2.2	Características e classificação das lectinas vegetais	16
2.3	Isolamento de lectinas	19
2.4	Lectinas de leguminosas	21
2.5	Lectinas do gênero <i>Parkia</i>	23
2.5.1	<i>Parkia pendula</i>	24
3	OBJETIVOS	26
3.1	Geral	26
3.2	Específicos	26
4	MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1	Procedência do material	27
4.2	Extração de proteínas	27
4.3	Cromatografia de afinidade	27
4.4	Eletroforese em SDS-PAGE	27
4.5	Quantificação de proteínas	28
4.6	Ensaio de atividade hemaglutinante	28
4.7	Inibição da atividade hemaglutinante	29
4.8	Efeito da temperatura sobre a atividade hemaglutinante da PpeL	29
4.9	Efeito do pH sobre a atividade hemaglutinante da PpeL	30
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1	Purificação da lectina das sementes de <i>P. pendula</i>	31
5.2	Ensaio de hemaglutinação e inibição por carboidratos	33
5.3	Influência da variação de pH e temperatura sobre a AH da PpeL	34
6	CONCLUSÃO	37
	REFERÊNCIAS	38

1 INTRODUÇÃO

Desde o início das primeiras civilizações, a natureza tem sido explorada para os mais diversos fins, entre eles está a busca por recursos terapêuticos para tratamento e cura de enfermidades. O reino vegetal é uma próspera fonte desses recursos, seja para uso na medicina popular, onde eles foram pioneiramente utilizados através de práticas advindas do senso comum, ou para o desenvolvimento de fármacos na medicina moderna. Os avanços em estudos relacionados à fitoquímica permitiram o isolamento de vários compostos bioativos presentes em plantas, resultados tanto do metabolismo primário quanto secundário (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

Nesse cenário, ganha destaque um grupo heterogêneo de proteínas chamadas lectinas que, por definição, são cadeias polipeptídicas de origem não imune com a habilidade de reconhecer e se ligar especificamente a carboidratos e a glicoconjugados presentes em superfícies celulares. Essa característica torna viável diversas funções biológicas, que vêm continuamente sendo estudadas e testadas em ensaios com modelos *in vivo* e *in vitro* (PEUMANS; VAN DAMME, 1995).

Com ampla distribuição na natureza, lectinas já foram isoladas de fungos (FRANCIS et al., 2011), algas marinhas (BARRE et al., 2019), substâncias excretadas por animais (NUNES et al., 2011) e de várias partes de plantas, de onde elas são mais frequentemente isoladas, principalmente de sementes (SANTOS, A. et al., 2019), que apresentam mais abundância dessas proteínas. A propriedade de reconhecer e estabelecer ligações com carboidratos e glicoconjugados de forma reversível permite o isolamento dessas proteínas a partir da utilização da tradicional técnica de cromatografia de afinidade, que, de forma muito conveniente, explora essa propriedade ao ser realizada com matriz glicídica na qual a lectina pode interagir e depois ser liberada por aplicação de uma solução eluente (ROMERO et al., 2017).

Dentro do reino Plantae, a família Fabaceae – pertencente ao grupo das angiospermas – tem distinta notabilidade em lectinologia pelos vários trabalhos já publicados com lectinas isoladas de suas espécies. Esses estudos atribuem às lectinas propriedades anti-helmíntica (BATISTA et al., 2018), anti e nociceptiva (CAVADA et al., 2018; SANTOS, A., et al., 2019; PIRES et al., 2019), vasorrelaxante (ALVES et al., 2015) pro e anti-inflamatória (ROCHA et al., 2011; SANTOS, A. et al., 2020), contra linhagens de células cancerígenas (GAUTAM et al., 2020; GONDIM et al., 2017), antibacteriana (COELHO et al., 2018), antifúngica (DIAS et al., 2020) e ainda como agente modulador da atividade de antibióticos convencionais contra bactérias multirresistentes (SANTOS, V. et al., 2019, 2020; SILVA, R. et al.; 2019).

A maioria das lectinas isoladas da família Fabaceae pertence à subfamília Papilionioideae, sendo Caesalpinioideae e Mimosoideae menos estudadas (CAVADA et al., 2020b). Nesta última, encontra-se a espécie *Parkia pendula*, conhecida popularmente, dentre outros, por visgueiro e fava de bolota. A lectina de *P. pendula* já foi isolada por Coriolano et al. (2010) e assim como outras lectinas do gênero *Parkia*, possui afinidade por manose (CORIOLANO et al., 2014).

Embora tenha algumas aplicabilidades biológicas já testadas, ainda não havia importantes informações que caracterizam essa proteína em relação a alguns aspectos físico-químicos. Sabe-se que as atividades biológicas de proteínas são dependentes de vários fatores do meio, como pH e temperatura, e que eles podem causar mudanças na estrutura nativa da proteína e levar à perda de atividade. Os ensaios com variação de temperatura e pH apresentados neste trabalho tornam conhecidas até que condições a lectina de *P. pendula* mantém sua atividade hemaglutinante e complementam a caracterização parcial já realizada. Ademais, o teste de inibição por carboidratos torna conhecidas as concentrações inibitórias mínimas da hemaglutinação provocada pela lectina, o que é essencial para o estabelecimento de futuros testes de atividades biológicas ou para quando se queira comprovar que a atividade realmente está relacionada com o sítio de reconhecimento a carboidrato.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos históricos

O termo lectina, do latim *legere*, significa “selecionar” e é atualmente utilizado para nomear um grupo de proteínas que possui ao menos um domínio não catalítico que se liga específica e reversivelmente a mono ou oligossacarídeos (PEUMANS; VAN DAMME, 1995). Entretanto, esses não foram o primeiro nome e definição atribuídos a essas macromoléculas.

No final do século XIX, começaram a surgir evidências de que havia na natureza proteínas com a capacidade de aglutinar eritrócitos. Em 1860, já havia relatos da observação feita por Silas Weir Mitchell da propriedade hemaglutinante do extrato de veneno de *Crotalus durissus*. Credita-se a Peter Herman Stillmark, em sua tese de doutorado apresentada em 1888, a descrição pioneira de uma hemaglutinina altamente tóxica, denominada ricina, isolada das sementes de mamona (*Ricinus communis*). Em 1898, Elfstrand introduziu o termo “hemaglutinina” para designar essas proteínas, também chamadas “fitoaglutininas” por terem sido encontradas primeiramente em plantas (VAN DAMME; LANNOO; PEUMANS, 2008).

Logo depois, H. Hellin demonstrou a presença de uma hemaglutinina também tóxica, a abrina, em extratos de feijão jequiriti (*Abrus precatorius*). Até então, em decorrência da observação pioneira feita em 1888 por Stillmark, relacionando a toxicidade em extrato de sementes de mamona à presença de hemaglutininas, era sustentada a ideia de que todas as hemaglutininas eram tóxicas. Em 1907, Landsteiner e Raubitschek provaram o contrário ao detectar a presença das primeiras, de muitas outras, hemaglutininas não tóxicas nas espécies de leguminosas: *Phaseolus vulgaris*, *Pisum sativum*, *Lens culinaris* e *Vicia sativa* (VAN DAMME et al., 1998).

Com a disponibilização comercial das toxinas abrina e ricina, Paul Ehrlich, ganhador do Nobel de medicina em 1908, empregou-as como modelos de antígenos para estudos em imunologia, o que o levou a propor vários dos princípios fundamentais dessa área, como a especificidade da resposta dos anticorpos e a memória imunológica (SHARON; LIS, 2004).

Em 1919, James Sumner, ganhador do Prêmio Nobel em 1946 por cristalizar a enzima urease, isolou da espécie vegetal *Canavalia ensiformes* uma proteína hemaglutinante denominada por ele Concanavalina A (ConA), que atualmente é a mais bem caracterizada. Quase duas décadas depois, em 1936, Sumner e Howell (1936), observaram que ConA, além de aglutinar eritrócitos, também precipitava glicoconjugados. Mais tarde foi evidenciado por esses mesmos pesquisadores que essas proteínas tinham especificidade por carboidratos ao se observar que a sacarose inibia a atividade hemaglutinante de ConA (SHARON; LIS, 2004).

Somente em 1954, depois das descobertas independentes de Renkonen (1948) e Boyd e Reguera (1949) de que algumas hemaglutininas selecionavam grupos sanguíneos específicos, o termo lectina foi introduzido por Boyd e Shapleigh. No entanto, o fato dessas proteínas também aglutinarem outras células fez com que elas fossem chamadas aglutininas, termo que, juntamente com hemaglutininas, é utilizado como sinônimo do mais comum, lectinas (SHARON; LIS, 2004; VAN DAMME et al., 1998).

Duas grandes descobertas, na década de 1960, atribuíram importantes funções às lectinas. A primeira, por Peter C. Nowell, tornou conhecida a capacidade da hemaglutinina de *Phaseolus vulgaris* estimular mitoses em linfócitos, o que foi de grande impacto para a imunologia porque até o momento pensava-se que essas células eram incapazes de se dividir. A segunda, por Joseph C. Aub, evidenciou a capacidade da lectina de gérmen de trigo de aglutinar células cancerígenas; subsequentemente outras lectinas apresentaram a mesma propriedade, e estudos recentes têm corroborado com essas descobertas pioneiras (BUTHIA et al., 2019; SHARON; LIS, 2004; ZENG et al., 2018).

Em 1972, com a análise estrutural da ConA, foi possível identificar a interação e definir o sítio de ligação a carboidratos. Os sítios de ligação são representados por depressões na superfície de segmentos limitados da cadeia polipeptídica e são denominados Domínio de Reconhecimento a Carboidrato (DRC). O reconhecimento e a ligação com carboidratos são resultado da interação de resíduos de aminoácidos desses sítios com hidroxilas presentes nos açúcares (VAN DAMME et al., 2008).

2.2 Características e classificação das lectinas vegetais

Assim como o DNA, sendo o nosso banco de dados genéticos, guarda e transmite informações para a produção de proteínas, o que envolve um processo de tradução da “linguagem” de nucleotídeos para aminoácidos, ou seja, uma transmissão de informações através de códigos, também os carboidratos presentes na membrana plasmática constituem um código. Esse glicocódigo, como é chamado, pode ser facilmente acessado pelas lectinas, que representam um grupo de biomoléculas que detém, quase exclusivamente, a capacidade de reconhecer e se ligar a glicoconjugados presentes na superfície celular de microrganismos (GABIUS et al., 2011).

Essa propriedade especial atribuída a essas proteínas tem despertado o interesse de pesquisadores há anos, impulsionando estudos que evidenciam importantes funções desempenhadas por elas, como para detecção de mudanças que ocorrem em superfícies

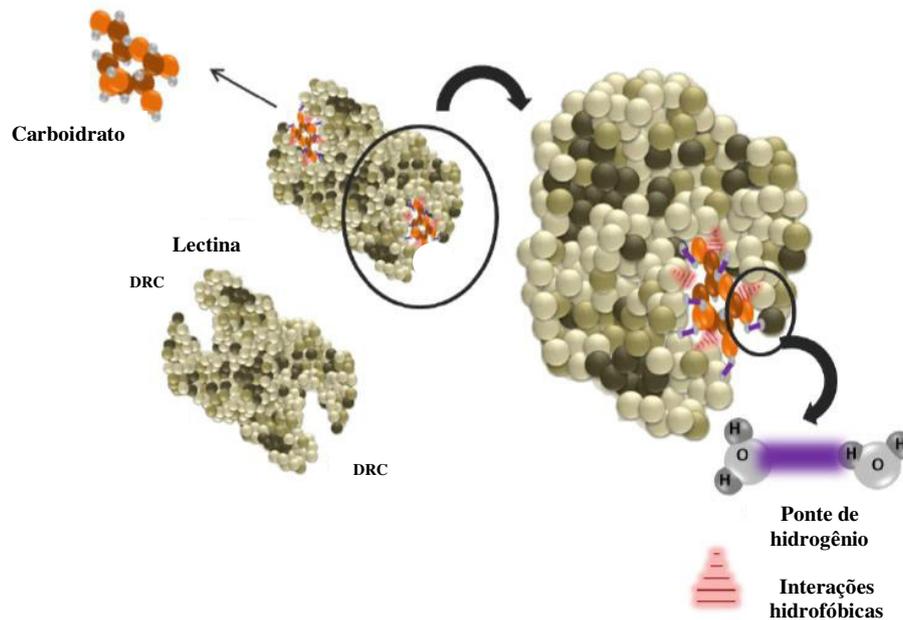
celulares durante processos fisiológicos e patológicos (PEUMANS; VAN DAMME, 1995; SHARON; LIS, 2004).

As lectinas ocorrem de forma ubíqua na natureza, desde microrganismos até seres complexos (LAKHTIN; LAKHTIN; ALYOSHKIN, 2011). Contudo, o reino Plantae lidera em número de espécies com lectinas isoladas, podendo ser encontradas em raízes (SOUZA et al., 2011), cascas (COSTA et al., 2018), tubérculos (FENG et al., 2018), folhas (CAMPOS et al., 2016), e em sementes (SANTOS, A. et al., 2019), de onde são mais frequentemente isoladas.

A presença dessas macromoléculas em órgãos de estocagem sugere que elas são um meio pelo qual as plantas acumulam parte de sua reserva de nitrogênio. Essa é uma explicação que busca justificar o propósito da síntese dessas proteínas pelas plantas, o que ainda não está tão claro. As hipóteses mais fortemente sustentadas até agora atribuem a elas papel de defesa contra vírus, bactérias, fungos e insetos (LAM; NG, 2011; PEUMANS; VAN DAMME, 1995).

Essas funções, assim como outras já relatadas, estão diretamente relacionadas à interação que ocorre no DRC (Figura 1), a qual é sustentada por pontes de hidrogênio em um mecanismo tipo chave – fechadura muito semelhante ao que ocorre com as enzimas em seu substrato, mas, diferentemente, nas lectinas não ocorre alteração conformacional do sítio de ligação, o que pode acontecer em enzimas, como indica a teoria do encaixe induzido. Nessa interação há deslocamento de moléculas de água com o estabelecimento de novas pontes de hidrogênio. Essas pontes, forças de Van der Waals e interações hidrofóbicas são dominantes na estabilidade da ligação, que também pode contar com a presença de pontes dissulfeto (KENNEDY et al., 1995). Em muitas dessas macromoléculas ocorre dependência de íons metálicos para desempenho de atividade biológica. Os íons estabilizam a conformação da proteína, favorecendo a ligação (PUSTZAI, 1991).

Figura 1 – Representação da interação lectina-carboidrato



Fonte: Adaptado de SILVA, C. et al. (2012). Ilustração da interação específica lectina-carboidrato. As esferas de cor laranja representam o carboidrato, que se liga ao domínio de reconhecimento a carboidrato – DRC. Essa ligação é sustentada por pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas, que, na figura, estão representados, respectivamente, pelas estruturas em lilás e vermelho.

O fato de ligarem-se especificamente a mono ou oligossacarídeos de forma reversível não faz das lectinas um grupo homogêneo. Elas possuem diversas características que as particularizam e fazem com que sejam agrupadas sob determinadas classificações. A partir do domínio de ligação a carboidratos, Van Damme et al. (1998) classificaram as lectinas em quatro grupos (Figura 2):

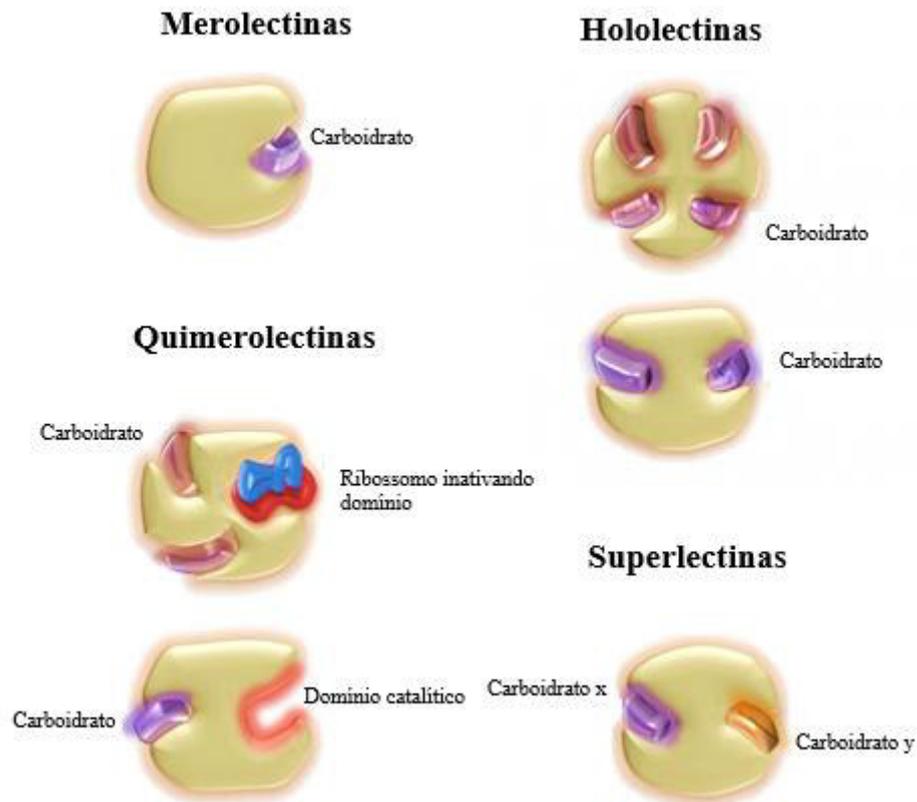
Merolectinas: quando possuem um único DRC, o que as faz ser monovalentes e, conseqüentemente, incapazes de precipitar glicoconjugados ou aglutinar eritrócitos. Exemplo: heveína, uma pequena proteína ligante à quitina presente no látex da espécie *Hevea brasiliensis*;

Hololectinas: são multi ou divalentes, interagindo com carboidratos iguais ou similares, diferentemente das merolectinas, podem precipitar glicoconjugados e aglutinar células. A maioria das lectinas de plantas pertence a essa classe, por exemplo, a ConA.

Quimerolectinas: são proteínas que possuem um sítio associado a um outro domínio ou atividade biológica diferente, independentemente do domínio de ligação ao carboidrato. Exemplos: Ricina, que é uma proteína inativadora de ribossomo (RIP tipo 2) e a segunda lectina isolada de *Parkia platycephala*, chamada PPL-2, que possui, além do sítio de ligação a carboidrato, um domínio catalítico endoquitinásico (CAVADA et al., 2006);

Superlectinas: possuem, assim como as hololectinas, ao menos dois sítios de ligação a carboidratos, mas esses domínios não são iguais e também não são similares, o que os possibilita reconhecer carboidratos estrutural e funcionalmente diferentes. Exemplo: lectina do bulbo da tulipa, que reconhece manose e *N*-acetil-galactosamina.

Figura 2 - Classificação das lectinas vegetais segundo o domínio de reconhecimento a carboidrato



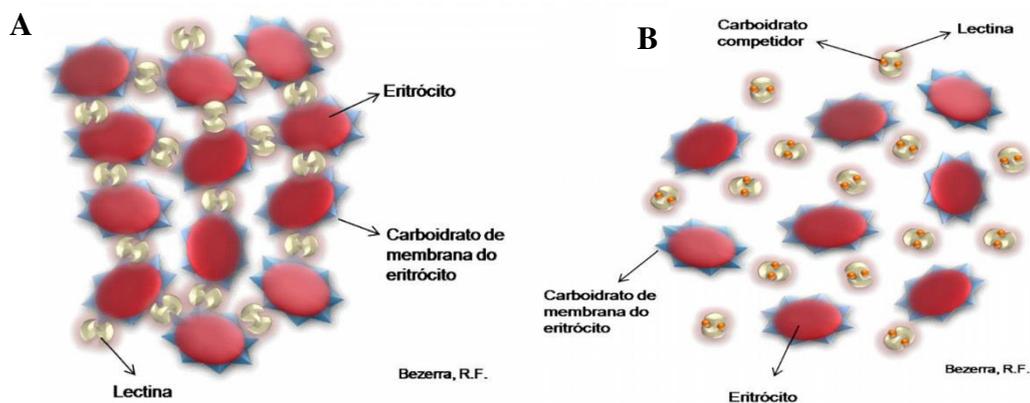
Fonte: Adaptado de BEZERRA (2009). Representação esquemática das quatro classes de lectinas – merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas - de acordo com o domínio de reconhecimento a carboidrato. As cadeias polipeptídicas estão representadas pelas estruturas arredondadas, a cavidade nessas estruturas representa o domínio de reconhecimento a carboidrato ou sítio catalítico, no caso das quimerolectinas.

2.3 Isolamento de lectinas

O passo inicial para a detecção de lectinas em um extrato dá-se pela avaliação de sua capacidade de aglutinar eritrócitos ou precipitar glicoconjugados (Figura 3). Em placas de microtitulação ou tubos de ensaio uma quantidade de extrato é diluída seriadamente em um tampão e, em seguida, adiciona-se uma solução contendo eritrócitos do sistema ABO humano ou de outros animais, nativos (sem tratamento) ou tratados com enzimas proteolíticas (MOREIRA et al., 1991).

Depois de detectada a presença de lectina, é essencial determinar a especificidade por mono ou oligossacarídeos através de ensaios de inibição por carboidratos. Nesses ensaios, antes dos eritrócitos serem adicionados, carboidratos diluídos seriadamente em um tampão ficam incubados com o extrato proteico por um tempo em que eles podem interagir. Havendo interação entre a lectina e o carboidrato dulado, a hemaglutinação é inibida (SANTOS, 2018).

Figura 3 – A: Ilustração da interação entre lectina e carboidrato da membrana do eritrócito. B: Reversibilidade da interação



Fonte: BEZERRA (2009). Os eritrócitos estão representados pelas esferas vermelhas, os carboidratos da membrana do eritrócito estão representados pela estrutura em azul, a lectina, pela estrutura de coloração amarela e o carboidrato competidor, pelas pequenas esferas de cor laranja.

Para representar quantitativamente a atividade hemaglutinante utiliza-se a potência 2^n , em que “n” representa o número de poços da placa no qual a diluição seriada foi capaz de aglutinar eritrócitos; o resultado é expresso em UH (Unidades de Hemaglutinação). Da mesma forma obtém-se o valor de CIM (Concentração Inibitória Mínima) para o ensaio de inibição por carboidratos, em que se considera o número do último poço com menor concentração do glicídio ainda capaz de inibir atividade hemaglutinante (MOREIRA et al., 1991; SANTOS, 2018).

Até 1970, apenas poucas hemaglutininas haviam sido isoladas, principalmente de plantas, o impulso na purificação dessas biomoléculas só aconteceu com o advento da técnica que atualmente ainda é a mais utilizada, a cromatografia de afinidade, que explora a propriedade de ligação a carboidratos dessas proteínas (KENNEDY, 1995; SHARON; LIS, 2004).

Em uma coluna, a matriz com o açúcar pelo qual a lectina tem afinidade constitui a fase estacionária e as soluções de eluição constituem a fase móvel. Os ligantes mais utilizados para compor a matriz são mono ou dissacarídeos, pelos quais as lectinas se ligam mais fracamente,

sendo facilitada sua liberação da coluna através de eluição competitiva. As lectinas podem ser eluídas também por soluções em condições de pH extremo e força iônica. Outras técnicas que podem ser utilizadas combinadas ou não com a cromatografia de afinidade são precipitação por sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica e filtração em gel. Lectinas imobilizadas em colunas também podem servir como matriz cromatográfica, o que as tornam ferramentas úteis para estudos em glicoproteômica (ROMERO et al., 2017). Essas técnicas possibilitaram um grande avanço em lectinologia, sendo etapas básicas para estudos de caracterização físico-química, cristalização e avaliação de atividades biológicas dessas proteínas (VAN DAMME et al., 1998).

2.4 Lectinas de leguminosas

Como já mencionado, a maioria dos estudos com lectinas concentra-se no reino Plantae. Dentro do grupo das angiospermas, a família Fabaceae, também conhecida por Leguminosae, destaca-se pelo número de lectinas isoladas de suas espécies. De grande importância econômica, ficando atrás apenas de Poaceae, ela é a terceira maior em número de espécies, depois de Asteraceae e Orchidaceae, com aproximadamente 19 500 espécies agrupadas em cerca de 770 gêneros. De distribuição cosmopolita, os frutos dessa família são bastante conhecidos por fazer parte da alimentação popular, entre outros: feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), amendoim (*Arachis hypogaea*), lentilha (*Lens esculenta*), ervilha (*Pisum sativum*) e soja (*Glycine max*) (LPWG, 2017).

A tradicional divisão de Fabaceae em três subfamílias, Caesalpinioideae; Mimosoideae; e Papilionoideae, tem sido alvo de questionamentos, principalmente em relação ao monofiletismo de Caesalpinioideae. Recentemente, um grupo de pesquisadores em filogenia de leguminosas propôs uma divisão em seis subfamílias, sendo elas: Cercidoideae; Detarioideae; Duparquetioideae; Dialioideae; Caesalpinioideae, incluindo o clado Mimosoideae e Papilionoideae (LPWG, 2017). Nessa revisão, será considerada a divisão tradicional, para melhor discussão em relação aos trabalhos publicados em lectinologia.

Das três subfamílias, a que apresenta um maior número de lectinas isoladas é Papilionoideae, especialmente as da subtribo Phaseolae, seguida por Caesalpinioideae (CAVADA et al., 2020b). Da primeira, estudos estruturais com hemaglutininas ligantes à manose do gênero *Dioclea* permitem interpretar como proteínas homólogas com o mesmo sítio de reconhecimento a carboidratos e arranjos quaternários idênticos podem exibir atividades biológicas diferentes ou similares, mas com níveis variados de potência e eficácia.

Dioclea sclerocarpa (BARROSO-NETO, et al., 2016), *Dioclea lasiocarpa* (NASCIMENTO et al., 2016), *Dioclea reflexa* (PINTO-JUNIOR et al., 2017), *Dioclea violacea* e *Dioclea rostrata* (BEZERRA et al., 2013) possuem potencial vasorrelaxante associado com o domínio lectínico e óxido nítrico, no entanto, mínimas mudanças nas cadeias polipeptídicas em aminoácidos chaves, mudanças entre as formas diméricas e tetraméricas de lectinas em solução, assim como a influência de pH, alteram a conformação e o volume do DRC, resultando em níveis diferentes de vasorrelaxamento, isso corrobora o fato de que, não obstante às semelhanças estruturais, essas proteínas diferem na expressão funcional.

Vários estudos têm sido levantados por grupos de pesquisa, mundialmente, na busca das possíveis aplicações das lectinas de leguminosas em diferentes áreas como em biologia celular e molecular, imunologia, farmacologia e medicina. Um outro exemplo de aplicação das propriedades dessas proteínas está no seu uso como agente em terapêutica com linhagem de células cancerígenas. Geralmente, essas células sofrem alterações em glicosilações em comparação com células normais, e essas alterações podem ser detectadas por lectinas, que também podem atuar no mecanismo de apoptose celular (BUTHIA et al., 2019; GAUTAM et al.; 2020; LAGARDA-DIAZ; GUZMAN-PARTIDA; VAZQUEZ-MORENO, 2017).

Outros potenciais biotecnológicos de lectinas podem ser analisados nas recentes publicações de trabalhos com a espécie *Machaerium acutifolium*. Pertencente à subfamília Papilionoideae, ela tem uma lectina ligante à manose que possui atividade antinociceptiva via receptor TRPV1 (SANTOS, A. et al, 2019); também inibe resposta inflamatória através de modulação de citocina (SANTOS, A. et al., 2020), e, além disso, possui atividade antifúngica por alterar a integridade da membrana celular e induzir a produção de espécies reativas de oxigênio em *Candida parapsilosis* (DIAS et al., 2020).

De acordo com análises filogenéticas baseadas em marcadores moleculares, a subfamília Mimosoideae é dividida em três tribos: Mimoseae, Acaciae e Ingeae, apresentando cerca de 3 271 espécies distribuídas em 83 gêneros, sendo a segunda maior em número de táxons. Entretanto, os estudos em lectinologia voltados para Mimosoideae ainda são pouco representativos quantitativamente, embora algumas das lectinas isoladas tenham tido relevantes efeitos quando testadas em ensaios biológicos. (CAVADA et al., 2020b; LPWG, 2013; OLIVEIRA, 2015).

Santi-Gadelha et al. (2012) avaliaram o efeito bacteriostático da lectina de *Acacia farnesiana* (tribo Acaciae) contra cepas gram-negativas e gram-positivas, sendo que para este último grupo o resultado foi mais expressivo, além disso, ela interfere no desenvolvimento de nematódeos, o que lhe confere potencial como agente fitopatogênico. Estudos por *docking*

molecular dessa proteína mostraram que ela também possui atividade anti-inflamatória que, diferentemente de outras lectinas com essa mesma propriedade, está relacionada a um sítio independente do de reconhecimento a carboidratos (ABRANTES et al., 2013).

2.5 Lectinas do gênero *Parkia*

Pertencente à família Fabaceae, o gênero *Parkia* engloba várias espécies vegetais de potencial econômico. De ocorrência pantropical, pode ser encontrado em solo brasileiro naturalmente nos estados das regiões Norte e Nordeste, no Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso e no Espírito Santo (FLORA DO BRASIL, 2020). Desde sua descrição, em 1826, por Robert Brown, o gênero sofreu várias reorganizações dentro da subfamília Mimosoideae, sendo que atualmente é incluído na tribo Mimoseae. Considerado monofilético de acordo com dados moleculares, esse gênero possui como sinapomorfia morfológica a presença de um cálice cilíndrico com lobos desiguais de prefloração imbricada (OLIVEIRA, 2015).

Algumas lectinas de espécies desse gênero já foram isoladas e parcialmente caracterizadas (Quadro 1) e estudos mais recentes evidenciam que elas são importantes ferramentas biotecnológicas.

Quadro 1 - Espécies do gênero *Parkia* com lectinas isoladas

Espécies	Referências
<i>P. platycephala</i>	GRANGEIRO et al. (1990)
<i>P. speciosa</i>	SUVACHITTANONT; PEUTPAIBOON (1992)
<i>P. javanica</i>	UTARABHAND; AKKAYANONT (1995)
<i>P. discolor</i>	CAVADA et al. (2000)
<i>P. biglandulosa</i>	KAUR et al. (2005)
<i>P. roxburghii</i>	KAUR et al. (2005)
<i>P. pendula</i>	CORIOLANO et al. (2010)
<i>P. biglobosa</i>	SILVA et al. (2013)
<i>P. panurensis</i>	CAVADA et al. (2020a)

Fonte: Elaborado pela autora

A lectina extraída das sementes de *P. platycephala* (PPL) mostrou-se eficaz no controle de parasitas gastrointestinais ao inibir o desenvolvimento de *Haemonchus contortus*, além de ser uma promissora aliada em terapias com antibióticos aminoglicosídeos, pois aumenta a

atividade de gentamicina contra bactérias multirresistentes (SILVA, R. et al., 2019). A hemaglutinina de *P. biglobosa* (PBL) possui importante atividade anti-inflamatória associada à mobilização de leucócitos e também atividade antinociceptiva associada à dor inflamatória (SILVA, H. et al., 2013).

2.5.1 *Parkia pendula*

Parkia pendula, espécie cujas sementes (Figura 4) foram utilizadas neste trabalho, é conhecida na nomenclatura vernacular, entre outros, por: fava de bolota, angelim, faveira e visgueiro, este último em referência a uma substância viscosa, chamada goma de visgueiro ou resina que prende suas sementes às vagens quando o fruto está seco. Piechowski e Gottsberger (2009) associaram a característica pegajosa da goma, como uma cola natural, a uma armadilha potencial para vertebrados. Tendo sido registrada a morte de um lagarto depois de ficar preso na resina da vagem de *P. pendula*.

A goma das sementes de *P. pendula* já foi magnetizada e aplicada como matriz para imobilização covalente de ConA e, posteriormente, como matriz de afinidade para o reconhecimento da glicoproteína fetuína de soro bovino. Os resultados desse estudo permitiram concluir que a combinação da goma das sementes com a lectina pode ser aplicada para purificação por afinidade, permitindo uma fácil recuperação por campo magnético (RÊGO et al., 2014).

Figura 4 - Sementes de *P. pendula*



A lectina de *P. pendula* (PpeL) já foi isolada e purificada através de um protocolo de purificação estabelecido por Coriolano et al. (2010). PpeL também já foi cristalizada (LOMBARDI et al., 1998) e alguns dos potenciais biológicos dessa proteína já foram demonstrados em estudos *in vitro* e *in vivo*. Como marcador histoquímico, PpeL mostrou ser uma útil ferramenta para a caracterização de tumor meningotelial e para diagnóstico clínico patológico (BELTRÃO et al., 2003). A lectina também apresentou efeitos contra a infectividade por citomegalovírus humano, o que a torna uma forte candidata para estudos posteriores de desenvolvimento de drogas antivirais (FAVACHO et al., 2007). Coriolano et al. (2014) obtiveram resultados positivos ao avaliar a atividade da PpeL no tratamento de lesões cutâneas em camundongos saudáveis e imunossuprimidos. Recentemente, Carneiro et al. (2020) elucidaram a estrutura primária da lectina e avaliaram a sua atividade leishmanicida em testes *in vitro*. Os resultados foram positivos, sendo o efeito associado à interação no DRC da proteína com os glicanos do parasita. Além disso, o estudo pretérito de Coriolano et al. (2010) concluiu, ao avaliar o efeito de EDTA sobre a lectina, que ela não possui dependência aos íons Mn^{+2} e Ca^{+2} para efetivar sua atividade.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Purificar e caracterizar uma lectina ligante à manose das sementes de *P. pendula* (Willd.) Benth. ex Walp.

3.2 Específicos

- Extrair as proteínas das sementes de *P. pendula*;
- Estabelecer um novo protocolo de purificação por cromatografia de afinidade;
- Avaliar o perfil eletroforético através de SDS-PAGE;
- Analisar a atividade hemaglutinante e a inibição por carboidratos;
- Avaliar a influência da variação de temperatura e pH sobre a atividade hemaglutinante da PpeL.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Procedência do material

As sementes utilizadas nessa pesquisa foram coletadas no quilombo Piqui da Rampa, no município de Vargem Grande - MA. A coleção de sementes foi registrada no SISGEN (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Aplicado, ID: AF8E1DD). Os eritrócitos de coelho foram obtidos na Universidade Federal do Maranhão e os reagentes químicos, da Sigma-Aldrich.

4.2 Extração de proteínas

Sementes de *P. pendula* foram lavadas com água para a retirada da resina que as prende à vagem e colocadas para secar em temperatura ambiente. Posteriormente, foram moídas em moinho elétrico de café e peneiradas até a obtenção de um material finamente pulverizado, denominado farinha. A extração proteica foi realizada a partir dessa farinha na proporção 1:10 (m/v), utilizando o tampão Tris-HCl 25 mM pH 7,6 contendo NaCl 150 mM. A solução foi mantida em agitação constante durante 4 horas à temperatura ambiente, ao término, foi centrifugada em uma velocidade de 4000 g por 5 minutos. O sobrenadante obtido, denominado extrato bruto, foi separado da porção precipitada, filtrado em filtro de papel e utilizado logo em seguida.

4.3 Cromatografia de afinidade

Para isolamento da lectina, foi empregada a tradicional técnica de cromatografia de afinidade. O extrato bruto foi aplicado em coluna agarose/manose previamente equilibrada com Tris-HCl 25 mM pH 7,6 contendo NaCl 150 mM. As proteínas que não se ligaram à matriz glicídica, e compõem o que se chama PI (pico 1), foram desorvidas com o tampão de equilíbrio. As proteínas de interesse (PII - pico 2), foram eluídas com glicina 100 mM pH 2,6. O PII foi coletado manualmente em frações de 1,5 mL, sendo sua concentração monitorada no espectrofotômetro a 280 nm. Todo o material ativo coletado foi dialisado contra água destilada, liofilizado e armazenado para uso subsequente.

4.4 Eletroforese em SDS-PAGE

Para acompanhar o processo de purificação e analisar a massa molecular aparente, foi realizada eletroforese em gel de poli(acrilamida) na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970).

O gel de separação (12,5%) constituiu-se de 2,65 mL de água destilada; 750 μ L de Tris 3 M; 2,5 mL de acrilamida/bisacrilamida; 60 μ L de SDS; 30 μ L de persulfato de amônio (100 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) e 10 μ L de TEMED. Para o gel de empilhamento (4%) foram utilizados 2,1 mL de água; 380 μ L de Tris 1 M; 500 μ L de acrilamida/bisacrilamida; 30 μ L de SDS; 30 μ L de persulfato de amônio e 3 μ L de TEMED. As seguintes proteínas foram utilizadas como marcadores de massa molecular: fosforilase B, 97 kDa; albumina sérica bovina, 66 kDa; desidrogenase glutâmica, 55 kDa; ovalbumina, 45 kDa; gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, 36 kDa; anidrase carbônica, 29 kDa; tripsinogênio, 24 kDa; inibidor de tripsina, 20 kDa e α -lactoalbumina, 14,2 kDa. Em um dos poços foi adicionado o extrato bruto e em outro a amostra proveniente do pico II da cromatografia de afinidade. Após a eletroforese, os géis de SDS-PAGE foram corados com azul brilhante de Coomassie® (R-350) e depois descorados com água destilada aquecida.

4.5 Quantificação de proteínas

Com o objetivo de determinar a quantidade de proteínas solúveis no extrato bruto e na amostra pura, foi utilizado o clássico método de Bradford (1976), que usa albumina sérica bovina (BSA) como padrão. Nele, quando em pH ácido, o corante aniônico Coomassie® Blue forma um complexo com proteínas que contenham aminoácidos básicos e/ou aromáticos. A interação entre a proteína e o corante acarreta na alteração do comprimento de onda de absorção máxima do corante (465 nm – corante livre) para 595 nm (corante complexado à proteína).

Em duplicata, adicionou-se 2,5 mL de reagente de Bradford em 100 μ L de extrato bruto e amostra pura, solubilizada em Tris-HCl 13 mM pH 7,6 contendo NaCl 150 mM, diluídos. A absorbância média, monitorada no espectrofotômetro a 595 nm, foi aplicada em uma equação de curva padrão baseada em concentrações conhecidas de BSA. Antes da leitura, o espectrofotômetro foi equilibrado com o “branco”, uma solução contendo 100 μ L do tampão Tris-HCl 25 mM pH 7,6 contendo NaCl 150 mM e 2,5 mL do reagente de Bradford, solubilizados no agitador por 5 minutos e, em seguida, deixados em repouso.

4.6 Ensaio de atividade hemaglutinante

A avaliação da atividade hemaglutinante da lectina foi realizada como descrito por Santos, A. et al. (2019), utilizando eritrócitos de coelho nativos (sem tratamento) e tratados com as enzimas proteolíticas tripsina e papaína. O tratamento consistiu na adição de 240 μL de tripsina ou papaína $0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em 12 mL de eritrócitos com NaCl 150 mM. Essa solução foi homogeneizada e deixada em repouso por 30 minutos. Posteriormente, foi centrifugada por 5 minutos a 4000 g, tendo o sobrenadante descartado e o volume de 12 mL completado com NaCl 150 mM. Esse procedimento de lavagem foi repetido 6 vezes.

Em placas de microtitulação (12 x 8), foram adicionados 50 μL do tampão Tris-HCl 25 mM pH 7,6 contendo NaCl 150 mM, em seguida, foram adicionados 50 μL da amostra diluídos seriadamente, ou seja, o conteúdo do primeiro poço (100 μL) foi homogeneizado três vezes por pipetagem e 50 μL foram passados para o poço seguinte e este processo foi repetido até o último poço, onde ficaram 100 μL , em seguida, foram adicionados 50 μL da solução de eritrócitos de coelho a 3% até o penúltimo poço. O título da atividade hemaglutinante foi determinado como a maior diluição ainda capaz de provocar hemaglutinação após uma incubação de 60 minutos.

4.7 Inibição da atividade hemaglutinante

O ensaio de inibição por carboidratos e glicoconjugados da lectina de *P. pendula* foi conduzido conforme descrito por Santos, A. et al. (2019). Foram conduzidos testes em placas de microtitulação (12 x 8), utilizando os seguintes carboidratos na concentração de 100 mM: D-glicose, D-galactose, D-manose, L-ramnose, D-fucose, *N*-acetil-D-glicosamina, α -metil-D-manopiranosídeo, α -lactose, β -lactose. Foram utilizadas também as glicoproteínas fetuína e mucina na concentração de $2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Em duplicata, foram adicionados 50 μL do tampão Tris-HCl 25 mM pH 7,6 contendo NaCl 150 mM nos poços da placa, seguidos por 50 μL do carboidrato ou glicoproteína diluídos seriadamente, em seguida, foram adicionados 50 μL da amostra até o penúltimo poço. Depois de uma hora de incubação, foram adicionados 50 μL de eritrócitos de coelho a 3% até o penúltimo poço. O título de inibição da hemaglutinação foi registrado como a maior diluição capaz de inibir a aglutinação produzida, após uma incubação de 60 minutos.

4.8 Efeito da temperatura sobre a atividade hemaglutinante da PpeL

Para avaliar o efeito da temperatura sobre a atividade hemaglutinante da proteína, foram realizados testes em placas de microtitulação com eritrócitos de coelho a 3% em NaCl 150 mM,

tratados com a enzima tripsina. Foi utilizado esse tipo de tratamento no sangue porque testes prévios de hemaglutinação revelaram um melhor título da atividade com ele. As enzimas proteolíticas como a tripsina atuam clivando certas proteínas da membrana celular dos eritrócitos, expondo os carboidratos do glicocálice, o que permite que as lectinas tenham um maior acesso a esses, aumentando os títulos de hemaglutinação.

Primeiramente, foi realizado teste de hemaglutinação em temperatura ambiente. Logo após, a amostra contendo a lectina foi incubada por 30 minutos a 30 °C iniciais e depois foi submetida a variações de 10 °C em banho-maria, com o mesmo tempo de incubação inicial, até que o ensaio de hemaglutinação revelasse perda de atividade.

4.9 Efeito do pH sobre a atividade hemaglutinante da PpeL

Para medir a influência do pH foi feito o título da atividade hemaglutinante da PpeL em placas de microtitulação com os seguintes tampões (100 mM) contendo NaCl 150 mM: acetato de sódio pH 4,0 e 5,0; fosfato de sódio pH 6,0 e 7,0; Tris-HCl pH 8,0 e glicina pH 9,0 e 10,0. Foram diluídos seriadamente 50 µL da amostra em cada tampão e, por último, adicionados 50 µL de solução contendo eritrócitos de coelho a 3% em NaCl 150 mM, tratados com a enzima tripsina.

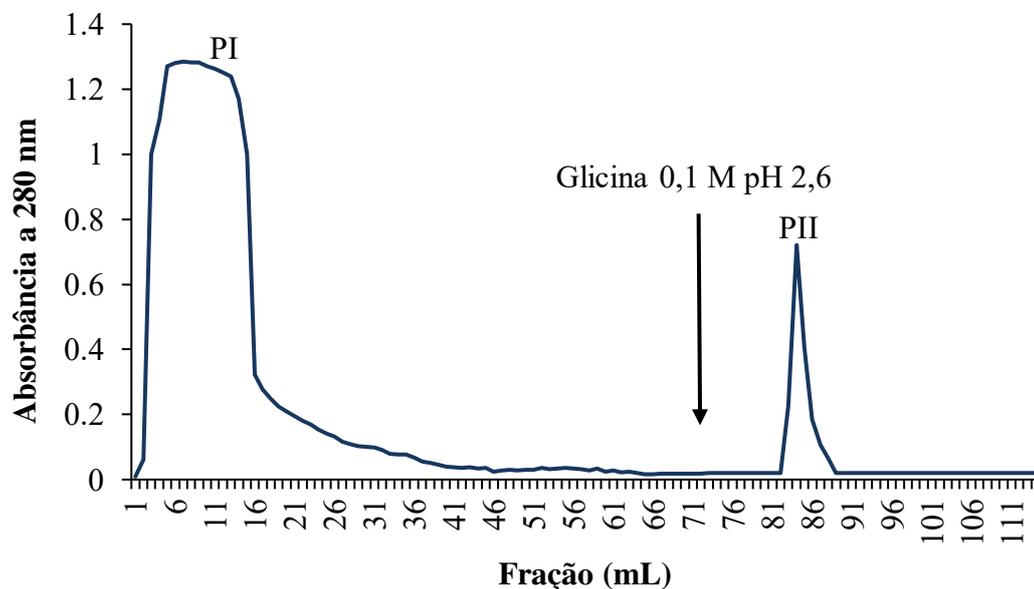
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Purificação da lectina das sementes de *P. pendula*

O extrato bruto contendo proteínas solúveis a partir da farinha das sementes da espécie *P. pendula* foi obtido através da homogeneização em solução tampão, um método comumente utilizado em química de proteínas. O sobrenadante foi aplicado em uma coluna de matriz agarose-manose. A fração não retida foi eluída com Tris HCl 25 mM pH 7,6 contendo NaCl 150 mM e a fração ativa, eluída com glicina 100 mM pH 2,6, com acompanhamento da absorvância no espectrofotômetro a 280 nm, sendo esse o único passo cromatográfico realizado. As curvas de PI e PII podem ser observadas na figura 5.

Com exceção das lectinas de *P. platycephala* e *P. discolor*, todas as outras isoladas do gênero *Parkia*, tiveram mais de um método de purificação, envolvendo precipitação por sulfato de amônio e/ou cromatografia de troca iônica (vide referências no Quadro 1 da página 23).

Figura 5 - Perfil cromatográfico da purificação da lectina de *P. pendula* em matriz agarose-manose



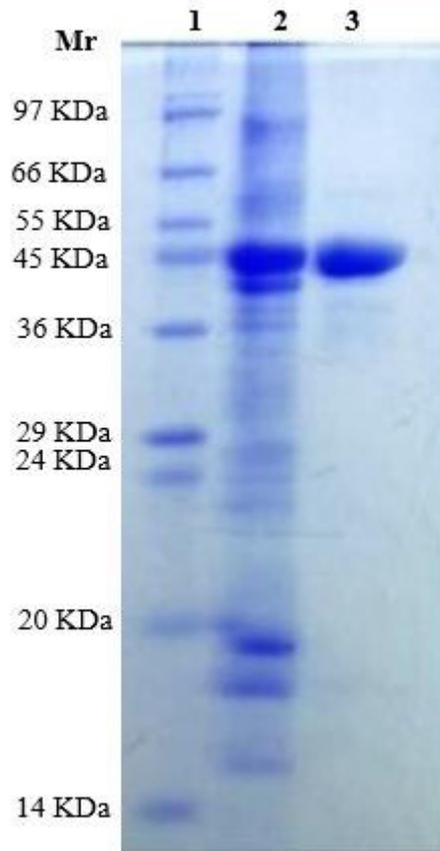
PI – Fração não retida na matriz, eluída com Tris-HCl 25 mM pH 7,6 contendo NaCl 150 mM

PII – Fração retida na matriz, eluída com glicina 100 mM pH 2,6

O perfil eletroforético da PpeL em SDS-PAGE (figura 6) revelou a presença de uma banda única de aproximadamente 45 KDa, confirmando a pureza da proteína. Com exceção das

lectinas de *P. biglandulosa* e *P. roxburghii* que são heterotetrâmeras e *P. javanica* e *P. speciosa* que são heterodímeras, todas as outras lectinas de *Parkia* apresentam um perfil de banda única variando de 45 KDa a 58 KDa. PpeL têm perfil de massa molecular aparente muito semelhante à *P. panurensis* e *P. biglobosa* (CAVADA et al., 2020b).

Figura 6 - Perfil eletroforético em SDS - PAGE



1- Marcador de Massa Molecular: fosforilase B, 97 kDa; albumina sérica bovina, 66 kDa; desidrogenase glutâmica, 55 kDa; ovalbumina, 45 kDa; gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, 36 kDa; anidrase carbônica, 29 kDa; tripsinogênio, 24 kDa; inibidor de tripsina, 20 kDa e α -lactoalbumina 14,2 kDa; 2- extrato bruto; 3- PpeL.

A quantificação pelo método de Bradford (1976) permitiu avaliar a concentração de proteínas tanto no extrato bruto quanto na fração pós-cromatografia, esse valor, associado com o obtido pelo ensaio de hemaglutinação em solução contendo eritrócitos tratados enzimaticamente, evidenciou que o processo de purificação em agarose-manose proporcionou um grau de pureza de cerca de 71 vezes, como pode ser observado na tabela 1.

Tabela 1 - Processo de purificação da PpeL

Fração	Proteína (mg/mL) ¹	UH/mL ²	AHE (UH/mg) ³	Fator de Purificação ⁴
Extrato bruto	1,434	64	44,6	1
PII agarose-manose	0,322	1024	3.180	71,3

¹ – Concentração de proteínas obtida pelo método de Bradford (1976)

² – Atividade hemaglutinante em eritrócitos de coelho tratados com tripsina

³ – Atividade hemaglutinante específica obtida pela divisão de UH por concentração de proteínas

⁴ – Fator de Purificação obtido pela divisão da AHE de PII agarose-manose pela AHE do extrato bruto

5.2 Ensaio de hemaglutinação e inibição por carboidratos

O ensaio de hemaglutinação realizado com sangue sem tratamento e tratado com as enzimas proteolíticas papaína e tripsina revelou um maior título de hemaglutinação para a PpeL com sangue tratado com essa última enzima, portanto, sangue tripsinado foi utilizado nos testes subsequentes. O ensaio de inibição por carboidratos e glicoproteínas da PpeL mostrou que a atividade foi totalmente inibida por D-glicose e *N*-acetil-D-glicosamina na mesma concentração (50 mM), e por D-manose e α -metil-D-manopiranosídeo, nenhum dos outros carboidratos (100 mM) e também as glicoproteínas (2 mg.mL⁻¹) fetuína e mucina inibiram a atividade hemaglutinante nas concentrações testadas. Como está apresentado na tabela 2, a lectina possui uma afinidade duas vezes maior pelo derivado de manose, α -metil-D-manopiranosídeo - inibiu na concentração de 12,5 mM.

De forma similar a outras lectinas de *Parkia*, PpeL apresentou maior afinidade à manose em comparação com a glicose, isso pode ser devido à posição axial da hidroxila no C2 da manose, enquanto na glicose ela ocupa uma posição equatorial, como apontado por Cavada et al. (2020a) no estudo com *P. panurensis*. Além disso, a preferência pelo derivado α -metil-D-manopiranosídeo indica que um substituinte mais hidrofóbico no C-1 favorece a interação com regiões hidrofóbicas do DRC da lectina.

Outras lectinas de leguminosas ligantes à manose e pertencentes a outras subfamílias compartilham esse mesmo perfil de especificidade. Lectinas isoladas de *Machaerium acutifolium* (SANTOS, A. et al., 2019) e *Canavalia villosa* (LOSSIO et al., 2017) apresentaram

resultados para CIM nas proporções idênticas à PpeL. *Centrolobium microchaete* (VASCONCELOS et al., 2015) e *Canavalia virosa* (OSTERNE et al., 2017) apresentaram pequenas mudanças em relação às proporções, mas em todas a especificidade é maior para α -metil-D-manopiranosídeo.

Tabela 2 – Efeito inibitório de carboidratos e glicoproteínas sob a atividade hemaglutinante da PpeL

Carboidratos	CIM* (mM)
D-glicose	50
D-galactose	NI**
D-manose	25
L-ramnose	NI
D-fucose	NI
N-acetil-D-glicosamina	50
α -metil-D-manopiranosídeo	12.5
α -lactose	NI
β -lactose	NI
Glicoproteínas	CIM (mg.mL⁻¹)
Fetuína	NI
Mucina	NI

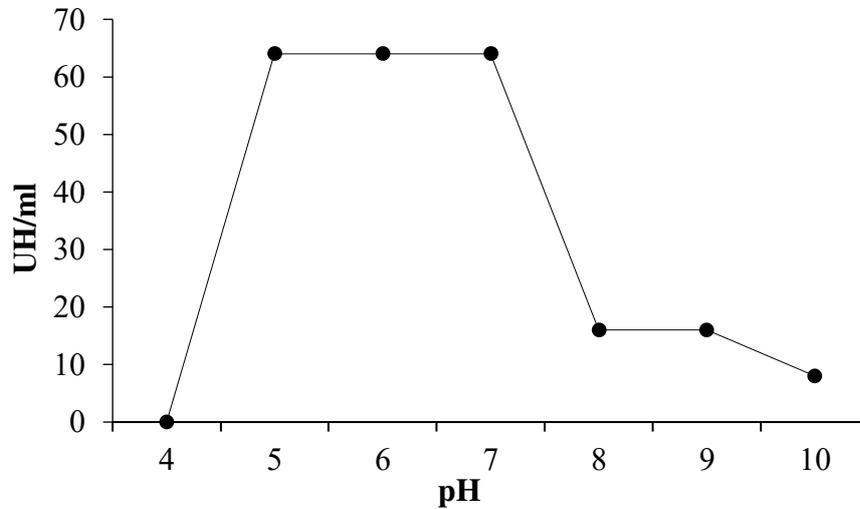
* Concentração Inibitória Mínima

** Não inibiu na concentração de 100 mM para carboidratos e 2 mg.mL⁻¹ para glicoproteínas

5.3 Influência da variação de pH e temperatura sobre a AH da PpeL

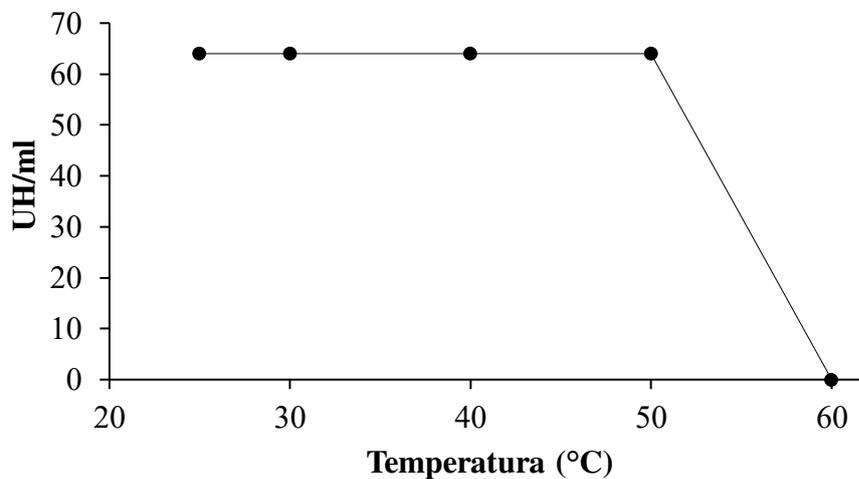
A lectina de *P. pendula* apresentou melhor atividade entre pH levemente ácido a neutro, entre 5,0 e 7,0 tendo redução de 75% em pH 8,0 e 9,0 (figura 7).

Figura 7 - Influência do pH sobre a AH da PpeL



A proteína também apresentou razoável termoestabilidade, mantendo sua atividade inalterada até 50 °C e perdendo-a totalmente a 60 °C (figura 8).

Figura 8 - Influência da variação de temperatura sobre a AH da PpeL



Esses resultados vão ao encontro dos já reportados para lectinas do gênero *Parkia*, que desempenham atividade máxima em torno do pH neutro e são altamente sensíveis a temperaturas igual ou superior a 50 °C, a exemplo de *P. panurensis* (CAVADA et al., 2020a), que perde metade de sua atividade nesse valor térmico, além de *P. javanica* (UTARABHAND; AKKAYANONT, 1995), *P. biglandulosa* (KAUR et al., 2005) e *P. roxburghii* (KAUR et al.,

2005), que perderam metade da atividade a 55 °C. De modo geral, nenhuma possui capacidade de hemaglutinação a 70 °C.

O perfil físico-químico da PpeL é semelhante ao de outras lectinas de leguminosas ligantes à manose. As lectinas de *Canavalia villosa* (LOSSIO et al., 2017) e *Dioclea reflexa* (PINTO-JÚNIOR et al., 2016) também têm como pH ótimo a faixa entre 5,0 e 7,0. As hemaglutininas isoladas de *Centrolobium microchaete* (VASCONCELOS et al., 2015) e *Machaerium acutifolium* (SANTOS, A. et al., 2019) têm a atividade bruscamente reduzida a 60 °C. A maioria das lectinas de leguminosas raramente ultrapassa os 80 °C, o que pode ocorrer excepcionalmente, como na segunda lectina isolada de *Dioclea lasiophylla* (CAVADA et al., 2020c), específica para α -lactose/*N*-acetil-galactosamina, em que a atividade máxima é mantida até 90 °C e em pH básico, de 8,0 a 10,0.

6 CONCLUSÃO

Uma lectina específica para manose/glicose das sementes de *P. pendula* (PpeL) foi purificada através de um protocolo otimizado e reprodutível. A massa molecular aparente foi observada em SDS-PAGE, apresentando uma banda única, e o cálculo da atividade específica da proteína mostrou um alto grau de pureza, o que confirma a eficiência do novo processo de purificação. As características físico-químicas da PpeL foram determinadas, tornando conhecidas as mínimas concentrações de carboidratos que inibem a atividade hemaglutinante. A lectina mostrou ser estável em uma faixa de pH levemente ácida à neutra, e relativamente termoestável. Os resultados foram muito semelhantes aos obtidos para outras lectinas ligantes à manose congêneres ou não. Eles ampliam os estudos com lectinas da subfamília Mimosoideae, e servem de base para outras pesquisas em relação às atividades que a lectina de *P. pendula* pode exercer.

REFERÊNCIAS

- ABRANTES, V.E.F.; ROCHA, B.A.M.; NÓBREGA, R.B.; SILVA-FILHO, J.C.; TEIXEIRA, C.S.; CAVADA, B.S.; GADELHA, C.A.A.; FERREIRA, S.H.; FIGUEIREDO, J.G.; SANTI-GADELHA, T.; DELATORRE, P. Molecular Modeling of Lectin-Like Protein from *Acacia farnesiana* Reveals a Possible Anti-Inflammatory Mechanism in Carrageenan-Induced Inflammation. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-9, 2013.
- ALVES, A.C.; VASCONCELOS, M.A.; SANTIAGO, M.Q.; PINTO-JUNIOR, V.R.; OSTERNE, V.J.S.; LOSSIO, C.F.; BRINGEL, P.H.S.F.; CASTRO, R.R.; NAGANO, C.S.; DELATORRE, P.; SOUZA, L.A.G.; NASCIMENTO, K.S.; ASSREUY, A.M.S.; CAVADA, B.S. 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.
- BARRE, A.; SIMPLICIEN, M.; BENOIST, H.; VAN DAMME, E.J.M.; ROUGÉ, P. Mannose-Specific Lectins from Marine Algae: Diverse Structural Sca olds Associated to Common Virucidal and Anti-Cancer Properties. **Marine Drugs**, v. 17, p. 1-25, 2019.
- BARROSO-NETO, I.L.; DELATORRE, P.; TEIXEIRA, C.S.; CORREIA, J.L.A.; CAJAZEIRAS, J.B.; PEREIRA, R.I.; NASCIMENTO, K.S.; LARANJEIRA, E.P.P.; PIRES, A.F.; ASSREUY, A.M.S.; ROCHA, B.A.M.; CAVADA, B.S. Structural analysis of a *Dioclea sclerocarpa* lectin: Study on the vasorelaxant properties of Dioclea lectins. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 82, p. 464-470, 2016.
- BATISTA, K.L.R.; SILVA, C.R.; SANTOS, V.F.; SILVA, R.C.; ROMA, R.R.; SANTOS, A.L.E.; PEREIRA, R.O.; DELATORRE, P.; ROCHA, B.A.M.; SOARES, A.M.S.; COSTA-JÚNIOR, L.M.; TEIXEIRA, C.S. Structural analysis and anthelmintic activity of *Canavalia brasiliensis* lectin reveal molecular correlation between the carbohydrate recognition domain and glycans of *Haemonchus contortus*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 225, p. 67-72, 2018.
- BELTRÃO, E.I.C.; MEDEIROS, P.L.; RODRIGUES, O.G. FIGUEREDO-SILVA, J.; VALENÇA, M.M.; COELHO, L.C.B.B.; CARVALHO JÚNIOR, L.B. *Parkia pendula* lectin as histochemistry marker for meningotheelial tumour. **European Journal of Histochemistry**, v. 47, p. 139-142, 2003.
- BEZERRA, R.F. **Purificação e caracterização parcial da lectina presente no soro do peixe amazônico Tambaqui (*Colossoma macropomum*)**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Fisiologia) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2009.
- BEZERRA, M.J.B.; RODRIGUES, N.V.F.C., PIRES, A.F.; BEZERRA, G.A.; NOBRE, C.B.; ALENCAR, K.L.L.; SOARES, P.M.G.; NASCIMENTO, K.S.; NAGANO, C.S.; MARTINS, J.L.; GRUBER, K.; SAMPAIO, A.H.; DELATORRE, P.; ROCHA, B.A.M.; ASSREUY, A.M.S.; CAVADA, B.S. Crystal structure of *Dioclea violacea* lectin and a comparative study of vasorelaxant properties with *Dioclea rostrata* lectin. **The International Journal of Biochemistry e Cell Biology**, v. 45, p. 807-815, 2013.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BUTHIA, S.K.; PANDA, P.K.; SINHA, N.; PRAHARAJ, P.P.; BHOL, C.S.; PANIGRAHI, D.P.; MAHAPATRA, K.K.; SAHA, S.; PATRA, S.; MISHRA, S.R.; BEHERA, B.P.; PATIL, S.; MAITI, T.K. Plant lectins in cancer therapeutics: Targeting apoptosis and autophagy-dependent cell death. **Pharmalogical Research**, v. 144, p. 8-18, 2019.

CAMPOS, J.K.L.; ARAÚJO, C.S.F.; ARAÚJO, T.F.S.; SANTOS, A.F.S.; TEIXEIRA, J.A.; LIMA, V.L.M.; COELHO, L.C.B.B. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Bauhinia monandra* leaf lectin. **Biochimie Open**, v. 2, p. 62-68, 2016.

CARNEIRO, R.F.; AGUIAR, E.S.; SANTOS, V.F.; SANTOS, A.L.E.; SANTOS, M.H.C.; ROMA, R.R.; SILVA, R.R.S.; LEAL, M.L.M.B.; SILVA, L.T.; ROCHA, B.A.M.; SILVA, C.G.L.; NAGANO, C.S.; SAMPAIO, A.L.; SOUZA, R.O.S.; TEIXEIRA, C.S. Elucidation of the primary structure and molecular modeling of *Parkia pendula* lectin and in vitro evaluation of the leishmanicidal activity. **Process Biochemistry**, v. 101, p. 1-10, 2020.

CAVADA, B.S.; MADEIRA, S.V.F.; CALVETE, J.J.; SOUZA, L.A.G.; BOMFIM, L.R.; DANTAS, A.R.; LOPES, M.C.; GRANGEIRO, T.B.; FREITAS, B.T.; PINTO, V.P.T.; LEITE, K.B.; RAMOS, M.V. Purification, Chemical, and Immunochemical Properties of a New Lectin from Mimosoideae (*Parkia discolor*). **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 30, n. 4, p. 271-280, 2000.

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

CAVADA, B.S.; ARARIPE, D.A.; SILVA, I.B.; PINTO-JUNIOR, V.R.; OSTERNE, V.J.S.; NECO, A.H.B.; LARANJEIRA, E.P.P.; LOSSIO, C.F.; CORREIA, J.L.A.; PIRES, A.F.; ASSREUY, A.M.S.; NASCIMENTO, K.S. Structural studies and nociceptive activity of a native lectin from *Platypodium elegans* seeds (nPELa). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, p. 236-246, 2018.

CAVADA, B.S.; BARI, A.U.; PINTO-JUNIOR, V.R.; LOSSIO, C.F.; SILVA, M.T.L.; SOUZA, L.A.G.; OLIVEIRA, M.V.; SOUZA-FILHO, C.H.D.; CORREIA, S.E.G.; VITAL, A.P.M.S.; LIMA, L.D.; OSTERNE, V.J.; NASCIMENTO, K.S. Purification and partial characterization of a new lectin from *Parkia panurensis* Benth. ex H.C. Hopkins seeds (Leguminosae family; Mimosoideae subfamily) and evaluation of its biological effects. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 145, p. 845- 855, 2020a.

CAVADA, B.S.; OSTERNE, V.J.S.; OLIVEIRA, M.V.; PINTO-JUNIOR, V.R.; SILVA, M.T.L.; BARI, A.U.; LIMA, L.D.; LOSSIO, C.F.; NASCIMENTO, K.S. Reviewing Mimosoideae lectins: A group of under explored legume lectins. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 154, p. 159-165, 2020b.

CAVADA, B.S.; PINTO-JUNIOR, V.R.; OSTERNE, V.J.S.; LOSSIO, C.F.; SILVA, M.T.L.; CORREIA, J.L.A.; CORREIA, S.E.G.; NAGANO, C.S.; OLIVEIRA, M.V.; LIMA, L.D.; VITAL, A.P.M.S.; LEAL, R.B.; NASCIMENTO, K.S. A Diocleinae type II lectin from *Dioclea lasiophylla* Mart. Ex Benth seeds specific to α -lactose/GalNAc. **Process Biochemistry**, v. 93, p. 104-114, 2020c.

COELHO, L.C.B.B.; SILVA, P.M.S.; OLIVEIRA, W.F.; MOURA, M.C.; PONTUAL, E.V.; GOMES, F.S.; PAIVA, P.M.G.; NAPOLEÃO, T.H.; CORREIA, M.T.S. Lectins as antimicrobial agents. **Journal of Applied Microbiology**, v. 125, p. 1238–1252, 2018.

CORIOLOANO, M.C., SATURNINO, A.C.R.D., CINTRA, E.A., BELTRÃO, E.I.C.; COELHO, L.C.B.B. (2010). Purification in milligram quantities and partial characterization of *Parkia pendula* seed lectin. In: Special Abstracts. 14th International Biotechnology Symposium and Exhibition, Rimini, Italy (p. 454).

CORIOLOANO, M.C.; MELO, C.M.L.; SILVA, F.O.; SCHIRATO, G.V.; PORTO, C.S.; SANTOS, P.J.P.; CORREIA, M.T.S.; PORTO, A.L.F.; CARNEIRO-LEÃO, A.M.A.; COELHO, L.C.B.B. *Parkia pendula* Seed Lectin: Potential Use to Treat Cutaneous Wounds in Healthy and Immunocompromised Mice. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, p. 2682-2693, 2014.

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

DIAS, L.P.; SANTOS, A.L.E.; ARAÚJO, N.M.S.; SILVA, R.R.S.; SANTOS, M.H.C.; ROMA, R.R.; ROCHA, B.A.M.; OLIVEIRA, J.T.A.; TEIXEIRA, C.S. *Machaerium acutifolium* lectin alters membrane structure and induces ROS production in *Candida parapsilosis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 163, p. 19–25, 2020.

FAVACHO, A.R.M.; CINTRA, E.A.; COELHO, L.C.B.B.; LINHARES, M.I.S. In vitro activity evaluation of *Parkia pendula* seed lectin against human cytomegalovirus and herpes virus 6. **Biologicals**, v.35, p. 189-194, 2007.

FENG, Y.; SONG, J.; ZHAO, Z.; ZHAO, F.; YANG, L.; JIAO, C. A rapid and effective method for purification of a heat-resistant lectin from potato (*Solanum tuberosum*) tubers. **Glycoconjugate Journal**, v. 35, p. 403-409, 2018.

Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/> >. Acesso em: 13 abr. 2020.

FRANCIS, F.; JABER, K.; COLINET, F.; PORTETELLE, D.; HAUBRUGE, E. Purification of a new fungal mannose-specific lectin from *Penicillium chrysogenum* and its aphicidal properties. **Fungal Biology**, v. 115, p. 1093-1099, 2011.

GABIUS, H.J. ANDRÉ, S.; JIMÉNEZ-BARBERO, J.; ROMERO, A.; SOLÍS, D. **Trends in Biochemical Sciences**, v.36, n. 6, p. 298-313, 2011.

GAUTAM, A.K.; SHARMA, D.; SHARMA, J.; SAINI, K.C. Legume lectins: Potential use as a diagnostics and therapeutics against the câncer. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 142, p. 474-483, 2020.

GONDIM, A.C.S.; ROMERO-CANELÓN, I.; SOUSA, E.H.S.; BLINDAUER, C.A.; BUTLER, J.S.; ROMERO, M.J.; SANCHEZ-CANO, C.; SOUSA, B.L.; CHAVES, R.P.; NAGANO, C.S.; CAVADA, B.S.; SADLER, P.J. The potent anti-cancer activity of *Dioclea lasiocarpa* lectin. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 175, p. 179-189, 2017.

GRANGEIRO, T.B.; OLIVEIRA, J.T.A.; MOREIRA, R.A.; CAVADA, B.S. Estudos preliminares de uma lectina de sementes de *Parkia platycephala*. **Acta Botânica Brasileira**, v. 4, n. 2, p. 69-74, 1990.

KAUR, N.; SINGH, J.; KAMBOJ, S.S.; AGREWALA, J.N.; KAUR, M. Two Novel Lectins from *Parkia biglandulosa* and *Parkia roxburghii*: Isolation, Physicochemical Characterization, Mitogenicity and Anti-Proliferative Activity. **Protein and Peptide Letters**, v. 12, p. 589-595, 2005.

KENNEDY, J.F.; PALVA, P.M.G.; CORELLA, M.T.S.; CAVALCANTI, M.S.M.; COELHO, L.C.B.B. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 26, p. 219-230, 1995.

LAGARDA-DIAZ, I.; GUZMAN-PARTIDA, A.M.; VAZQUEZ-MORENO, L. Legume Lectins: Proteins with Diverse Applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 1, p. 1-18, 2017.

LAKHTIN, V.; LAKHTIN, M.; ALYOSHKIN, V. Lectins of living organisms. The overview. **Anaerobe**, v. 17, p. 452-455, 2011.

LAM, S.K.; NG, T.B. Lectins: production and practical applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, p. 45-55, 2011.

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

LOMBARDI, F.R.; FONTES, M.R.M.; SOUZA, G.M.O.; COELHO, L.C.B.B.; ARNI, R.K.; AZEVEDO JÚNIOR, W.F. Crystallization and preliminar x-ray analysis of *Parkia pendula* lectin. **Protein and Peptide Letters**, v. 5, p. 117-120, 1998.

LOSSIO, C.F.; MOREIRA, C.G.; AMORIM, R.M.F.; NOBRE, C.S.; SILVA, M.T.L.; NETO, C.C.; PINTO-JUNIOR, V.R.; SILVA, I.B.; CAMPOS, J.; ASSREUY, A.M.S.; CAVADA, B.S.; NASCIMENTO, K.S. Lectin from *Canavalia villosa* seeds: A glucose/mannose-specific protein and a new tool for inflammation studies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 105, p. 272-280, 2017.

LPWG – The Legume Phylogeny Work Group. Legume phylogeny and classification in the 21st century: progress, prospects and lessons for other species-rich clades. **Taxon**, v. 62, n. 2, p. 217-248, 2013.

- LPWG – The Legume Phylogeny Work Group. A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. **Taxon**, v. 66, n. 1, p. 44-77, 2017.
- MOREIRA, R.A.; AINOUS, I.L.; OLIVEIRA, J.T.A.; CAVADA, B.S. Plant lectins, chemical and biological aspects. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, p. 211-218, 1991.
- NASCIMENTO, A.S.F.; GONDIM, A.C.S.; CAJAZEIRAS, J.B.; CORREIA, J.L.A.; PIRES, A.F.; NASCIMENTO, K.S.; SILVA, A.L.C.; NAGANO, C.S.; ASSREUY, A.M.S.; CAVADA, B.S. Purification and partial characterization of a novel lectin from *Dioclea lasiocarpa* Mart seeds with vasodilator effects. **Journal of Molecular Recognition**, v. 25, p. 657-664, 2012.
- NUNES, E.S.; SOUZA, M.A.A.; VAZ, A.F.M.; SANTANA, G.M.S.; GOMES, F.S.; COELHO, L.C.B.B.; PAIVA, P.M.G.; SILVA, R.M.L.; SILVA-LUCCA, R.A.; OLIVA, M.L.V.; GUARNIERI, M.C.; CORREIA, M.T.S. Purification of a lectin with antibacterial activity from *Bothrops leucurus* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, v. 159, p. 57-63, 2011.
- OLIVEIRA, L.C. **Filogenia de *Parkia* R. Br. (Leguminosae: Mimosoideae) baseada em sequências de DNA de cloroplasto**. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Botânica) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 2015.
- OSTERNE, V.J.S.; SILVA-FILHO, J.C.; SANTIAGO, M.Q.; PINTO-JUNIOR, V.R.; ALMEIDA, A.C.; BARRETO, A.A.G.C.; WOLIN, I.A.V.; NASCIMENTO, A.P.M.; AMORIM, R.M.F.; ROCHA, B.A.M.; DELATORRE, P.; NAGANO, C.S.; LEAL, R.B.; ASSREUY, A.M.S.; NASCIMENTO, K.S.; CAVADA, B.S. Structural characterization of a lectin from *Canavalia virosa* seeds with inflammatory and cytotoxic activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 94, p. 271-282, 2017.
- PEREIRA, R.J.; CARDOSO, M.G. Vegetable secondary metabolites and antioxidants benefits. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 4, p. 146-152, 2012.
- PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E.J.M. Lectins as Plant Defense Protein. **Plant Physiology**, v. 109, p. 347-352, 1995.
- PIECHOWSKI, D.; GOTTSBERGER, G. The seedpod gum of *Parkia pendula* (Fabaceae) as a deadly trap for vertebrates. **Revista Biotemas**, v. 22, p. 175-177, 2009.
- PINTO-JUNIOR, V.R.; CORREIA, J.L.A.; PEREIRA, R.I.; PEREIRA-JUNIOR, F.N.; SANTIAGO, M.Q.; OSTERNE, V.J.S.; MADEIRA, J.C.; CAJAZEIRAS, J.B.; NAGANO, C.S.; DELATORRE, P.; ASSREUY, A.M.S.; NASCIMENTO, K.S.; CAVADA, B.S. Purification and molecular characterization of a novel mannose-specific lectin from *Dioclea reflexa* Hook seeds with inflammatory activity. **Journal of Molecular Recognition**, v. 29, p. 134-141, 2016.
- PINTO-JUNIOR, V.R.; OSTERNE, V.J.S.; SANTIAGO, M.Q.; CORREIA, J.L.A.; PEREIRA-JUNIOR, F.N.; LEAL, R.B.; PEREIRA, M.G.; CHICAS, L.S.; NAGANO, C.S.; ROCHA, B.A.M.; SILVA-FILHO, J.C.; FERREIRA, W.P.; ROCHA, C.R.C.;

- NASCIMENTO, K.S.; ASSREUY, A.M.S.; CAVADA, B.S. Structural studies of a vasorelaxant lectin from *Dioclea reflexa* Hook seeds: Crystal structure, molecular docking and dynamics. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 98, p. 12-23, 2017.
- PIRES, A.F.; BEZERRA, M.M.; AMORIM, R.M.F.; NASCIMENTO, F.L.F.; MARINHO, M.M.; MOURA, R.M.; SILVA, M.T.L.; CORREIA, J.L.A.; CAVADA, B.S.; ASSREUY, A.M.S.; NASCIMENTO, K.S. Lectin purified from *Lonchocarpus campestris* seeds inhibits inflammatory nociception. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 125, p. 53-60, 2019.
- PUSZTAI, A. **Plant Lectins**. Cambridge University Press, 1991.
- RÊGO, M.J.B.M.; ALMEIDA, S.M.; BEZERRA, S.A.; CARVALHO JÚNIOR, L.B.; BELTRÃO, E.I.C. Magnetic *Parkia pendula* seed gum as matrix for Concanavalin A lectin immobilization and its application in affinity purification. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 86, p. 1351-1357, 2014.
- ROCHA, B.A.M.; DELATORRE, P.; OLIVEIRA, T.M.; BENEVIDES, R.G.; PIRES, A.F.; SOUSA, A.A.S.; SOUZA, L.A.G.; ASSREUY, A.M.S.; DEBRAY, H.; AZEVEDO JR, W.F.; SAMPAIO, A.H.; CAVADA, B.S. Structural basis for both pro- and anti-inflammatory response induced by mannose-specific legume lectin from *Cymbosema roseum*. **Biochimie**, v. 93, p. 806-816, 2011.
- ROMERO, J.C.T.; TORRES, M.J.O.; BETANCOUR, J.A.I.; CAVALCANTE, C.A.M. Isolamento de lectinas por cromatografia de afinidade. **Revista de Investigación Agraria y Ambiental**, v. 8, n. 1, p. 63-64, 2017.
- SANTI-GADELHA, T.; ROCHA, B.A.M.; GADELHA, C.A.A.; SILVA, H.C.; CASTELLON, R.E.R.; GONÇALVES, F.J.T.; TOYAMA, D.O.; TOYAMA, M.H.; SOUZA, A.J.F.; BERIAM, L.O.S.; MARTINS, J.T.; JOAZEIRO, P.P.; CAVADA, B.S. Effects of a lectin-like protein isolated from *Acacia farnesiana* seeds on phytopathogenic bacterial strains and root-knot nematode. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 103, p. 15-22, 2012.
- SANTOS, A.L.E.; LEITE, G.O.; CARNEIRO, R.F.; ROMA, R.R.; SANTOS, V.F.; SANTOS, M.H.C.; PEREIRA, R.O.; SILVA, R.C.; NAGANO, C.S.; SAMPAIO, A.H.; ROCHA, B.A.M.; DELATORRE, P.; CAMPOS, A.R.; TEIXEIRA, C.S. Purification and biophysical characterization of a mannose/*N*-acetyl-Dglucosamine-specific lectin from *Machaerium acutifolium* and its effect on inhibition of orofacial pain via TRPV1 receptor. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 664, p. 149-156, 2019.
- SANTOS, A.L.E.; JÚNIOR, C.P.S. NETO, R.N.M.; SANTOS, M.H.C.; SANTOS, V.F.; ROCHA, B.A.M.; SOUSA, E.M.; CARVALHO, R.C.; MENEZES, I.R.A.; OLIVEIRA, M.R.C.; DANTAS, L.B.R.; SILVA, T.N.; TEIXEIRA, C.S. *Machaerium acutifolium* lectin inhibits inflammatory responses through cytokine modulation. **Process Biochemistry**, v. 97, p. 149-157, 2020.
- SANTOS, V.F.; **Extração e caracterização parcial de uma lectina das sementes de *Camposema rubicundum* Hook. e Arn.** 2018. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Maranhão, Chapadinha, 2018.

SANTOS, V.F.; COSTA, M.S.; CAMPINA, F.F.; RODRIGUES, R.R.; SANTOS, A.L.E.; PEREIRA, F.M.; BATISTA, K.L.R.; SILVA, R.C.; PEREIRA, R.O.; ROCHA, B.A.M.; COUTINHO, H.D.M.; TEIXEIRA, C.S. The Galactose-Binding Lectin Isolated from *Vatairea macrocarpa* Seeds Enhances the Effect of Antibiotics Against *Staphylococcus aureus* Resistant Strain. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 12, p. 82-90, 2019.

SANTOS, V.F.; ARAÚJO, A.C.J.; SILVA, A.L.F.; ALMEIDA, D.V.; FREITAS, P.R.; SANTOS, A.L.E.; ROCHA, B.A.M.; GARCIA, W.; LEME, A.M.; BONDAN, E.; BORGES, F.T.; CUTRIM, B.S.; SILVA, L.C.N.; COUTINHO, H.D.M.; TEIXEIRA, C.S. *Dioclea violacea* lectin modulates the gentamicin activity against multi-resistant strains and induces nephroprotection during antibiotic exposure. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 146, p. 841-852, 2020.

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

SILVA, C.D.C. **Purificação e caracterização parcial de uma lectina presente no soro do peixe tilápia (*Oreochromis niloticus*): atividade imunomodulatória em esplenócitos de camundongos**. 2012. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas - UFPE, Recife, 2012.

SILVA, H.C.; BARI, A.U.; ROCHA, B.A.M.; NASCIMENTO, K.S.; PONTE, E.L.; PIRES, A.F.; DELATORRE, P.; TEIXEIRA, E.H.; DEBRAY, H.; ASSREUY, A.M.S.; NAGANO, C.S.; CAVADA, B.S. Purification and primary structure of a mannose/glucose-binding lectin from *Parkia biglobosa* Jacq. seeds with antinociceptive and anti-inflammatory properties. **Journal of Molecular Recognition**, v. 26, p. 470-478, 2013.

SILVA, R.R.; SILVA, C.R.; SANTOS, V.F.; BARBOSA, C.R.S.; MUNIZ, D.F.; SANTOS, A.L.E.; SANTOS, M.H.C.; ROCHA, B.A.M.; BATISTA, K.L.R.; COSTA-JUNIOR, L.M.; COUTINHO, H.D.M.; TEIXEIRA, C.S. *Parkia platycephala* lectin enhances the antibiotic activity against multiresistant bacterial strains and inhibits the development of *Haemonchus contortus*. **Microbial Pathogenesis**, v. 135, 2019.

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

SUVACHITTANONT, W.; PEUTPAIBOON, A. Lectin from *Parkia speciosa* seeds. **Phytochemistry**, v. 31, n. 12, p. 4065-4070, 1992.

UTARABHAND, P; AKKAYANONT, P. Purification of a lectin from *Parkia javanica* beans. **Phytochemistry**, v. 38, n. 2, p. 281-285, 1995.

VAN DAMME, E.J.M.; PEUMANS, W.J.; BARRE, A.; ROUGÉ, P. 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.

VAN DAMME, E.J.M.; LANNOO, N.; PEUMANS, W.J. Plant Lectins. **Advances in Botanical Research**, v. 48, p. 109-193, 2008.

VASCONCELOS, M.A.; ALVES, A.C.; CARNEIRO, R.F.; DIAS, A.H.S.; MARTINS, F.W.V.; CAJAZEIRAS, J.B.; NAGANO, C.S.; TEIXEIRA, E.H.; NASCIMENTO, K.S.; CAVADA, B.S. 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.

ZENG, L.; LI, L.; ZENG, Q.; DENG, Y.; YIN, L.; LIAO, L. Mitogenic activity of *Artocarpus lingnanensis* lectin and its apoptosis induction in Jurkat T cells. **Journal of Natural Medicines**, v. 72, p. 745-756, 2018.