



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**  
**CAMPUS SOBRAL**

**FRANCISCO VALDICÉLIO FERREIRA**

**GALACTOMANANA RETICULADA DE SEMENTES DE *Peltogyne***  
***confertiflora*: UMA EFICIENTE MATRIZ CROMATOGRÁFICA DE**  
**AFINIDADE PARA ISOLAR LECTINAS GALACTOSE-**  
**LIGANTES.**

SOBRAL-CE

2021

**FRANCISCO VALDICÉLIO FERREIRA**

**GALACTOMANANA RETICULADA DE SEMENTES DE *Peltogyne confertiflora*: UMA EFICIENTE MATRIZ DE AFINIDADE PARA ISOLAR LECTINAS GALACTOSE-LIGANTES.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Linha de pesquisa: Bioprospecção de produtos naturais ou sintéticos.

Orientador: Prof. Dr. André Luis Coelho da Silva.

Coorientador: Prof. Dr. Igor Iuco Castro da Silva

SOBRAL-CE

2021

**FRANCISCO VALDICÉLIO FERREIRA**

**GALACTOMANANA RETICULADA DE SEMENTES DE *Peltogyne confertiflora*: UMA EFICIENTE MATRIZ DE AFINIDADE PARA ISOLAR LECTINAS GALACTOSE-LIGANTES.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Linha de pesquisa: Bioprospecção de produtos naturais ou sintéticos.

Aprovada em \_\_\_\_/\_\_\_\_/2021

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. André Luís Coelho da Silva (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Prof. Dr. Igor Iuco Castro da Silva (Coorientador)  
Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Prof. Dr. Luiz Vieira da Silva Neto (Membro interno)  
Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Prof. Dr. Bartolomeu Warlene Silva de Souza (Membro externo)  
Universidade Federal do Ceará – UFC

*À Deus, por ter me sustentado até aqui e por  
permitir que este sonho se tornasse realidade  
À minha família pela força transmitida nos  
momentos mais difíceis*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me proporcionar capacidade e coragem para perseguir este objetivo; até aqui o Senhor me ajudou.

A Família que construí com minha esposa Tamires Alexandre Félix e meu filho Samuel Avelino pelo companheirismo, dedicação, carinho, consolo e afeto demonstrados durante esta caminhada.

A meus familiares, em especial meu pai Raimundo Adiodato Ferreira, minha mãe Maria Lourdes Silveira e aos meus 07 irmãos em especial Marcio Océlio Ferreira e Regilane Neila Ferreira.

Agradeço de forma especial aos membros da equipe do Laboratório de Biotecnologia Molecular (LabBMol), que sem o apoio e dedicação de todos os resultados dessa pesquisa seria impossível, meu muito obrigado.

A todos os professores que contribuíram para esta formação.

Aos colegas da turma de mestrado pelos momentos divididos.

Ao colega que compõe o Grupo de Estudos em Morfologia – GEM, Francisco Fábio Pereira de Souza, por todo o apoio e sempre me ajudar e apoiar nas horas que mais precisei eternamente grato.

Aos profissionais que compuseram a Banca Examinadora pelas contribuições, competência e estímulo.

À Universidade Federal do Ceará e o Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Bolsa CAPES-DS, código 001) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes.” (Martin Luther King)

## RESUMO

As galactomananas constituem o maior grupo de polissacarídeos com capacidade de reserva de energia do endosperma de sementes, especialmente as pertencentes à família Leguminosae, tendo grande aplicação industrial. No entanto, valorizar a bioprospecção no sentido de explorar a biodiversidade favorece o protagonismo científico e a descoberta de compostos naturais com potenciais aplicações. Neste contexto, a busca por novas matrizes cromatográficas para isolamento de proteínas torna as galactomananas atrativas e novas fontes vegetais para a obtenção dessas moléculas têm sido pesquisadas. Assim, o presente trabalho objetivou avaliar a eficiência da galactomanana reticulada de sementes de jatobá-de-brinco (*Peltogyne confertiflora*) como matriz cromatográfica de afinidade na purificação de lectinas galactose-ligantes. Inicialmente a galactomanana foi extraída das sementes de *P. confertiflora* para a caracterização físico-química, testes de reticulação e preparo das matrizes cromatográficas. Em seguida, as matrizes de galactomanana reticuladas foram usadas na purificação das lectinas jacalina, frutalina, abrina, pulchelina e ricina, posteriormente analisado a integridade, pureza, rendimento e bioatividade dessas proteínas. A galactomanana extraída apresentou um rendimento médio de 59,6 mg por grama de farinha de sementes. Além disso, a galactomanana apresentou características físico-químicas e estabilidade estrutural semelhantes as de outras galactomananas vegetais. A razão Gal/Man da galactomanana avaliada por espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foi de 1.00/1.14 e 1.00/1.09, respectivamente. A matriz de galactomanana reticulada foi capaz de isolar todas as lectinas testadas, que além de apresentarem uma integridade e pureza, também mostraram-se bioativas. Assim, pode-se concluir que as sementes *P. confertiflora* são uma excelente fonte para obtenção de galactomanana e que o potencial uso de polissacarídeo como insumo biotecnológico destinado a purificação de biomoléculas pode contribuir para valorização dos recursos naturais do semiárido brasileiro, adicionado valor agregado aos seus produtos.

**Palavras-chaves:** Polissacarídeos; *Peltogyne confertiflora*; Lectina; Matriz.

## ABSTRACT

Galactomannans constitute the largest group of polysaccharides with energy reserve capacity in the endosperm of seeds, especially those belonging to the Leguminosae family, having several industrial applications. However, valuing bioprospecting in the sense of exploring biodiversity allows the protagonist and discovery of natural compounds with potential applications. However, valuing bioprospecting in the sense of exploring biodiversity favors scientific protagonism and the discovery of natural compounds with potential applications. In this context, the search for news chromatographic matrices for protein isolation makes galactomannans attractive and new plant sources for obtaining these molecules have been researched. Thus, the present work aimed to evaluate the efficiency of reticulated galactomannan from seeds of Jatobá-de-brinco (*Peltogyne confertiflora*) as an affinity chromatographic matrix for galactose-binding lectins purification. First, galactomantan was extracted from the *P. confertiflora* seeds for physicochemical characterization, crosslinking tests and preparation of chromatographic matrices. Then, the crosslinked galactoman matrices were used in the purification of jacalin, frutalin, abrin, pulchellin and ricin lectins, later analyzed the integrity, purity, yield and bioactivity of these proteins. The extracted galactomannan showed an average yield of 59.6 mg per gram of seed flour. Furthermore, galactamannan presented physicochemical characteristics and structural stability similar to those of other plant galactomannans. The Gal/Man ratio of galactoman evaluated by <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra was 1.00/1.14 and 1.00/1.09, respectively. The cross-linked galactomannan matrix was able to isolate all tested lectins, which in addition to showing integrity and purity, were also bioactive. Finally, it can be concluded that *P. confertiflora* seeds are an excellent source for obtaining galactomannan and that the potential use of polysaccharides as a biotechnological product for the purification of biomolecules can contribute to the enhancement of natural resources in the brazilian semiarid region, adding value to your products.

**Keywords:** Polysaccharides; *Peltogyne confertiflora*; Lectin; Matrix.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figuras	Página
1 - Estrutura da galactomanana com unidades de D-manopiranosose em ligação $\beta(1-4)$ e unidades de D-galactopiranosil em ligação $\alpha(1-6)$ .	16
2 - Distribuição das substituições de galactose ao longo da cadeia principal de manana.	19
3 - Classificação das subunidades das lectinas.	27
4 - Detalhes morfológicos da <i>Peltogyne confertiflora</i> . A) Inflorescência terminal, frutos estipitados B) Frutos maduros monospermas. C) Sementes quiescentes.	32
5 - (A) SDS-PAGE 12,5% da Frutalina e da Jacalina purificadas em matriz galatomanana reticulada de sementes de <i>P. confertiflora</i> . MM: marcadores moleculares; Raia 1: Frutalina; Raia 2: Jacalina; Raia 3: Controle (Frutalina purificada em matriz comercial D-gal); Raia 4: Controle (Frutalina purificada em matriz comercial Sepharose-4B). (B) Imunodeteção da Frutalina (Raia 1) e da Jacalina (Raia 2) por <i>Western blot</i> .	58
6 - (A) SDS-PAGE 12,5% da Abrina, da Pulchellina e da Ricina purificadas em matriz galatomanana reticulada de sementes de <i>P. confertiflora</i> . MM: marcadores moleculares; Raia 1: Abrina; Raia 2: Pulchellina; Raia 3: Ricina; Raias 3 a 6: Controles (Abrina, Pulchellina e Ricina purificadas em matriz comercial Sepharose-4B). (B) Imunodeteção da Abrina (Raia 1), da Pulchellina (Raia 2) e da Ricina (Raia 3) por <i>Western blot</i> .	59
7 - Análise da atividade RNA <i>N</i> -glicosidase <i>in vitro</i> da Abrina, Pulchellina e Ricina purificadas em matriz de galactomanana reticulada de sementes de <i>P. confertiflora</i> . C1: Controle 1 (RNAr não tratado); C2: Controle 2 (RNAr tratado apenas com anilina); Raia 1: RNAr tratado com Abrina; Raia 2: RNAr tratado com Pulchellina; Raia 3: RNAr tratado com a Ricina. A seta indica o fragmento de Endo liberado e detectado após o tratamento com anilina.	63
<b>Gráficos</b>	<b>Página</b>
1 - DSC da galactomanana extraída da farinha de sementes de <i>P. confertiflora</i> . A – Transição endotérmica (mudança de fase); B – Transição exotérmica (decomposição)	50
2 - Análise termogravimétrica e sua derivada da galactomanana de sementes de <i>P. confertiflora</i> .	51
3 - Purificação das proteínas Frutalina (A), Jacalina (B), Abrina (C), Pulchalina (D) e Ricina (E) por cromatografia de afinidade em matriz de galactomanana reticulada de sementes de <i>P. confertiflora</i> . As colunas foram equilibradas e as frações não-retidas (P1) foram eluídas com o tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,6 com NaCl 150 mM. As frações retidas (P2) foram eluídas com galactose 200 mM contendo NaCl 150 mM. As cromatografias foram realizadas em coluna de 5 mL, utilizando um fluxo de 0,75 L/min coletando frações de 1,5 mL. A seta indica o início da eluição do P2	56

## LISTA DE TABELAS

Tabelas	Página
1 - Teores de umidade, proteínas, lipídeos, cinzas, carboidratos e fibras da farinha de sementes de <i>P. confertiflora</i>	46
2 - <i>Rendimento da galactomanana extraída da farinha de sementes de P. confertiflora.</i>	48
3 - Razão Galactose/manose da cadeia polimérica da galactomanana de sementes de <i>P. confertiflora</i> avaliada por RMN.	53
4 - Quantificação de proteínas nos extratos brutos totais (EBTs) das farinhas de sementes de <i>A. incisa</i> , <i>A. integrifolia</i> , <i>A. preclatorius</i> , <i>A. pulchellus</i> e <i>R. communis</i> .	55
5 - Atividade hemaglutinante das proteínas Frutalina, Jacalina, Abrina, Pulchellina e Ricina purificadas na matriz de galactomanana reticulada de sementes de <i>P. confertiflora</i> .	60

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

---

BSA	Albumina sérica bovina
SDS	Dodecil sulfato de sódio
APS	Persulfato de amônio
LabBMol	Laboratório de Biotecnologia Molecular
DBBM	Departamento de Bioquímica de Biologia Molecular
UFC	Universidade Federal do Ceará
SisGen	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
RNM	Ressonância Magnética Nuclear
Temed	Tetrametiletilenodiamina
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil- sulfato de sódio
TG	Transição Vítrea
DTG	Termogravimetria Derivada

---

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>1.1 Polissacarídeos vegetais.....</b>	<b>14</b>
<b>1.2 Galactomananas: definição, característica e aplicações.....</b>	<b>16</b>
<b>1.3 Lectinas.....</b>	<b>23</b>
<b>1.3.1 Classificação da Lectina.....</b>	<b>26</b>
<b>1.4 Uso de galactomananas como matrizes cromatográficas para o isolamento de lectinas... </b>	<b>29</b>
<b>1.5 Características da espécie <i>Peltogyne confertiflora</i> (Mart. Ex. Hayne) Benth.....</b>	<b>31</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>34</b>
<b>2.1 Objetivo geral.....</b>	<b>34</b>
<b>2.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>34</b>
<b>3 MATERIAIS.....</b>	<b>35</b>
<b>3.1 Vegetais.....</b>	<b>35</b>
<b>3.2 Biológicos.....</b>	<b>35</b>
<b>3.3 Reagentes.....</b>	<b>35</b>
<b>4 METODOLOGIA .....</b>	<b>36</b>
<b>4.1 Limpeza e processamento das sementes.....</b>	<b>36</b>
<b>4.2 Análise elementar da farinha de sementes.....</b>	<b>36</b>
<b>4.3 Extração da galactomanana da farinha de sementes.....</b>	<b>38</b>
<b>4.4 Calorimetria exploratória diferencial (DSC) da galactomanana de <i>P. confertiflora</i> .....</b>	<b>38</b>
<b>4.5 Análise Termogravimétrica (TGA) da galactomanana.....</b>	<b>39</b>
<b>4.6 Caracterização galactomanana de <i>P. confertiflora</i> por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....</b>	<b>39</b>
<b>4.7 Reticulação da galactomanana de <i>P. confertiflora</i> para a produção da matriz cromatográfica.....</b>	<b>40</b>
<b>4.8 Preparação e montagem das colunas cromatográficas com a galactomanana reticulada.</b>	<b>40</b>
<b>4.9 Extração de proteínas das farinhas de sementes de <i>Artocarpus incisa</i>, <i>Artocarpus integrifolia</i>, <i>Abrus precatorius</i>, <i>Abrus pulchellus</i> e <i>Ricinus communis</i>.....</b>	<b>40</b>

4.10 Dosagem de proteínas.....	41
4.11 Avaliação da matriz reticulada de galactomanana na purificação das lectinas galactose-ligantes.....	41
4.12 Análise da integridade e pureza das lectinas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	42
4.13. Ensaio de imunodeteção das lectinas.....	42
4.14. Avaliação da bioatividade das lectinas via ensaios de hemaglutinação.....	43
4.15. Atividade RNA N-glicosidase das quimerolectinas isoladas em matriz reticulada de galactomanana de <i>P. confertiflora</i> .....	43
4.16. Análises estatísticas.....	44
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	45
5.1 Rendimento da farinha e análise elementar.....	45
5.2 Rendimento da galactomanana extraída da farinha de sementes de <i>P. confertiflora</i> .....	48
5.3 Análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC) da galactomanana da farinha desementes de <i>P. confertiflora</i> .....	49
5.4 Análise termogravimétrica (TGA) da galactomanana de sementes de <i>P. confertiflora</i> .....	51
5.5 Caracterização galactomanana de sementes de <i>P. confertiflora</i> por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	52
5.6 Dosagem de proteínas solúveis dos extratos brutos totais (EBTs) das farinhas de sementes de <i>A. incisa</i> , <i>A. integrifolia</i> , <i>A. precatorius</i> , <i>A. pulchellus</i> e <i>R. communis</i> .....	54
5.7 Avaliação da matriz reticulada de galactomanana na purificação das lectinas galactose-ligantes.....	55
5.8 Análise da integridade, pureza e imunodeteção das lectinas purificadas na matriz de galactomanana reticulada de sementes de <i>P. confertiflora</i> .....	57
5.9 Avaliação da bioatividade das lectinas via ensaio de hemaglutinação.....	59
5.10 Atividade RNA N-glicosidase das quimerolectinas isoladas em matriz de galactomananareticulada de sementes de <i>P. confertiflora</i> .....	61
6 CONCLUSÃO.....	64
REFERENCIAS.....	65
ANEXOS.....	82

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Polissacarídeos vegetais

O Brasil se destaca pelo reino vegetal vasto e protagonista no qual seus compostos bioativos podem ser extraídos de diversos modos podendo se tornar um produto da biotecnologia, (SILVA *et al.*, 2012). Com uma das mais vastas biodiversidades no mundo, este país se apresenta com imenso potencial ainda pouco explorado, (BRASIL, 2012; KOHLHEPP, 2018; BORGES e SALES, 2018). Conforme Gurib-Fakim (2006) estima-se que apenas 0,4% das 55 mil espécies de plantas são estudadas, importante perceber também o quanto se avançou no conhecimento da flora brasileira, dado este que na atualidade acredita-se ser outro.

Diante do vasto grupo de substâncias bioativas que as plantas podem oferecer podemos citar os polímeros naturais mais conhecidos como polissacarídeos, podendo ser constituídos de diferentes tipos de monossacarídeos ou de um só tipo de monossacarídeo, e que podem ser obtidos através de algas, de animais e fungos ou via fermentação microbiológica e de exsudatos, tubérculos, frutos e sementes, no caso de plantas superiores (BUCKERIDGE *et al.*, 2000; CUNHA *et al.*, 2009).

A flora e a fauna brasileira têm ricos produtos biotecnológicos que são utilizados pela sociedade de diversas maneiras. Nossas espécies vegetais dispõem de inúmeras classes de compostos químicos que podem ser extraídos e utilizados como benefícios holísticos. Dentre os vários benefícios os polissacarídeos de destacam por serem polímeros naturais que podem ser obtidos através de extração de plantas, algas, animais, fungos ou via fermentação microbiológica, mostrando-se com uma ampla gama de aplicações, especialmente nas áreas alimentícia, biomédica, farmacêutica e de cosméticos (CUNHA; DE PAULA; FEITOSA, 2009).

Em relação aos polissacarídeos extraídos das sementes estes dividem-se em reservas ou estruturais. Na indústria os de reservas são os mais utilizados, sendo eles as galactomananas, xiloglucanas, glucanas e mananas, à nível de aplicações industriais se destacam as galactomananas e xiloglucanas (STEPHEN *et al.*, 2006; EDWARDS *et al.*, 1989).

Obtidas principalmente de endosperma de plantas destacam-se as galactomananas, com sua estrutura principal de unidades de  $\alpha$ -D-manose, com

substituição de unidades simples de  $\alpha$ -D-galactose na posição do C-6 da manose. Em relação a maior utilização industrial e no que diz respeito ao uso em alimentos, as mais utilizadas são a goma guar extraídas de (*Cyamopsis tetragonolobus*) e a alfarroba que é extraída da (*Ceratonia siliqua*). Já as xiloglucanas de reserva mostram uma estrutura química que consiste em uma cadeia principal celulósica de unidades de D-glucose, as quais podem estar substituídas em O-6 por unidades  $\alpha$ -D-xilopirranose; essas últimas, por sua vez podem estar substituídas por unidades de  $\beta$ -D-galactopirranose (STEPHEN *et al.*, 2006; EDWARDS *et al.*, 1989).

Sobre a vasta gama de possibilidades de extração de polissacarídeos podemos destacar também as algas vermelhas e as pardas das quais são extraídos os polissacarídeos mais utilizados na indústria dentre eles as agaranas e as carragenanas as quais se diferenciam por possuírem a unidade na forma de  $\alpha$ -D-galactose. As carragenanas são encontradas em espécies como: *Soliera*, *Eucheuma*, *Maristiella* e *Callophucis*, e as agaranas em espécies como: *Gracilaria*, *Gelidium* e *Pterocladias*. Destacam-se também os alginatos extraídos de algas pardas de espécies como: *Macrocystis*, *Ascophyllum*, *Laminaria*, *Ecklonia* e *Sargassum*. (STEPHEN *et al.*, 2006; da CUNHA, de PÁDUA e FEITOSA., 2009).

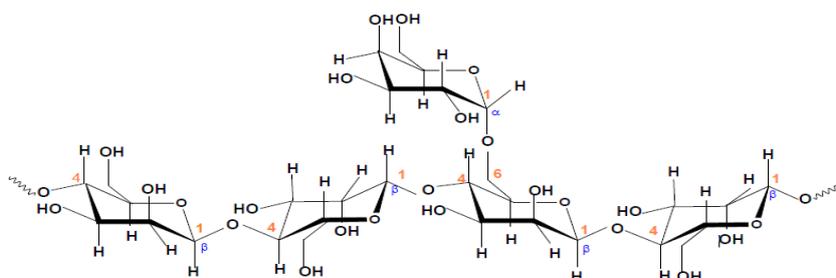
O uso destes na indústria alimentícia se sobressaem sendo utilizados principalmente como estabilizante e espessante (BRESOLIN *et al.*, 1999). Os polissacarídeos de algas são empregados como agentes gelificantes (SUTHERLAND, I. W., 2005). Gomas de sementes e de exsudatos, além de carboximetilcelulose (CMC) e metilcelulose, são utilizadas como retentor de umidade. Goma arábica serve, também, para encapsular aromas na indústria alimentícia. Na área biológica eles são aplicados em engenharia de tecidos, imobilização de enzimas, biossensores, como veículo de liberação de fármaco dentre outras aplicações. Atividades biológicas como: antivirais, antitumorais, antioxidantes, anticoagulantes e antitrombóticas também vêm sendo investigadas para polissacarídeos extraídos de diversas fontes. (LI, HEIN, WANG, 2008).

## 1.2 Galactomananas: definição, características e aplicações.

Em 1897 iniciaram os estudos sobre a natureza química das galactomananas por Effront, quando o mesmo investigou um carboidrato presente na mucilagem de alfarroba (*Ceratonia siliqua*). Dois anos após, Bourquelot e Hérissé (1899), demonstraram que essa mucilagem era constituída de 83,5 % de D-manose e 16,5 % de D-galactose, cuja proporção galactose/manose de 5,0:1 está próxima aos valores atualmente determinados. A partir do desenvolvimento de outras técnicas, mais de 70 galactomananas tiveram essa proporção determinada, sendo encontradas variações nas proporções de galactose/manose de 1:1 para galactomanana de *Medicago sativa* (COURTOIS *et al.*, 1958) até 5,26:1 para a galactomanana de *Sophora japônica* (KOOIMAN, 1971), dados estes confirmados por Smirnova e colaboradores (2003).

Os polissacarídeos ditos galactomananas (Figura 1) são heterogêneos derivados de endospermas de sementes compostos por um esqueleto em cadeias poliméricas de resíduos  $\beta$ -(1-4)-D-manana com um  $\alpha$ -(1-6) ligado ao ramo de D-galactose, obtidos a partir de fontes microbianas, e principalmente de plantas, onde desempenham função de reserva e cuja principal fonte é o endosperma das sementes com destaque para os membros da família Leguminosae (DEA; MORRINSON, 1975; CERQUEIRA *et al.*, 2011). Eles diferem um do outro pela relação galactose/manose. Estas gomas são principalmente obtidas a partir do endosperma de sementes dicotiledóneas de diferentes plantas, particularmente das leguminosas e são classificadas como gomas originárias de sementes. Esta família possui espécies espalhadas por todo o mundo, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais, que variam de árvores emergentes até ervas diminutas e efêmeras (LEWIS *et al.*, 2005).

Figura 1 – Estrutura da galactomanana com unidades de D-manopiranosose em ligação  $\beta$ (1-4) e unidades de D-galactopiranosil em ligação  $\alpha$ (1-6).



Fonte: Adaptado de Sittikijyothin; Torres; Gonçalves (2005).

As composições e propriedades físico-química e sua conformação podem variar significativamente de acordo com as fontes vegetais, método de produção e os ambientes em crescimento (KÖK, HILL e MITCHELL, 1999).

Dependendo da fonte de galactomanana, a relação entre galactose e manose varia tipicamente entre 1,1 e 5,0 (SRIVASTAVA e KAPOOR, 2005). Essa variação na estrutura e o posicionamento dos monossacarídeos na cadeia polimérica, pode causar mudanças significativas além da solubilidade, densidade, viscosidade e algumas interações entre alguns polissacarídeos (PRAJAPATI *et al.*, 2013).

A razão galactose/manose, peso molecular médio, estrutura fina e viscosidade intrínseca são os parâmetros mais importantes utilizados na definição da natureza de uma galactomanana (CERQUEIRA *et al.*, 2011a).

A solubilidade em água é afetada pelo grau de substituição de galactose ao longo da cadeia principal. Como exemplo podemos corroborar com (DEA; MORRISON, 1975), no qual afirma que a galactomanana da goma alfarroba (*Ceratonia siliqua*) com razão galactose/manose de 3,5:1 apresenta baixa solubilidade em água à temperatura ambiente quando se compara a galactomanana de goma guar (*Cyamopsis tetragonolobus*) no qual foi identificada com uma razão galactose/manose de 1,8:1.

Já em relação a viscosidade, pode ser determinada usando um viscosímetro capilar, aplicando as equações de Huggins e Kramer (CERQUEIRA *et al.*, 2009c; SITTIKIYOTHIN; TORRES; GONÇALVES, 2005).

Gliko-kabir *et al.*, (2000), enfatizam que as galactomananas dão origem a soluções aquosas de elevada viscosidade, mesmo a baixas concentrações (0,5 a 1%) fazendo com o que as torna utais e comerciáveis principalmente como agentes espessantes na indústria de alimentos e como veículo para fins de liberação oral controlada de fármacos. A galactomanana forma dispersão coloidal viscosa quando hidratado em água, podendo ser utilizado como um construtor de viscosidade e ligante de água em muitas indústrias, como têxtil, alimentos, papel, petróleo, mineração, explosivos e produtos farmacêuticos (PRAJAPATI *et al.*, 2013).

Além disso o comportamento sinérgico de todas as propriedades da galactomanana pode nos proporcionar importantes aplicações na indústria, podendo ser

utilizado como flocculantes e inibidores sinérgicos e em indústrias alimentícias, farmacêuticas, cosméticos e têxteis (MONTEIRO, 2009).

A origem das plantas são fatores que determinam a razão molar de galactose para manose, normalmente podem ser demonstrados como 1,0: 1,0-1,1 para as gomas de feno-grego, 1,0: 1.6–1.8 para as gomas do tipo guar, 1.0: 3.0 para gomas do tipo tara e 1.0: 3.9 4.0 para gomas de alfarroba. Observa-se que a solubilidade das galactomananas aumenta com o grau de substituição de galactosil: o feno-grego e a goma de guar são prontamente dissolvidos em água fria, porém o aquecimento é necessário para solubilizar razoavelmente a goma de alfarroba na água (PRAJAPATI *et al.*, 2013).

As galactomananas como goma guar são solúveis em água e exibem uma menor tendência para formar géis como resultado de interações sinérgicas, quando comparados com galactomananas com uma menor relação galactose/manose (como goma de alfarroba). A maior solubilidade da goma guar tem sido atribuída à presença de um maior número de cadeias laterais, que mantêm as principais cadeias manose longe o suficiente para prevenir interações intermoleculares efetivas. Por outro lado, as galactomananas com menos cadeias laterais (maior relação galactose/manose) podem interagir com outros polissacarídeos, devido aos seus longos blocos de unidades de manose não substituídas (SRIVASTAVA e KAPOOR, 2005).

Portanto, pode-se concluir que as galactomananas são ricas em grupos hidroxila; isso permite que eles se liguem e absorvam água e sejam ricas em grupos cis-OH, permitindo a agregação de cadeia via pontes de hidrogênio, de modo que a hidratação se torna mais complexa se a interligação cruzada ocorrer. Por substituição com galactose, a natureza estabelece impedimento estérico entre as moléculas e, assim, aumenta a solubilidade em água (PRAJAPATI *et al.*, 2013).

Quando se fala de estudos que envolvem a extração de galactomananas incluem, além do cálculo dos rendimentos de extração e de galactomanana solúvel em água, a caracterização de suas propriedades físico-químicas, com isso Cerqueira *et al.*, (2009) afirma que o peso molecular médio da galactomanana está na faixa de 1 a  $2 \times 10^6$  Da.

Esse peso molecular pode ser determinado por cromatografia de exclusão por tamanho. A distribuição de galactose ao longo da cadeia de manana pode ser caracterizada por espectroscopia RMN  $^{13}\text{C}$  ou por métodos enzimáticos capazes de

degradar as regiões não substituídas de galactomanana (CERQUEIRA *et al.*, 2009c; CUNHA *et al.*, 2009; DAKIA *et al.*, 2008.; VENDRUSCOLO *et al.*, 2009).

O peso molecular médio, conformação e viscosidade intrínseca são os parâmetros mais importantes que definem a natureza de uma galactomanana e a relação galactose e manose (M / G) essa relação entre galactose e manose, o grau de substituição e o grau de polimerização afetam as propriedades de filmes comestíveis, como mostrado por Mikkonen *et al.* (2007).

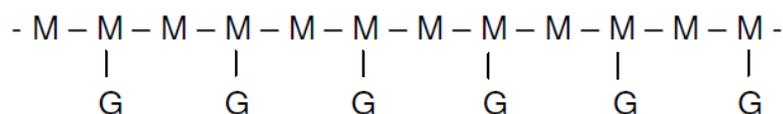
A utilização de galactomananas como caráter taxonômico tem sido proposta por muitos autores, levando em consideração o rendimento em galactomanana extraída do endosperma das sementes e de acordo com a família, assim como a proporção entre os resíduos de manose e galactose na molécula e os teores destes compostos nas sementes (DEA; MORRISON, 1975; BUCKERIDGE *et al.*, 1995; ROSA *et al.*, 2009).

Em geral, espécies pertencendo à subfamília Caesalpinioideae tem como características, baixos graus de substituição de galactose sendo esta, a mais primitiva das três subfamílias, enquanto galactomananas com percentuais médios a alto de galactose pertenceriam às subfamílias Faboideae e Mimosoideae, que são mais recentes. As sementes de Caesalpinioideae são as que encontram-se com altos rendimentos em galactomanana (REID; EDWARDS, 1995).

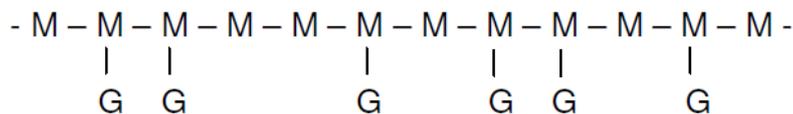
As galactomananas como importantes indicadores taxonômicos são de grande importância quando se leva em consideração que a família Leguminosae é a segunda família dentro da classe das dicotiledôneas e a primeira em importância econômica. A partir disso alguns autores propuseram três possibilidades para a distribuição das substituições de galactose ao longo da cadeia principal de manana (Figura 2), ou seja, para a estrutura fina da molécula (DEA e MORRISON., 1975).

Figura 2 – Distribuição das substituições de galactose ao longo da cadeia principal de manana.

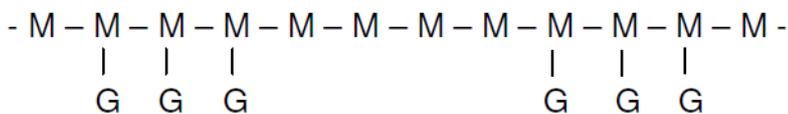
1) Arranjo regular



2) Arranjo irregular



### 3) Arranjo em blocos



Fonte: DEA e MORRISON (1975). M: representação das unidades de manose da cadeia principal em ligação  $\beta$  (1-4). G: representação da substituição por unidade de galactose em  $\alpha$  (1-6).

Além de proporcionar diferenças na densidade e na viscosidade das soluções, a proporção e distribuição das unidades de galactose tem papel fundamental na solubilidade das galactomananas, visto que, à medida que a razão galactose-manose diminui, a solubilidade aumenta. Caso não existam ramificações com o monossacarídeo galactose, tem-se uma manana pura ou verdadeira, ou seja, um polissacarídeo constituído de pelo menos 85 a 95% de unidades de manose, cuja distribuição das cadeias irá proporcionar interações intermoleculares do tipo ligação de hidrogênio entre as hidroxilas *cis* da manose, levando à formação de agregados completamente insolúveis em água (ASPINALL, 1959; GOYCOOLEA; MORRIS; GIDLEY, 1995; STEPHEN, 1983).

A presença de unidades de galactose produz cadeias ramificadas e realiza o impedimento estérico entre as ligações de hidrogênio intermoleculares, minimizando a formação de agregados. Por outro lado, galactomananas com poucas cadeias laterais (maior razão galactose/manose) podem interagir melhor com outros polissacarídeos devido às longas regiões não substituídas (SRIVASTAVA; KAPOOR, 2005). Em geral, as galactomananas menos substituídas são obtidas de sementes de espécies com mais características plesiomórficas (Caesalpinioideae), ou seja, com caracteres de estado ancestral, enquanto as moderadas ou altamente substituídas, daquelas com mais caracteres apomórficos (Faboideae e Mimosoideae) designado para definir uma característica mais recente derivada de uma característica primitiva de uma espécie ancestral (DOYLE, 1997).

Sobre as aplicações das galactomananas, estas são amplamente utilizados em diversos espaços, inclusive na indústria devido às suas propriedades funcionais adequadas, tais como capacidades de espessamento, ligação e estabilização. Estas

propriedades são conduzidas pelo comportamento reológico das galactomananas em uma fase aquosa e também pela ligação intermolecular em certas condições. As moléculas de galactomanana hidratada ocupam um grande volume hidrodinâmico em solução aquosa e controlam o comportamento reológico de toda a solução. São agentes não-gelificantes, enquanto mostram interações sinérgicas com outros polissacarídeos, como agar, xantana, carragenana e goma de mostarda amarela, formando uma rede de gel tridimensional em condições apropriadas. (FERNANDER e DOUBLIER, 1991; FERNANDES, GONCALVES e DOUBLIER, 1994; SCHORSCH, GARNIER e DOUBLIER, 1997).

Reverendo as aplicações técnicas, chama-se atenção para o comportamento químico das diferentes galactomananas. Existem aplicações que se beneficiam da excelente formação de viscosidade de algumas galactomananas ou de seus derivados e há também aplicações que se baseiam na absorção de água ou da formação de pontes de hidrogênio, bem como da formação de gel (CUI, ESKIN, BILIADERIS e MAZZA, 1995).

As três principais fontes de galactomanana de importância comercial a nível industrial sendo utilizadas comercialmente em alimentos ou não são: a goma guar (*Cyamopsis tetragonobus*, razão galactose/manose 1,6), a goma de tara (*Caesalpineia spinosa*, razão galactose/manose 3,3) e a goma de alfarroba (*Ceratonia siliqua*, razão galactose/manose 3,75), (DEA; MORRISON, 1975; GIDLEY; REID, 2006, DAKIA *et al.*, 2008). No entanto, as tendências da indústria exigem a introdução de fontes alternativas de gomas de semente e, portanto, é importante procurar por tais fontes renováveis alternativas (JOSHI e KAPOOR, 2003). Em alguns estudos, as galactomananas têm sido usadas em misturas binárias com outros polissacarídeos, como goma xantana, ágar e k-carragenina, para formar géis com novas propriedades (VENDRUSCOLO *et al.*, 2005; BRESOLIN *et al.*, 1999; PINHEIRO *et al.*, 2011). Com isto podemos observar que as galactomananas podem frequentemente ser usadas em diferentes formas para consumo humano.

Percebe-se que essa variedade de propriedades físico-químicas torna esse polissacarídeo um material bastante versátil, utilizado pelo homem de inúmeras formas, dentre elas, na indústria farmacêutica, cosmética, de papel, alimentícia, na biomedicina, entre outras (SRIVASTAVA; KAPOOR, 2005; VIEIRA *et al.*, 2007).

A ampla aplicação das galactomananas reflete em um grande número de diferentes características funcionais, incluindo alta viscosidade da solução, estabilização de sistemas congelados e formação mista de gel com outros polissacarídeos e proteínas isto sendo particularmente uma excelente fonte para a indústria alimentícia, sobre as principais aplicações das galactomananas, estas podem ser utilizadas em produtos lácteos, géis de água à base de frutas, produtos em pó, panificação, produtos dietéticos, branqueadores de café, formulações de leite infantil, temperos, molhos, sopas, carnes enlatadas, alimentos congelados e curados. (PRAJAPATI *et al.*, 2013).

Certo de todas as funcionalidades já citadas podemos ver que as aplicações das galactomananas dependem mais ou menos da sua capacidade de formar pontes de hidrogênio, uma propriedade que é contrária ao efeito estérico dos grupos laterais da galactose, que ajudam a alcançar uma maior solubilidade. Durante os últimos anos, muitas espécies de plantas foram investigadas quanto ao seu conteúdo de galactomanana para melhorar suas propriedades por modificação química e aumentar sua utilização (PRAJAPATI *et al.*, 2013).

As gomas impuras se destacam quando se fala da maioria das galactomananas utilizadas na tecnologia de fármacos e cosméticos. Em muitos casos, as galactomananas têm sido usadas em misturas binárias com outros polissacarídeos, com a finalidade de avaliar as novas características e propriedades dos géis formados (BRESOLIN *et al.*, 1999; FERNANDES; GONÇALVES; DOUBLIER, 1999). Como exemplo podemos citar, Bresolin *et al.*, (1997), pois observaram o efeito sinérgico entre a galactomanana de *M. scabrella* e a xantana, enquanto que as propriedades reológicas de gelificação foram estudadas por Amaral (1998). McCleary *et al.*, (1981) realizaram análises reológicas de xantana e galactomanana, demonstrando que essa interação diminui com o aumento do grau de substituição das galactomananas. Lucyszyn *et al.*, (2006), por sua vez, aplicaram géis de misturas de galactomananas e ágar para cultivo de células vegetais. Outro gel binário amplamente estudado é constituído por k-carragenana e galactomanana. Gonçalves *et al.*, (1997) observaram que a adição de galactomanana melhorou a qualidade do gel quando comparado ao obtido pela k-carragenana isolada.

Com tudo isso percebe-se que existe uma tendência mundial relacionada às pesquisas desenvolvidas sobre a purificação, a caracterização e a utilização de galactomananas, indicando a grande necessidade de encontrar sementes que constituam

novas fontes alternativas para extração deste polissacarídeo, especialmente para produção industrial. Em especial na América Latina, onde ainda existem espécies que foram pouco estudadas fazendo com que haja uma necessidade e a importância de encontrar possíveis fontes de extração de galactomananas no nosso bioma (AZERO; ANDRADE, 2002; CUNHA; PAULA; FEITOSA, 2009).

O Brasil tem um rico e diversificado bioma que apresentam fontes de espécies diversificadas para a extração de galactomananas a partir de sementes que poderiam suprir essa demanda de importação deste polissacarídeo não necessitando adquirir de outros países, com isso poderíamos além de incluir a melhoria do valor agregado pela utilização de sementes sem capacidade germinativa, enriquecer nossa região com nosso produto nativo (VALENGA, 2007; MENEGUIN, 2012; ALBUQUERQUE, 2013).

### **1.3 Lectinas**

De acordo com Goldstein *et. al*, (1980), a primeira proposta de definição de lectinas, foi baseada em sua especificidade por açúcar e inibição da reação de aglutinação, estas seriam proteínas ou glicoproteínas ligantes a carboidratos de origem não imune que aglutinam células e/ou precipitam glicoconjugados.

No entanto essa nomenclatura mostra-se excludente a algumas lectinas, pois só contempla aquelas com domínios múltiplos de ligação a carboidratos. Com isto no ano de 1983, Kocourek e Horejsi propuseram a extensão da definição de lectinas de forma que as toxinas com baixa atividade hemaglutinante, porém com genuína cadeia lectínica fossem incluídas, porém com a observação de que as lectinas poderiam ter uma subunidade de função diferente, essa definição foi também considerada restrita.

Em 1988, Barondes propôs outra definição de que as lectinas seriam proteínas ligantes a carboidratos que não anticorpos ou enzimas, sendo que esta classificação também se excluiria devido as RIPs Tipo 2 e as Quitinases de classe I que possuem domínios ligantes a carboidratos. Visto todas essas nuances, pesquisadores como, Peumans e Van Damme propuseram no ano de 1995 que as lectinas são proteínas de origem não imune que possuem pelo menos um domínio não catalítico ligante reversivelmente a um mono ou oligossacarídeo específico.

Em 1990, Sharon e Lis propuseram uma nova definição destacando que todas as proteínas de plantas que possuem no mínimo um domínio não catalítico que se

liga reversivelmente a mono ou oligossacarídeos específicos são consideradas lectinas, pensamento este que corrobora com Peumans e Van Damme (1995). Assim, foi possível incluir um número grande de proteínas com diferentes capacidades de aglutinação e com propriedades de precipitar glicoconjugados, levando seus autores a subdividirem as lectinas em três classes que serão descritas posteriormente.

Em relação a sua distribuição as lectinas estão amplamente disponíveis na natureza, podendo ser encontradas em todas as classes e famílias dos organismos vivos, desde microrganismos, até animais vertebrados e invertebrados e plantas (SHARON e LIS, 1989). Nas plantas, as lectinas têm sido relatada e purificada a partir das folhas, frutos, raízes, tubérculos, rizomas, bulbos, cascas, caules e predominantemente de sementes de muitas plantas, onde elas constituem até 10% do conteúdo total de proteínas de extratos de sementes maduras (PEUMANS e VAN DAMME, 1995; BOLINI e CHRISPEELS, 1978; WANG e NG, 1998; PEUMANS *et al.*, 1985; VAN DAMME *et al.*, 1987; POVINELI, K.L.; FINARDI FILHO, F, 2002). A maioria das lectinas de sementes maduras de leguminosas estão localizadas nos cotilédones que funcionam como reserva de nutrientes, usados durante sua germinação.

Pesquisas iniciais com lectinas vegetais apontam como protagonismo as proteínas de defesa contra patógenos e consumidores (CHRISPEELS, M.; RAIKHEL, N., 1991), hipótese que ganhou força em decorrência de que a maior parte das lectinas caracterizadas até então não apresentavam potenciais receptores naturalmente presentes nas plantas.

Muitas lectinas se reconhecem e interagem com glicoconjugados situados nas paredes celulares de fungos e bactérias, no trato intestinal de insetos e mamíferos herbívoros e no exoesqueleto de invertebrados. Suas características físico-químicas e estruturais, que conferem à maioria das lectinas vegetais estabilidade em grandes faixas de pH e temperatura e resistência à digestão por proteólises em animais embasam a função de defesa dessa classe de proteínas (VAN DAMME e PEUMANS, 1995). Além disso, alguns tipos de lectinas são produtos de genes induzíveis e expressas em situações de estresse da planta, como a lectina específica para manose obtida através de exemplares e arroz (*Oryza sativa*) submetido a estresse salino em pesquisa realizada por Zhang *et al.*, (2000).

As suas diversas propriedades, tais como alta estabilidade e diferentes especificidades, as lectinas se tornaram proveitosas ferramentas no campo da pesquisa biológica tais como biologia celular, engenharia genética, imunologia, estudo do câncer, etc. (BENEVIDES *et al.*, 2001). Moreira (1998), também demonstra que nas áreas da histoquímica, citoquímica e na agricultura têm tido boas perspectivas de seu uso no combate a predadores. Sharon e Lis (2001) e Ferreira (2001) também observaram que as lectinas mostraram ainda ser ferramentas inestimáveis na investigação funcional e estrutural de carboidratos complexos, especialmente glicoproteínas, e para a avaliação de mudanças estruturais que ocorrem na superfície celular durante processos patológicos e fisiológicos, como na diferenciação celular no caso de células cancerígenas.

Contudo e por serem capazes de reconhecer e ligar-se de forma específica a células que apresentam um padrão de glicosilação diferenciado, estas têm sido utilizadas para diagnóstico precoce e acompanhamento de terapias como nos casos de câncer (NANGIA-MAKKER *et al.*, 2002; MILHOME, 2003; BASU *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2000; TIMOSHENKO *et al.*, 1996; BIES *et al.*, 2004; SUMI *et al.*, 2001). Karasaki e colaboradores (2001) demonstraram e observaram que uma lectina extraída de *Allium sativum*-L reduziu fortemente o crescimento e síntese de DNA em células de tumor humano, numa relação tempo e dose dependentes. Além disso, esta lectina induziu apoptose em células à baixa concentração, mostrando que tem grande potencial de diferenciação e mudança celular.

Por reconhecerem proteínas e carboidratos, as lectinas possuem uma importância primordial em muitos processos biológicos (LORIS *et al.*, 1998; PLÁ *et al.*, 2003), podendo ser utilizadas, por exemplo, como marcadores celulares seletivos. Em 2005, Athamna e colaboradores desenvolveram uma técnica rápida e barata de identificar espécies de micro bactérias através do método por aglutinação com lectinas.

Balzarini e colaboradores (2004 e 2005) observaram e consideraram efeitos preventivos de lectinas contra infecção pelo vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). Já Wang e colaboradores (2005) isolaram uma lectina galactose específica de um poliqueta marinho (*Chaetopterus variopedatus*) que apresentou atividade anti-HIV em células hospedeiras. Em estudos realizados, pesquisadores também observaram que a utilização de lectinas como marcadores histoquímicos no qual propuseram um modelo

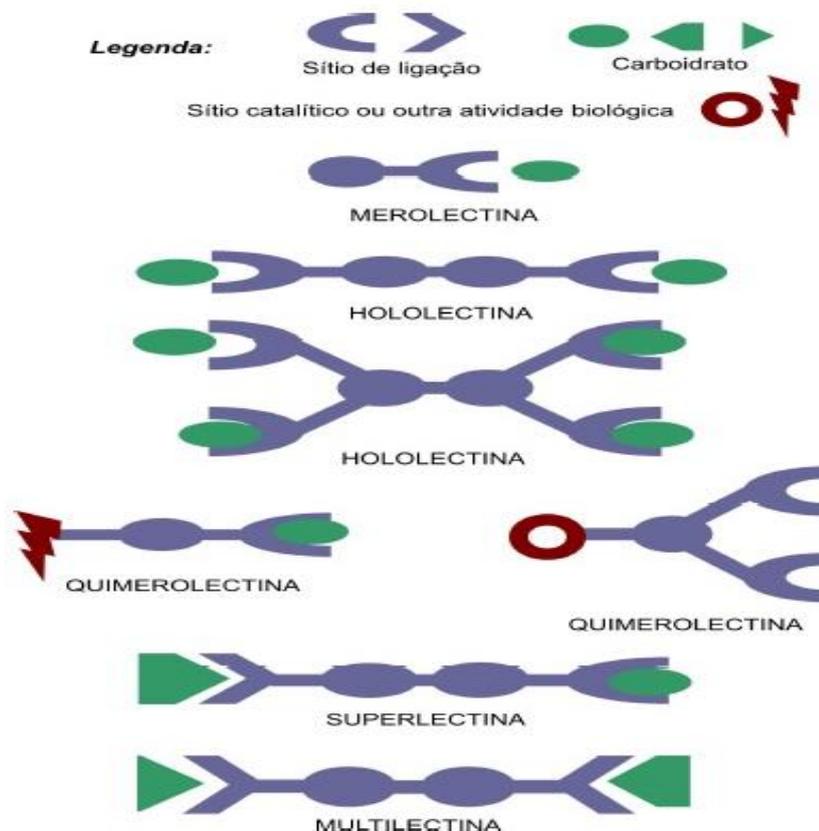
para teste de produtos cosméticos e tratamentos de doenças de pele *in vitro*, baseados nas distribuições de glicanos nas células epiteliais e sua interação com a Concanavalina A (Con A) (LABSKY, *et al.*, 2003). A partir disso e de muitas outras pesquisas já citadas e realizadas a nível mundial (quando você fala de pesquisas, inserir REFERÊNCIAS), observa-se amplo potencial na utilização de lectinas seja na área da saúde e indústria, tornando estas de suma importância como um produto biotecnológico.

### **1.3.1 Classificação da lectinas**

As lectinas são grupos de proteínas presentes em vários organismos vivos, dentre eles os vegetais, e que estão constantemente sendo estudadas por terem altas taxas de expressão em plantas e se caracterizar pela ação sobre outros organismos vivos, tem ganhado grande importância apesar de um pouco mais de um século de seu descobrimento (POVINELE, FINARDI FILHO, 2002).

Em 1998, Peumans e Van Damme propuseram um sistema de classificação para lectinas vegetais com uma base estrutural composto por quatro categorias: merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas. No ano de 2002 essa revisão foi ampliada por Monteiro-Moreira no qual incluiu-se mais um grupo denominado multilectinas (Figura3) (PEUMANS *et al.*, 2001).

Figura 3 - Classificação das subunidades das lectinas.



Fonte: Crisóstomo (2008).

### Merolectinas

São proteínas que possuem apenas um único domínio de interação com carboidratos e não possuem a capacidade de oligomerização, não sendo capazes de aglutinar células e nem precipitar glicoconjugados. Em decorrência dessa característica estrutural, essa categoria de lectina não possui as propriedades de precipitar glicoconjugados ou de aglutinar células. Como exemplo, a gastrodianina que é uma merolectina, específica para manose e o principal componente da fração proteica do corno da orquídea *Gastrodia elata*, (CRISÓSTOMO, 2008.; PEREIRA, 2013). Wang, *et al.*, (2001) relataram que a gastrodianina auxilia no controle do crescimento das hifas na espécie *Armillaria mellea*, cuja associação com os cormos de *G. elata* é essencial para completar o ciclo de vida da planta, possuindo também ação antifúngica, (WANG *et al.*, 2001). Outro exemplo clássico são as proteínas manose-ligantes de orquídeas e a

heveína uma proteína quintinha ligante encontrada no látex de seringueira (PEUMANS e VAN DAMME, 1995; VAN PARIJS *et al.*, 1991).

### **Hololectinas**

São proteínas que possuem pelo menos dois domínios estruturalmente iguais de reconhecimento para carboidratos. Portanto, São capazes de precipitar glicoconjugados e aglutinar células, e constituem o grupo mais numeroso de lectinas vegetais. Um clássico exemplo são as lectinas da subtribo Diocleinae conhecidas como ConA-Like (CAVADA *et al.*, 2001). A ConA é uma hololectina homotetramérica isolada de *Canavalia ensiformis* e uma das lectinas mais bem caracterizadas e estudadas. A ConA é também conhecida por suas propriedades inseticidas (FITCHES *et al.*, 2001), bactericidas (DOYLE, R. J.; BIRDSELL, D. C., 1972), anticâncer (BECKER, F. F.; SHURGIN, A., 1975) e antivirais (ITO, M.; BARRON, A. L., 1974). Com isto entende-se que este grupo compreende todas as lectinas, que tem múltiplos sítios de ligação e, em função dessas características, são capazes de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados. Tem-se observado que a maioria das lectinas de plantas conhecidas são hololectinas, por isso comportam-se como hemaglutininas.

### **Superlectinas**

São semelhantes e consideradas uma classe especial de hololectinas, são compostas por dois ou mais domínios de interação com carboidratos que se diferem estruturalmente e reconhecem açúcares estruturalmente distintos. Uma das lectinas da tulipa, a TxLCI, possui um sítio específico para manose e outro específico para N-acetilgalactosamina (GalNAc), possuindo ação mitógena (estimula a proliferação celular) (VAN DAMME *et al.*, 1996). De acordo com Van Damme e colaboradores (1998), essas lectinas vegetais podem ainda ser classificadas em sete famílias: A) Lectinas de leguminosas; B) Lectinas de monocotiledôneas ligantes a manose; C) Lectinas ligantes a quitina; D) RIPs tipo 2; E) Lectinas relacionadas a jacalina; F) Lectinas relacionadas a amarantina e G) Lectinas de floema de Curcubitaceae. Esta classificação baseia-se em características estruturais e de afinidade a carboidratos apresentadas por essas proteínas.

## Quimerolectinas

As quimerolectinas são proteínas que, além do domínio ligante a carboidrato, possuem um outro domínio não relacionado com este. O segundo domínio pode ter uma atividade catalítica ou uma outra atividade biológica bem definida agindo independentemente do domínio de ligantes de carboidratos. Em função do número de sítios de ligações a açúcares, as quimerolectinas agem como merolectinas ou hololectinas (PEUMANS e VAN DAMME, 1995). O principal exemplo desta classe de lectinas é a Ricina, uma RIP do tipo 2 isolada de *Ricinus communis*, pioneira nos estudos da lectinologia (SHARON & LIS, 2004). As RIPs tipo 2 e as quitinases tipo I de plantas, exemplificam, respectivamente, os dois casos citados. Um outro exemplo de quimerolectinas é uma das lectinas de sabugueiro (*Sambucus nigra*), SNA-I, que também pertence a classe das RIPs (SHAHIDI-NOGHABI *et al.*, 2011). Também é importante destacar a quimerolectina isolada de *Parkia platycephala* (denominada PPL-2) que apresenta um domínio quitinásico além do domínio lectínico (CAVADA *et al.*, 2006).

## Multilectinas

Consistem em proteínas com dois domínios ligantes a carboidratos que são idênticos ou homólogos, entretanto reconhecem açúcares estruturalmente não relacionados, ou seja, têm especificidade múltipla. É o caso da jacalina (lectina de sementes de *Artocarpus integrifolia* (MOREIRA e AINOUS, 1981) e da frutalina (lectina de sementes de *Artocarpus incisa* (MOREIRA *et al.*, 1998) que ligam tanto D-galactose como D-manose.

### 1.4 Uso de galactomananas como matrizes cromatográficas para o isolamento de lectinas

Cromatografia de afinidade é uma técnica usada para separar compostos, como por exemplo algumas proteínas, que tem a capacidade de se ligar não covalentemente e reversivelmente a moléculas específicas conhecidas como ligantes (ROMERO *et al.*, 2017).

Esse método se difere das técnicas clássicas de cromatografia, já que uma proteína pode ser separada com base em uma única propriedade bioquímica. Em cromatografia de afinidade, o ligante está ligado covalentemente a matriz, que deve ser quimicamente inerte, porosa e além ter uma variedade de grupos funcionais adequados

para acoplamento com ligantes diferentes. Várias matrizes e ligantes são usados em cromatografia de afinidade, dependendo da proteína que se quer obter e ser purificada (VOET e VOET, 1995).

Em geral, as lectinas possuem propriedades bioquímicas e de ligação, que são muito convenientes para sua purificação por cromatografia de afinidade utilizando carboidratos. Qualquer fonte de interesse pode ser selecionada para o isolamento de lectinas, podendo estas ser de seres humanos, animais, plantas, fungos e microrganismos, incluindo vírus. Muitos métodos podem ser utilizados, dependendo das características mecânicas do tecido de origem, como por exemplo a homogeneização por ruptura mecânica ou por lise (VOET e VOET, 1995).

Dentre os tipos de cromatografias aplicadas a purificação de proteínas, a cromatografia de afinidade baseia-se nas propriedades que certas proteínas possuem de se associarem seletivamente a moléculas específicas, frequentemente denominadas de ligantes. Uma característica das proteínas é sua habilidade em estabelecer ligações fortes, embora reversíveis, com seus ligantes. Assim, essa técnica torna possível o isolamento e purificação de proteínas baseada em suas propriedades biológicas (ROMERO *et al.*, 2017).

Dessa forma, proteínas galactose ligantes de *Abrus precatorius* e *Artocarpus integrifolia* foram isoladas e purificadas em matriz de afinidade a partir de guar comercial e de galactomananas de *Adenantha pavonina* e *Parkinsonia aculeata* (GARROS-ROSA *et al.*, 2006). Lectinas de *Artocarpus. incisa*, *Ricinus communis*, *Abrus precatorius* e *Artocarpus integrifolia* também foram isoladas em matriz de galactomanana proveniente de *Caesalpinia pulcherrima* (BRAGA *et al.*, 2011). Também há relatos na literatura de uma matriz de goma de sementes de *Leucaena leucocephala* que foi igualmente preparada para o isolamento de proteínas galactose-específicas de *Trichosanthes anguina* (SESHAGIRIRAO, LEELAVATHI e SASIDHAR, 2005).

Alguns autores descrevem seu isolamento por cromatografia de afinidade a partir da utilização das lectinas na captura de outra, por exemplo, a ConA é frequentemente imobilizada para isolar outras lectinas (ABSAR *et al.*, 2005.; CHARUNGCHITRAK *et al.*, 2011; KONKUMNERD *et al.*, 2010; PETNUAL *et al.*, 2010; YAN *et al.*, 2010).

Além disso, pode-se trabalhar com partículas ferromagnéticas com polissacarídeo imobilizado preparados para o isolamento de lectinas (PORTER *et al.*, 1998). As propriedades magnéticas das partículas favorecem a lavagem das impurezas utilizando um campo magnético, e os açúcares são utilizados para libertar as lectinas e recuperar as partículas (ANGELI *et al.*, 2009; KAVUNJA *et al.*, 2015).

Che *et al.*, (2011), desenvolveram um novo método para a purificação cromatográfica de afinidade de lectinas que é com a utilização de membranas com nanofibras glicosiladas, no qual, uma membrana de afinidade com glicose imobilizada mostrou forte e reversível capacidade para isolar lectinas.

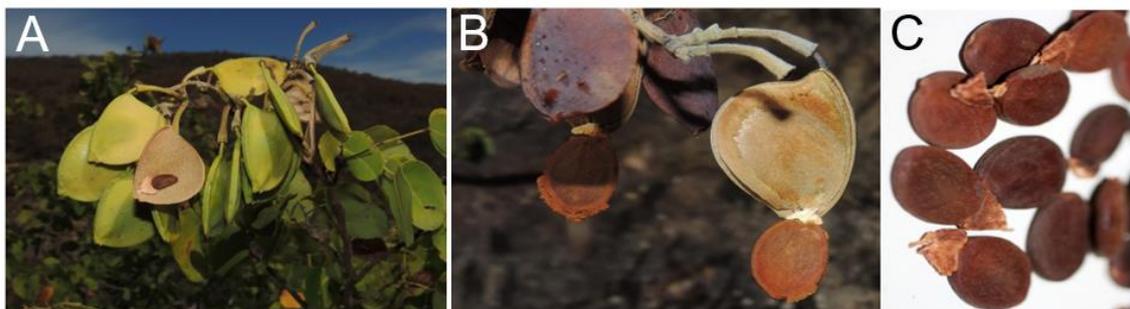
A cromatografia de afinidade com carboidratos é, o método mais amplamente utilizado para a purificação de lectinas, é simples que tira proveito de suas propriedades específicas. Apesar disto ainda há a necessidade de protocolos de aplicação geral e a seleção da matriz de ligação mais apropriada, melhorias de técnicas de eluição e da ativação da matriz por serem difíceis, devendo ser selecionadas de acordo com cada tipo de lectina que se pretende isolar e utilizar como produto biotecnológico (ROMERO *et al.*, 2017).

Sabendo-se que as características de polissacarídeos vegetais os tornam excelentes insumos para produção de matrizes cromatográficas, fontes vegetais de galactomanana surgem como uma alternativa de baixo custo em relação as matrizes cromatográficas encontradas no mercado.

### **1.5 Características da espécie *Peltogyne confertiflora* (Mart. Ex. Hayne) Benth.**

A *Peltogyne* é um gênero neotropical da família (*Fabaceae Leguminosae*), sendo representada por 23 espécies, dentre elas a, *Peltogyne confertiflora* (Figura 4) que possui diversas denominações populares (tais como: Pau roxo; Quebra machado; Coração negro; Jatobá-de-brinco Jatobá roxo; Jatobá pitombo; Jatobá d'anta; Guarabu; Roxinho; Rochina; Barabu; Gurabu; Guarabu amarelo e Guarabu roxo) em diferentes regiões do Brasil (LOBO, 2012; da SILVA 1976). A *P. confertiflora* é uma planta de porte arbóreo desprovida de espinhos, caducifólia, heliófila, monoica, apresenta uma altura entre 10 a 20 metros, sendo geralmente bem menor no cerrado, possui tronco ereto e cilíndrico com casca rugosa com diâmetro de 30 a 50 cm (LORENZI, 2002; SILVA, 1976).

Figura 4 – Detalhes morfológicos da *Peltogyne confertiflora*. A) Inflorescência terminal, frutos estipitados B) Frutos maduros monospermas. C) Sementes quiescentes.



Fonte: Adaptada de Planta do Brasil (2020)

A madeira da *P. confertiflora* é densa, com cerne roxo ou castanho, as folhas alternas, bifolioladas, com 3 a 6 cm de comprimento; as flores diclamídeas, ligeiramente zigomorfas, andróginas, pilosas, com cálice tetrâmero e corola pentâmera, branco-amarelada ou creme com 6 a 8 mm de comprimento, os frutos compressos, marrom-claros na maturação, com tamanho em torno de 5 cm, suas sementes são marrons, achatadas, orbiculares, duras, com 12 a 14 mm de diâmetro e caem sob a planta-mãe, após permanecerem presas pelo funículo na base dos frutos recém-abertos (LIMA, 2010; SILVA, 1976; RIZZINI, 1971).

Dentre todas as espécies catalogadas, a *P. confertiflora* mostra-se como uma espécie arbórea decídua, heliófita, seletiva, xerófita, clímax, exclusiva dos cerrados e de matas semidecíduas, bem como de sua transição no cerrado (RIBEIRO, VARGAS, DE PAULA e CAMPOS, 2019)

A distribuição de *P. confertiflora* também ocorre em vários países como; México, Panamá, Venezuela, Colômbia, Suriname, Guiana Francesa e Brasil. No Brasil ela ocorre preferencialmente na caatinga, cerrado e mata Atlântica, observado também alguns registros região Norte, Nordeste, Sudeste e centro-oeste, e em alguns estados como Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, São Paulo, Minas Gerais, Goiás, Tocantins, Bahia, Maranhão Ceará e Piauí. Atualmente devido ao a intensificação do desmatamento a espécie está sendo pouco encontrada principalmente no Cerrado (SILVA, 1976; CATÁLOGO DE PLANTAS E FUNGOS DO BRASIL, 2010; LIMA, 2010).

Ribeiro e colaboradores (2019), realizaram uma pesquisa para detectar as características tecnológicas da espécie *P. confertiflora* por meio de técnicas destrutivas

e não destrutivas observando as propriedades físicas, mecânicas e acústicas e concluíram que a espécie ainda é pouco conhecida comercialmente, com densidade básica, propriedades físicas e mecânicas equivalentes às de espécies tradicionais no mercado madeireiro.

Do ponto de vista químico, várias espécies do gênero já foram estudadas, visando esclarecer a composição química, e algumas propriedades ou princípios ativos, como tentativa de apoio a algumas hipóteses biogenéticas, mostrando-se ainda tímidas (LIMA e MAIA, 1961; SOUZA, GOTTLIEB e MAGALHÃES, 1967; SOUZA, 1968; ALMEIDA *et al*, 1974; MALAN e ROUX, 1974). A partir disso e visto que existem várias espécies *Peltogyne*, Lima e Maia (1961), isolaram o extrato do cerne de *P. recifensis*, e observaram que este extrato mostrou propriedades antimicrobianas.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Avaliar a eficiência da galactomanana reticulada de sementes *Peltogyne confertiflora* como matriz cromatográfica de afinidade na purificação de lectinas galactose-ligantes, bem como a sua viabilidade técnica.

### 2.2 Específicos

- ✓ Estabelecer um protocolo eficiente de extração de galactomanana de sementes de *P. confertiflora*;
- ✓ Submeter a galactomanana a testes de reticulação para obtenção de uma matriz cromatográfica de afinidade;
- ✓ Padronizar a montagem das colunas cromatográficas com a matriz de galactomanana reticulada;
- ✓ Isolar e purificar proteínas galactose-ligantes de sementes de *P. confertiflora* utilizando a galactomanana reticulada como matriz de afinidade;
- ✓ Avaliar a pureza e a bioatividade das lectinas purificadas;

### 3 MATERIAIS

#### 3.1 Vegetais

As sementes de jatobá-de-brinco (*Peltogyne confertiflora*) foram coletadas no município de Granja-Ce. As farinhas das sementes de *Bauhinia unguolata*, *Abrus precatorius*, *Abrus pulchellus* e *Abrus fruticosus* foram adquiridas no estoque do Laboratório de Biotecnologia Molecular (LabBMol) localizado no Departamento de Bioquímica de Biologia Molecular (DBBM) da Universidade Federal do Ceará (UFC) - Campus do Pici -Prof. Prisco Bezerra. Já para a obtenção da farinha de sementes de *Artocarpus incisa*, os frutos serão adquiridos no Mercado Municipal da cidade de Maranguape-Ce. As espécies vetais utilizadas nesta pesquisa estão devidamente cadastradas no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) com os números de cadastro AE23AF6 e AB94DA1 (ANEXO A).

#### 3.2 Biológicos

O sangue utilizado nos ensaios de hemaglutinação foi coletado de coelhos (machos, adultos, da raça Nova Zelândia), já mortos, abatidos no Setor de Cunicultura da UFC. Um volume de 5 mL desse sangue foi mantido em Heparina sob refrigeração (10 °C) até o uso no ensaio.

A levedura *Pichia pastoris* cepa KM71H mantida no Laboratório de Biotecnologia Molecular (LabBMol) da UFC.

#### 3.3 Reagentes

Álcool 96; Hidróxido de sódio; Epicloridrina (Clorometiloxirano); Ureia (Diaminometanal); Cloreto de sódio; Glicina (Ácido aminoacético); Ácido clorídrico; D-galactose; *Bicinchoninic Acid Kit for Protein Determination*; BSA (*Bovine Serum Albumin*); Azida sódica; Acetona; Tris [2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol]; SDS (Dodecil sulfato de sódio); Glicerol (Propano-1,2,3-triol);  $\beta$ -mercaptoetanol (2-Hidroxi-1-etanotiol); Marcador de baixo peso molecular (6.500 – 66.000 Da); *RNAeasy® Mini Kit*; Azul de bromofenol[2,6-dibromo-4-[3-(3,5-dibromo-4-hidroxifenil)-1,1-dioxo-3 benzo[c]oxatiolil]fenol]; APS (Persulfato de amônio); Temed

(Tetrametiletilenodiamina); Acrilamida (Prop-2-enamida); Bis-acrilamida; Azul de *Comassie Brilhante R-250* e outros reagentes de grau analítico.

## **4 METODOLOGIA**

### **4.1 Limpeza e processamento das sementes de *P. confertiflora***

Após tríplice lavagem com água destilada, 200 g de sementes de *P. confertiflora* foram mantidas imersas em 400 mL de água ultrapura por um período de 16 h à aproximadamente 10 °C. Posteriormente, as sementes intumescidas foram submetidas à fervura por 30 min e, após resfriamento, foram destegumentadas manualmente e trituradas em liquidificador industrial Vitalex LQI-10. A farinha (pó) resultante foi peneirada (malha de 30 mesh), homogeneizada e armazenada em frascos hermeticamente fechados até a sua posterior utilização.

### **4.2. Análise elementar da farinha de sementes de *P. confertiflora***

#### **4.2.1. Análise do teor de umidade**

Para a determinação do teor de umidade, 5 g da farinha foi distribuída em pesa-filtros limpos (previamente tarados em balança semi-analítica) e colocados numa estufa a 110 °C por 30 h. Decorrido o tempo de secagem, os pesa-filtros contendo a farinha foram retirados da estufa, e colocados num dessecador, permanecendo no mesmo até atingirem a temperatura ambiente. Sendo então pesados rapidamente. Em seguida, os pesa-filtros foram novamente colocados na estufa a 110 °C por mais 1 h. Na sequência, o material foi retirado da estufa e novamente mantido no dessecador até atingir a temperatura ambiente. O procedimento foi repetido até os pesa-filtros obterem pesos constantes. A umidade foi calculada pela diferença entre o peso final ( $P_f$ ) e inicial ( $P_i$ ), sendo expressa em percentagem.

#### **4.2.2. Teor de nitrogênio total**

A determinação do teor de nitrogênio total foi feita conforme o método descrito por Baethgen e Alley (1989). Uma amostra de 100 mg da farinha de sementes foi misturada com 1,1 g do agente catalisador (constituído por 110 g de  $\text{KH}_2\text{SO}_4$ , 10 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  e 1 g de selênio) e 1,5 mL de ácido sulfúrico concentrado P.A. A mistura foi colocada em mineralizador por 30 minutos, sendo em seguida diluída para 25 mL

com água ultrapura (*MilliQ*). Uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  da amostra diluída foi adicionada a 5,5 mL de tampão (contendo  $\text{NaHPO}_4$  0,1 M; 5% de tartarato de sódio e potássio e 5,4% de  $\text{NaOH}$ ), 4 mL da solução de salicilato 15%, nitroprussiato de sódio 0,03% e 2 mL de hipoclorito de sódio 6%. Em seguida, a amostra foi colocada em um banho-maria à 37 °C por 15 min e a leitura das absorbâncias foi feita a 650 nm em espectrofotômetro (Pharmacia, modelo LKB Ultrospec III). O teor de nitrogênio foi calculado com base na curva padrão obtida com sulfato de amônio e o teor de proteína bruta foi calculado multiplicando o valor de nitrogênio total por 6,25.

#### **4.2.3. Teor de lipídios**

Os ensaios de determinação do teor de lipídios na farinha de sementes foram realizados num extrator contínuo de Soxlet, usando com o solvente o hexano anidro. Uma amostra contendo 2 g da farinha foi acondicionada em um cartucho de papel de filtro e colocada no extrator onde foi submetida a extração com hexano por 8 h. O extrato foi coletado em um balão volumétrico (previamente pesado) que, em seguida, foi colocado numa estufa para que o solvente fosse evaporado. Depois, o balão contendo o extrato lipídico foi pesado e o teor de lipídeos foi calculado pela diferença entre a massa final ( $M_f$ ) do balão e a inicial ( $M_i$ ). Os valores foram expressos em percentagem.

#### **4.2.4. Teor de cinzas**

Para a determinação do teor de cinzas, 2 g da goma endospermica foram adicionados à cadinhos (triplicada) previamente aquecidos, que foram, em seguida colocados na mufla para incineração a 600 °C por 1 h. O aquecimento foi realizado de maneira gradativa, evitando a ebulição do material. Ao final do aquecimento, os cadinhos foram mantidos em dessecador até atingirem a temperatura ambiente. Em seguida, os cadinhos foram pesados e o teor de cinzas foi calculado pela relação entre o peso final ( $P_f$ ) e o peso do cadinho, sendo os resultados expressos em percentagem.

#### **4.2.5. Teor de carboidratos**

O conteúdo de carboidratos totais foi calculado pela diferença do total e a soma dos percentuais de umidade, cinzas, lipídeos e proteínas, conforme a equação:

$$\text{Carboidratos (\%)} = 100 - (\% \text{ umidade} + \% \text{ cinzas} + \% \text{ proteínas} + \% \text{ lipídeos})$$

#### **4.3 Extração da galactomanana da farinha de sementes de *P. confertiflora***

Na etapa de extração da galactomanana, 5 g da farinha endospermica de *P. confertiflora* foi solubilizada em 200 mL de H<sub>2</sub>O ultrapura (MilliQ) e deixada sob agitação por 15 h (*overnight*) a temperatura ambiente. Em seguida, o solubilizado foi centrifugado a 6000 x *g* por 30 min. O sobrenadante foi filtrado (filtro de nylon) e transferido para um béquer. O precipitado foi descartado. Alcool etílico (P.A) foi adicionado ao sobrenadante (1:3 v/v) que foi mantido em repouso por 24 h á 10 °C. Após esse período, o álcool foi cuidadosamente removido por filtração e centrifugação (6000 x *g* por 30 min). O precipitado foi novamente redissolvido em 100 mL de H<sub>2</sub>O ultrapura e mantido sob agitação por 15 h (*overnight*) a temperatura ambiente (25 °C). O material solubilizado (rico em galactomanana) foi centrifugado (a 10000 x *g* por 30 min). O sobrenadante foi transferido para um novo béquer e o precipitado descartado. Outro volume de álcool etílico foi adicionado ao sobrenadante conforme descrito anteriormente. Por fim, o álcool foi removido (por filtração ou centrifugação) e a galactomanana precipitada foi desidratada com 50 mL de acetona P.A, liofilizada e acondicionadas em frascos hermeticamente fechados, a temperatura de 25 °C até a utilização posterior.

#### **4.4 Calorimetria exploratória diferencial (DSC) da galactomanana de *P. confertiflora***

A DSC é uma técnica utilizada para medir a diferença de energia entre uma amostra e um material de referência em função de um programa de aquecimento ou resfriamento sob atmosfera controlada. As análises de DSC foram realizadas no Laboratório de Tecnologia da Biomassa da Embrapa Agroindústria Tropical em um calorímetro diferencial de varredura DSC Q20 TA *Instrument*, utilizando o gás nitrogênio a 40 mL/min e uma massa de 9,5 mg de amostra. O experimento foi realizado a uma taxa de 10 °C/min com uma temperatura de equilíbrio de 25 °C e uma temperatura final de 700 °C. Os experimentos foram realizados sob atmosfera de nitrogênio a uma taxa de fluxo de 50 mL/min.

#### **4.5. Análise Termogravimétrica (TGA) da galactomanana de *P. confertiflora***

Esta técnica possibilita conhecer as alterações que o aquecimento pode provocar na massa de substâncias, permitindo estabelecer a faixa de temperatura em que elas adquirem composição química fixa, definida e constante, a temperatura em que começam a decompor, acompanhar o andamento de reações de desidratação (perda de umidade), oxidação, combustão e decomposição. As análises de TGA deste trabalho foram realizadas no Laboratório de Tecnologia da Biomassa da Embrapa Agroindústria Tropical, em que aproximadamente 0,3 mg da amostra foram levadas a um equipamento analisador térmico simultâneo (STA 6000) da *PerkinElmer*®, com gás nitrogênio 50 mL/min a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min, em uma faixa de temperatura de 20 a 400 °C.

#### **4.6. Caracterização galactomanana de *P. confertiflora* por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)**

A RMN é uma técnica utilizada na identificação, elucidação e quantificação dos compostos presente em diferentes materiais, seja, nos campos da química orgânica, inorgânica, química de materiais ou biomoléculas sendo estas de baixo peso molecular, macromoléculas (LEITE, 2013). Os espectros de RMN foram obtidos em um equipamento *Agilent DD2* de 600 MHz (para núcleo de  $^1\text{H}$ ) e equipado com uma sonda *One Probe* de 5 mm de diâmetro interno (H-F/ $^{15}\text{N}$ - $^{31}\text{P}$ ) de detecção inversa e gradiente de campo no eixo “z”. As amostras de foram preparadas dissolvendo-se 4 mg de galactomanana de *P. confertiflora* em 550  $\mu\text{L}$  de água deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ) e esta solução foi submetida a ultrassom por 30 min. Em seguida, um espectro unidimensional de  $^1\text{H}$  foi realizado a 80 °C com um tempo de espera entre cada aquisição de 2s, aquisição de 128 transientes em uma janela espectral de 16 ppm e 32k de número de pontos. O espectro unidimensional de  $^{13}\text{C}$  foi obtido com um tempo de espera entre cada aquisição de 1s, aquisição de 20k de transientes em uma janela espectral de 251,1 ppm e 32k de número de pontos. Os picos foram integralizados utilizando o software *Varian VNMRJ 4.0*.

#### **4.7. Reticulação da galactomanana de *P. confertiflora* para a produção da matriz cromatográfica**

Para a produção da matriz, seguirá a metodologia descrita por Appukuttan, Suroliá e Bachawat (1977). Na proporção 1:4 (m/v) 5 g de galactomanana refinada foi solubilizada em 15 mL de NaOH 3 M com o auxílio de um agitador magnético e um bastão de vidro. Em seguida, adicionou-se 2 mL de Epicloridrina e o material foi homogeneizado com bastão por 20 min até a formação de um bloco de gel. Posteriormente, a mistura foi mantida em estufa à 40 °C por 24 h e, em seguida, a temperatura foi elevada para 70 °C, permanecendo nesta condição por mais 12 h. Para cessar a reação e remover o excesso de NaOH e epicloridrina, o gel formado, resultante do processo de reticulação (*crosslinking*), foi lavado exaustivamente com 10 volumes de água destilada. Em seguida, o gel foi selecionado utilizando-se uma peneira de 30 mesh e lavado novamente com 5 volumes de água destilada para remoção dos fragmentos em suspensão.

#### **4.8. Preparação e montagem das colunas cromatográficas com a galactomanana reticulada**

Para a preparação das matrizes cromatográfica, o gel formado pela reticulação da galactomanana foi distribuído em suportes cromatográficos (da BioRad) de 20 mL para a montagem das colunas cromatográficas. As colunas foram mantidas em repouso por 4 h a temperatura ambiente para possibilitar a sedimentação dos géis por gravidade. Em seguida, as colunas foram lavadas cinco vezes com uma solução de NaCl 150 mM, cinco vezes com o tampão glicina 10 mM pH 2,6 contendo NaCl 150 mM para a remoção de partículas solúveis nos géis e, por fim, lavadas mais cinco vezes com o tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,6 com NaCl 0,15 M, para equilibrar as colunas. Devidamente montadas, as colunas cromatográficas foram mantidas com azida sódica 0,02% a aproximadamente 10 °C até o uso posterior.

#### **4.9. Extração de proteínas das farinhas de sementes de *Artocarpus incisa*, *Artocarpus integrifolia*, *Abrus precatorius*, *Abrus pulchellus* e *Ricinus communis***

Para obtenção dos extratos totais, na proporção de 1:10 (p/v), 2 g das farinhas de sementes de *A. incisa*, *A. integrifolia*, *A. precatorius*, *A. pulchellus* e *R. communis* foram dissolvidas em tampão de extração (Tris-HCl 20 mM, pH 7,6 com NaCl 150 mM),

mantidas sob agitação por 3 h à temperatura ambiente (25 °C) e, posteriormente, as suspensões obtidas foram centrifugadas à 12000 x g por 30 min, à 20 °C. Em seguida, os sobrenadantes foram coletados, filtrados, submetidos a dosagem de proteínas solúveis e utilizados nos procedimentos cromatográficos. Esses extratos brutos totais foram denominados EBt.

#### **4.10. Dosagem de proteínas**

A dosagem de proteínas solúveis foi realizada conforme o método de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando a albumina sérica bovina (BSA) como padrão. A presença de proteínas nos eluatos das colunas cromatográficas foi detectada pela medida da absorbância a 280 nm em espectrofotômetro.

#### **4.11. Avaliação da matriz reticulada de galactomanana na purificação das lectinas galactose-ligantes.**

Após a obtenção dos extratos brutos totais (EBts), 10 mL deles foram aplicados separadamente nas colunas cromatográficas. Após 1 h de contato, foi realizada a eluição com o tampão de equilíbrio (Tris-HCl 20 mM, pH 7,6 com NaCl 150 mM) para a remoção das proteínas não retidas. Para a eluição das lectinas retidas foi utilizada uma solução de galactose 100 mM contendo NaCl 150 mM. As cromatografias foram realizadas com o auxílio de uma bomba peristáltica Pump P-1 e um coletor de frações *GradiFrac System* (Pharmacia Biotech). Para monitoramento das concentrações das frações proteicas foram realizadas leituras na absorbância de 280 nm em espectrofotômetro (Amersham Biosciences). Após a coleta das frações correspondentes as lectinas, elas foram dialisadas primeiramente contra ácido acético 0,1 M na proporção 1:10 (v/v) por 2 h e, em seguida, contra tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,6 contendo NaCl 150 mM, na proporção 1:10 (v/v), sendo realizadas 3 trocas a cada 2 h. Logo após, os materiais foram prontamente identificados e armazenados em freezer até sua utilização.

#### **4.12. Análise da integridade e pureza das lectinas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

O sistema SDS-PAGE em gel de poliacrilamida são amplamente utilizadas em pesquisas de biologia celular e molecular, este sistema consiste em um tipo de eletroforese sendo desnaturadas as amostras pelo calor na presença de  $\beta$ -mercaptoetanol, desnaturando as pontes dissulfeto, este atua na separação das cadeias polipeptídicas isoladas e mantém as proteínas com saturação de cargas elétricas negativas (LIMA, 2017). As purezas e a massas moleculares aparentes das lectinas foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições redutoras na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS), seguindo a metodologia descrita por Laemmli (1970). Foi utilizado um gel de aplicação de 3,5% de acrilamida em tampão Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8) e um gel de separação com 12,5% de acrilamida em tampão Tris-HCl 0,5 M (pH 8,8) contendo SDS 1%. As corridas eletroforéticas foram realizadas a 25 mA e uma voltagem inicial de 100 V. As amostras foram preparadas em tampão Tris-HCl 62,5 mM (pH 8,3) contendo SDS 1%,  $\beta$ -mercaptoetanol 0,1%, sacarose e azul de bromofenol 1%. Em seguida, as amostras foram aquecidas a 100 °C por 5 min e centrifugadas a 1000 x g por 5 min à temperatura ambiente. Os géis foram corados com uma solução de *Coomassie Brilliant Blue R-250* a 0,05 %, e descorados com uma solução de metanol:ácido acético:água (1:3,5:8, v/v/v).

#### **4.13. Ensaio de imunodeteção das lectinas**

Para ensaio de imunodeteção foi utilizada a técnica de *Western blotting*. Inicialmente, as diferentes frações lectínicas foram submetidas a uma eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%), na presença de SDS e sob condições redutoras. Após a eletroforese, as bandas proteicas referentes a cada uma das lectinas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose utilizando PBS pH 7,2 como tampão de transferência e a aplicação de 38 mA e 40 V por 2 h. Após a transferência, a membrana se incubada em PBS pH 7,2 com 5% de leite Molico® em pó (solução de bloqueio) por 5 min sob agitação lenta e a temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi incubada (2 h, a 8 °C) com os anticorpos primários (anti-lectinicas). Após esse tempo, a membrana foi lavada com o tampão PBS e incubada com o anticorpo secundário (anti-IgG conjugado com a peroxidase) por mais 2 h, a 8 °C. O processo de revelação da

membrana foi realizado com solução de peróxido de hidrogênio 30%, cloreto de níquel e tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,2, no escuro e a temperatura ambiente.

#### **4.14 Avaliação da bioatividade das lectinas via ensaios de hemaglutinação**

O ensaio de atividade hemaglutinante foram realizados conforme a metodologia descrita por Moreira e Perrone (1977). Esse ensaio foi realizado em placa de microtitulação através de diluições seriadas. Resumidamente, 100  $\mu$ L da fração de cada lectina testada foi adicionado a igual volume de uma solução de NaCl 150 mM, e desta mistura foram feitas diluições seriadas. Às diferentes diluições proteicas, foram adicionados 50  $\mu$ L de uma suspensão de hemácias coletado de coelhos (machos, adultos, da raça Nova Zelândia) a 2 %, e a mistura deixada em estufa, a 37 °C por 30 min, seguidos de outros 30 min a temperatura ambiente. A aglutinação foi observada a olho nu. A maior diluição que apresentar hemaglutinação positiva foi considerada com título. A quantidade de proteína presente nesta diluição representa a quantidade mínima de proteína necessária para aglutinar os eritrócitos e é definida como unidade de hemaglutinação (UH). A atividade específica é o número de unidades de hemaglutinação por miligrama de proteína.

#### **4.15 Atividade RNA *N*-glicosidase das quimerolectinas isoladas em matriz reticulada de galactomanana de *P. confertiflora***

Por serem consideradas quimerolectinas, as lectinas de *A. precatorius*, *A. pulchellus* e *R. communis* além de serem capazes de aglutinar eritrócitos, também são capazes de depurar o RNA ribossomal (RNAr) devido a sua atividade catalítica RNA *N*-glicosidase. A avaliação da atividade RNA *N*-glicosidase foi realizada baseada a metodologia descrita por Smith *et al.* (2003), com modificações. Para esse ensaio, 20  $\mu$ g de ribossomos de *Pichia pastoris* KM71H foram incubados a 25 °C por 1 h com 1  $\mu$ g de cada quimerolectina purificada num volume final de 500  $\mu$ L. A reação foi interrompida pela a adição de SDS 1%. O RNAr foi obtido utilizando o *RNAeasy® Mini Kit* (QIAGEN) seguindo as recomendações do fabricante. A mistura de reação foi congelada e o precipitado de RNAr foi obtido por centrifugação a 13000 x *g* por 30 min a 4 °C. O precipitado foi lavado com etanol 70 % e incubado 20 min no dessecador a vácuo para secar. Em seguida, 10  $\mu$ g do RNAr foi tratado (por 4 min, a 60 °C) com 20  $\mu$ L de anilina-acética 1 M, pH 4,5. No controle negativo, foi usada água no lugar da

anilina. A reação foi interrompida pela adição de 0,1 volume de  $\text{NH}_4\text{OAc}$  2 M, 2,5 volumes de etanol 100% e centrifugadas a  $15000 \times g$  por 1 h a  $4^\circ\text{C}$ . O precipitado obtido foi ressuspenso em 15  $\mu\text{L}$  de tampão TPE (Tris 3,6 mM;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  3 mM; EDTA 0,2 mM) contendo formamida 60%. A identificação dos fragmentos de RNAr depurinados foi realizada através de eletroforese em gel desnaturante de agarose-formamida, utilizando brometo de etídio e visualizados sob luz UV do transluminador.

#### **4.16. Análises estatísticas**

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente, utilizando-se o teste Tukey, com auxílio do programa *InStat* (Graphpad InStat: GraphPad Software Oberlin, San Diego – CA, USA). O nível de significância adotado foi  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1. Rendimento da farinha e análise elementar

Para obtenção da farinha de sementes de *P. confertiflora* foram adotadas algumas precauções quanto à temperatura e ao tempo de secagem ideal, controlando adequadamente esses fatores para não interferirem na qualidade final da farinha, alterando a cor pelo elevado conteúdo em açúcares. O rendimento médio da farinha a partir das vagens obtidas foi de aproximadamente 78 %.

Sobre o rendimento de farinhas extraídas de sementes vegetais, Alves (2013) realizou uma extração de gomas parcialmente purificadas das espécies *Caesalpinia pulherrima*, *Adenanthera pavonina*, *Delonix regia*, *Tamarindus indica*, *Mucuna sloanei* e *Hymenaea courbaril*, e em relação ao encontrado neste estudo apenas a farinha de *Tamarindus indica* e *Mucuna sloanei* mostraram a quantidade semelhante ao encontrado na *P. confertiflora*. Observou-se ainda, nessa pesquisa, que a *Hymenaea courbaril* mostrou resultado superior em relação ao rendimento encontrado na *P. confertiflora* e as sementes de *Caesalpinia pulherrima*, *Adenanthera pavonina*, *Delonix regia* valores bem inferior ao encontrado se destacando com o menor rendimento a farinha da *Adenanthera pavonina*.

Em relação às caracterizadas quanto à composição química e características físicas da *P. confertiflora* foram realizadas os teores de lipídios em conformidade com o item 4.2.3 e proteínas foram determinados segundo os teores de nitrogênio total x 6,25 conforme Babthgen e Alley (1989). Já os teores de umidade e cinzas foram determinados conforme os itens 4.2.1 e 4.2.4 respectivamente. Sobre a análise de fibra bruta e carboidratos foram determinados conforme o item 4.2.5.

Em relação aos estudos que avaliam o rendimento de sementes da *P. confertiflora* e o seu potencial biotecnológico, ainda mostram-se insuficientes na literatura nacional e internacional para realização a análise comparativa com este estudo, mostrando assim o ineditismo desta pesquisa.

A composição físico-química da farinha de sementes de *P. confertiflora*, em termos de umidade, proteínas, lipídeos, cinzas, carboidratos e fibras está apresentada na tabela 1.

**Tabela 1.** Teores de umidade, proteínas, lipídeos, cinzas, carboidratos e fibras da farinha de sementes de *P. confertiflora*.

ANÁLISES	TEOR (%)
Umidade	5,7 ± 0,8
Cinzas	4,1 ± 0,2
Fibra bruta	7,1 ± 0,9
Lipídeos	3,5 ± 1,1
Proteína total*	10 ± 1,3
Carboidratos**	69,6 ± 3,2

\*Nitrogênio total x 6,25

\*\* Obtido por diferença

Em relação ao teor de umidade sabe-se que a água desempenha importante papel nas propriedades físicas e funcionais dos polissacarídeos e que a maioria destes possuem unidades glicosídicas que apresentam em média três unidades de hidroxilas. Com isso percebe-se que os polissacarídeos possuem forte tendência a se ligar a moléculas de água e se hidratar rapidamente. Segundo Whistler e Miller (1997), os polissacarídeos devem apresentar o teor de água numa faixa de 8-12%.

O valor que encontramos neste estudo com a *P. confertiflora*, está bem abaixo do que mostra na literatura conforme (SOUZA, 2010; BOURBON *et al.*, 2010; BURITI *et al.*, 2014) em pesquisas realizadas com as sementes dos vegetais *Caesalpinia ferrea*, *S. japonica*, *G. triacanthos*, *Caesalpineia pulcherrima*, *Cassia grandis* e *Cassia spectabilis* extraídas de fontes não usuais, e, na semente da alfarroba mostrou-se acima de 10% (ŠUBARIČ *et al.*, 2011).

Em relação à umidade não tem um valor máximo especificado pelas normas americanas, no entanto a norma ISI indiana permite um valor máximo de até 13% para a goma guar como mostra na pesquisa de Joshi e Kapoor (2003).

Alves (2013) realizou uma pesquisa com gomas extraídas de sementes de seis tipos de vegetais (*Caesalpinia pulcherrima*, *Adenantha pavonina*, *Delonix regia*, *Tamarindus indica*, *Mucuna sloanei* e *Hymenaea courbaril*) e observou, por meio da análise físico-química, que o teor de umidade das gomas das seis espécies estudadas variou de 9,7-12,6% corroborando com os resultados obtidos por Whistler e Miller (1997). Já a pesquisa realizada por Lima (2015), com sementes de algaroba obteve o valor igual a 8,42%, que ao comparar com valores da literatura, mostrou-se dentro dos

valores em pesquisas com a mesma espécie. Para outras espécies como a *Prosopis juliflora*, que apresentou 8,80%, *Cassia javanica* e *Caesalpinia pulcherrima* 8,80% e 8,90% respectivamente (AZERO, 2002), mostraram estar conforme aos valores preconizados por Whistler e Miller (1997). Andrade *et al.* (1999) obtiveram, o valor de 11,3% de umidade em amostra comercial de goma de alfarroba sem purificação e 7,5% em amostra purificada. Souza *et al.* (2010) analisaram a espécie *Caesalpinia ferrea* e encontraram a umidade medida de 14%, bem superior aos valores reportados pela literatura.

Sobre o quantitativo de cinzas obtivemos na pesquisa com a *P. confertiflora* o quantitativo de 4,1% mostrados na tabela 1. O teor de cinzas mede a porcentagem de minerais que a amostra estudada possui e este valor encontrado mostrou-se muito elevado ao comparar com os valores encontrados por Crisóstomo (2008) com a semente de *B. pentandra* que foi de 0,84%. Já Tavares (1998) encontrou 0,41% para a *Adenanthera pavonina* e Garros - Rosa (2006) encontrou 2,63% de cinzas da *Parkinsonia euculeata*.

Ainda sobre o teor de cinzas encontrados por outras pesquisas para *Prosopis juliflora*, Azero (2002) encontrou 0,38%, e de 0,30% para *Cassia javanica* e para a espécie *Caesalpinia pulcherrima* foi encontrado o valor de 0,30% por Andrade *et al.* (1999).

Alves (2013) realizou uma análise físico-química das gomas extraídas de sementes de seis vegetais (*Caesalpinia pulcherrima*, *Adenanthera pavonina*, *Delonix regia*, *Tamarindus indica*, *Mucuna sloanei* e *Hymenaea courbaril*) e obteve os resultados variados em relação aos teores de umidade e cinzas 0,45-2,5% respectivamente, nenhuma desses chegaram ao número próximo do encontrado para a sementes de *P. confertiflora*.

Quanto ao teor de proteína, obtivemos o teor de 10% como mostrado na tabela 1, Alves (2013), encontrou nas gomas extraídas das sementes de *C. pulcherrima*, *A.pavonina* e *D. regia* os valores entre (0,6-0,9%) sendo estes valores apresentados com o menor conteúdo de proteína em relação ao que encontramos e as gomas extraídas de *T. indica*, *M.sloanei* e *H. courbaril* os valores entre (6,3-7,4 %), sendo estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey, resultados estes que mostraram-se semelhantes aos encontrados por Stupp *et al.* (2008) para sementes de *Copaifera landsdorffii*.

Em relação aos valores de carboidratos em percentual encontramos  $69,6 \pm 3,2\%$  como mostrado na tabela 1. Valores mostrados em outras pesquisas com as sementes de *P. confertiflora* não se encontram na literatura, porém ao analisar outros tipos de sementes de vegetais observamos que as sementes de *A. Incisa* apresenta um alto teor de carboidratos (76,8%), conforme Moreira *et al.* (1998). Alves (2013) realizou uma pesquisa com gomas extraídas de sementes de seis tipos de vegetais (*Caesalpinia pulherrima*, *Adenanthera pavonina*, *Delonix regia*, *Tamarindus indica*, *Mucuna sloanei* e *Hymenaea courbaril*) e realizou uma análise físico-química observou-se que o teor de carboidrato mostrou-se a baixo do valor encontrado nas três primeiras espécies 42,66; 29,52; 39,63 respectivamente e nos três últimos valores acima do valor encontrado na presente pesquisa 82,2; 89,74; 87,70 respectivamente. Crisóstomo (2008) encontrou em sua pesquisa com *B. pentandra* um teor de carboidrato bem acima do encontrado na presente pesquisa totalizando em 92%.

## 5.2. Rendimento da galactomanana extraída da farinha de sementes de *P. confertiflora*.

Conforme apresentado na tabela 2, o rendimento médio para a galactomanana obtida da farinha de sementes de *P. confertiflora* foi 59,6 mg de galatomanana por grama de farinha. Esse valor convertido em percentual, resulta em 5,96% de rendimento de galactomanana extraída da farinha da semente da *P. confertiflora*.

**Tabela 2.** Rendimento da galactomanana extraída da farinha de sementes de *P. confertiflora*.

EXTRAÇÕES	mg de GM/g de Farinha
1	65
2	55
3	53
4	65
5	60
Média	$59,6 \pm 2,4$

Algumas pesquisas realizadas sobre a extração e o rendimento de galactomananas mostraram-se semelhantes, como mostram os autores Dakia, Wathelet e Paquot (2007) que obtiveram valores de 6%, em galactomananas de goma Locusta resultados estes que vão de encontro aos encontrados por Crisóstomo (2008), que pesquisou 88 espécies de leguminosas, e destas 11 mostraram o rendimento maior que 20%, 17 entre 15-20 % e a maioria (31 espécies) apresentaram um rendimento menor que 10 % das sementes pesquisadas, corroborando com o encontrado na presente pesquisa.

Além de leguminosas outras famílias de não leguminosas como as *compositae*, *malvaceae*, *umbelliferae* foram avaliadas por Srivastava e Kapor (2005), apresentando rendimento inferior a 10%.

Nascimento (2019) realizou a extração da galactomanana oriunda de vagens de algaroba (*Prosopis juliflora*) e obteve o percentual de rendimento de 8,56%. Pode se observar que esse rendimento depende de vários fatores influenciadores como a origem da semente, o tamanho das partículas extraídas e a solubilidade dos polissacarídeos (SALVALAGGIO, 2010).

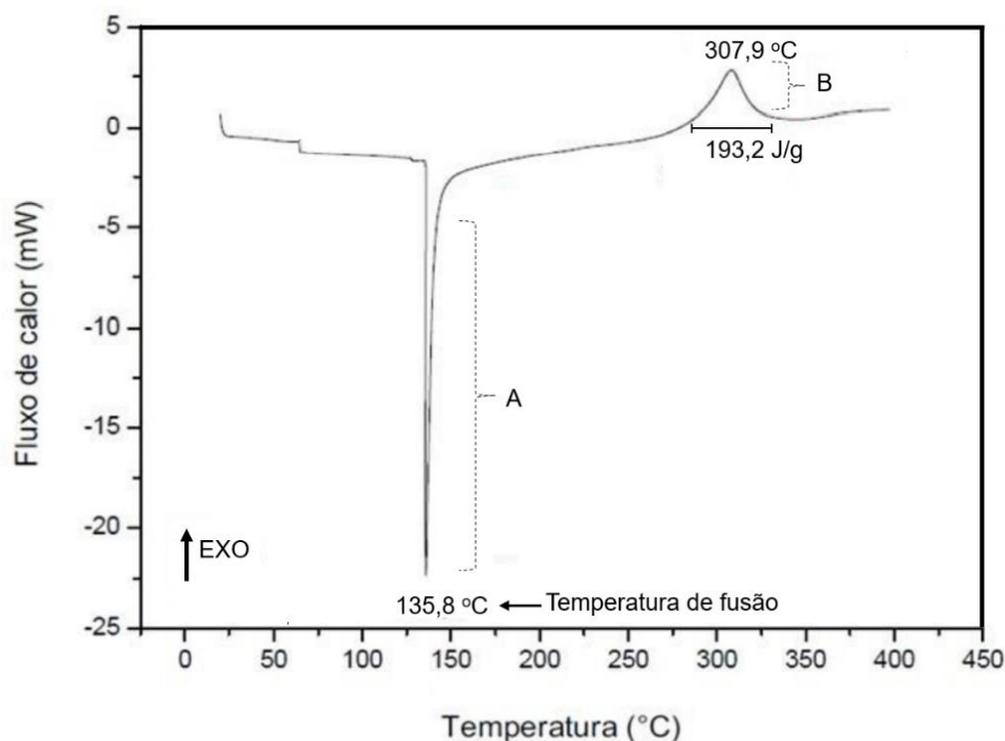
Nos estudos realizados por Vianna-Filho (2009), na extração de galactomanana de guapuruvu o rendimento foi de 7,5%, resultado semelhante ao encontrado nesta pesquisa. Resultado inferior foi encontrado por Rodrigues *et al.* (2015), com a galactomanana de guapuruvu, o rendimento obtido de galactomanana foi de 6,6%. Valor inferior também foi encontrado no trabalho de Nascimento (2014), em que a cada 200 g de cápsulas moídas o rendimento de galactomanana final foi de apenas 6,1% (m/m).

### **5.3. Análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC) da galactomanana da farinha de sementes de *P. confertiflora***

O gráfico 1 mostra um efeito endotérmico, com pico majoritário em 135,8 °C, característico da perda de água do material analisado. O gráfico também evidencia um evento exotérmico, com pico menor em 307,9 °C, característico da decomposição da galactomanana, que gerou uma entalpia de 193,2 J/g. Observa-se ainda um pequeno evento em torno de 55 °C, característico da temperatura de transição vítrea (T<sub>g</sub>) da galactomanana. Cerqueira e colaboradores (2011) observaram valores de T<sub>g</sub> de 52,6, 56,4 e 66,9 °C para galactomananas extraídas de *Adenantha pavonina*, *Gleditsia triacantho* e *Caesalpinia pulcherrima*, respectivamente. Segundo os autores essas

diferenças estão relacionadas com a estrutura química da galactomanana, devido, especialmente, a razão manose/galactose.

**Gráfico 1.** DSC da galactomanana extraída da farinha de sementes de *P. confertiflora*. A – Transição endotérmica (mudança de fase); B – Transição exotérmica (decomposição)



Fonte: Autor (2021)

No trabalho de Cerqueira *et al.* (2011), o evento endotérmico foi observado e caracterizado nas temperaturas de 137,11, 139,18 e 151,36 °C para as galactomananas de *Gleditsia triacanthos*, *Caesalpinia pulcherrima* e *Adenanthera pavonina*, respectivamente, dados estes que se assemelham aos encontrados para a galactomanana de *P. confertiflora*. Evento este que, mostra-se correspondente a perda de água do polissacarídeo. Sobre o segundo evento, desta vez exotérmico e que corresponde a degradação da galactomanana observamos na pesquisa de Vendruscolo *et al.* (2009) que foi apresentado o valor de 311 °C para a galactomanana extraída da espécie *Mimosa scabrella*. Sobre a temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ), Roos e Karel, (1991), afirmam que esta é um parâmetro associado com a mobilidade do sistema, sendo definida como uma alteração física de um estado vítreo a um estado elástico em materiais amorfos

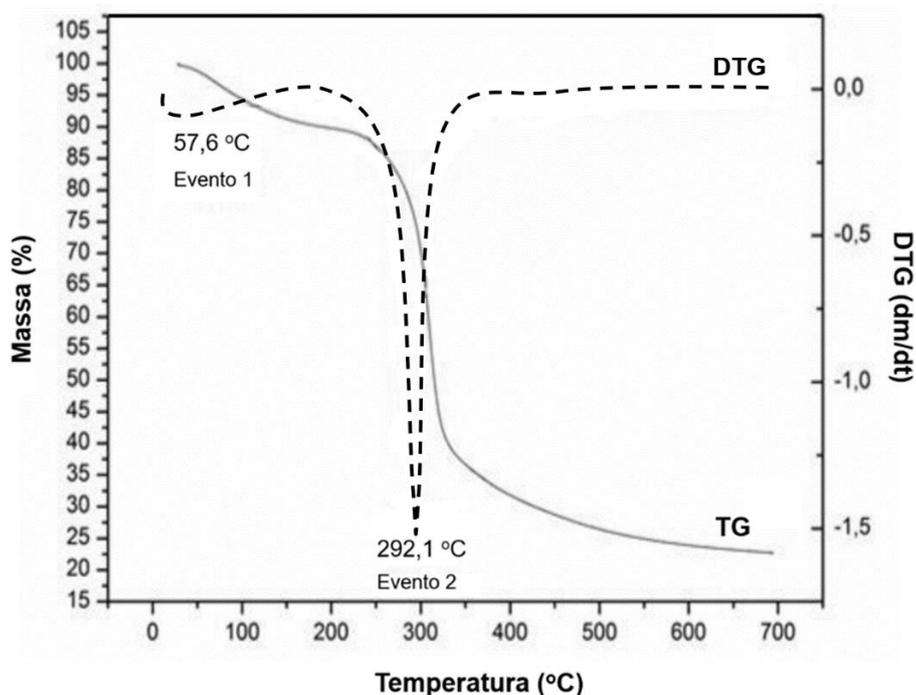
promovido por calor ou pela adição de um plastificante. Sperling, (2006), afirma também que a transição vítrea em polímeros pode ser explicada por várias propriedades como o peso molecular, a cristalinidade e a ligação intermolecular.

Sobre a transição vítrea obtivemos na presente pesquisa o valor de 55°C, resultado este corroboram com os estudos mostrados por Chaires-Martínez et al., (2008), Vendruscolo *et al.*, (2009) e Cerqueira *et al.* (2011), pois mostram que esse valor varia de 50 a 60 °C.

#### 5.4. Análise termogravimétrica (TGA) da galactomanana de sementes de *P. confertiflora*

As duas curvas demonstradas no gráfico 2, apresentam duas reações, onde a curva na temperatura de 57,62 °C ocorre lentamente que é seguida por outra e a segunda curva de 292,18 °C que ocorre rapidamente corresponde a uma série de reações secundárias ou menores que ocorrem simultaneamente ou próximas a reação principal.

**Gráfico 2.** Análise termogravimétrica e sua derivada da galactomanana de sementes de *P. confertiflora*.



Fonte: Autor (2021)

Essas curvas são denominadas curvas termogravimétricas ou, simplesmente, curvas de TGA. As curvas de TGA podem e devem ser derivadas (primeira) registrando-se a 35 DTG (termogravimetria derivada) que fornece informações da derivada primeira da variação da massa em relação ao tempo ( $dm/dt$ ) ou em função da temperatura ( $dm/dT$ ) (CANEVALORO, 2004). A temperatura inicial (1º evento) é a menor temperatura em que pode ser identificado o início da variação de massa para um determinado conjunto de condições experimentais relacionadas a desidratação (perda de moléculas de água) e a temperatura final (2º evento) é a menor temperatura indicando que o processo responsável pela variação de massa foi concluído devido a decomposição da molécula.

Outro evento de perda de massa pode ser observado no pico da DTG em 292,18 °C, que evidenciou uma degradação sendo isto relacionado com a desintegração das cadeias macromoleculares da galactomanana (CERQUEIRA *et al.*, 2011, 2012; GIANCONE *et al.*, 2011; MARTINS *et al.*, 2012; MU *et al.*, 2012; LIYANAGE *et al.*, 2015).

### **5.5. Caracterização galactomanana de sementes de *P. confertiflora* por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)**

A razão Gal / Man foi avaliada por espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  a 600 MHz (Tabela 3). Conforme observado no espectro de  $^1\text{H}$ , a razão Gal/Man deduzida a partir das áreas relativas referentes aos sinais dos carbonos anoméricos em  $\delta$  5,01 (galactose) e  $\delta$  4,73 (manose), é 1,00 / 1,14. Já no espectro  $^{13}\text{C}$ , as áreas relativas dos sinais dos carbonos em  $\delta$  100,1 e  $\delta$  99,5 (galactose e manose, respectivamente) resultaram em um Gal / Man proporção de 1,00 / 1,09. A sensibilidade e precisão da técnica de RMN para a determinação da razão Gal/Man contribuiu para a elucidação estrutural da principal cadeia polimérica da galactomanana de sementes de *P. confertiflora*.

**Tabela 3.** Razão Galactose/manose da cadeia polimérica da galactomanana de sementes de *P. confertiflora* avaliada por RMN.

Método	Galactose	Manose
<sup>1</sup> H RMN	1.00	1.14
<sup>13</sup> C RMN	1.00	1.09

Segundo Kaiser (2000), a ressonância magnética nuclear (RMN) mostra-se como uma das mais poderosas técnicas espectroscópicas no estudo de aspectos estruturais e dinâmicos de moléculas orgânicas em solução. Para a química de carboidratos se tornou uma ferramenta largamente utilizada e com os avanços das técnicas bidimensionais, torna-se imprescindível sua utilização, principalmente na elucidação estrutural de polissacarídeos.

Dentre as técnicas de RMN utilizadas estão a do hidrogênio (<sup>1</sup>H) e de carbono treze (<sup>13</sup>C) e correlações homonuclear (1H-1H), como o COSY (*homonuclear Correlation Spetroscopy*) e heteronuclear (<sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H) HMQC (*Heteronuclear Multiple Quantum Coherence*) (KAISER, 2000).

As análises de RMN sobre as estruturas de um polissacarídeo várias informações podem ser obtidas. Diversos trabalhos na literatura relatam aspectos de galactomananas de diferentes fontes em relação aos resultados obtidos por RMN, indicando similaridade nos deslocamentos químicos desses polissacarídeos. Dessa forma, as ressonâncias do hidrogênio (<sup>1</sup>H) e do carbono (<sup>13</sup>C) podem ser atribuídas baseadas em dados reportados na literatura por alguns autores como (GRASDALEN e PAINTER, 1980; MANZI e CEREZO, 1986; KAPOOR *et al.*, 1998; PETKOWICZ *et al.*, 1998; JOSHI e KAPOOR, 2003; VIEIRA *et al.*, 2007; CUNHA *et al.*, 2009).

Mendes (2015) realizou a análise da galactomanana de *C. pulcherrima*, por RMN e obteve a razão G/M de 1/2.52. Esse valor é maior ao que foi encontrado na presente pesquisa. Alguns valores em pesquisas realizadas com a *C. pulcherrima*, com a relação a G/M mostraram-se diferentes aos encontrados por Mendes, (2015) como mostrados (1/2.83), (1/3.6) e (1/3.65) encontrados nas pesquisas de Cerqueira *et al.* (2009), Braga *et al.* (2011) e Buriti *et al.* (2014).

Cunha (2015) realizou a caracterização da galactomanana de *Caesalpinia ferrea* e obteve resultados de razão Gal/Man foi de 1/2,4 e 1/2,5, e deu-se através das integrações relativas das áreas dos sinais correspondentes a galactose e manose em

ambos os espectros de RMN de hidrogênio e carbono, resultados estes diferentes dos encontrados com a *P. confertiflora*. Os valores obtidos por Cunha (2015) estão coerentes com as pesquisas de alguns autores com as razões Gal/Man em outras galactomananas de *Caesalpinia pulcherrima* (razão 1/2,7), *Senna multijuga* (razão 1/2,3), *Caesalpinia cacalaco* (razão 1/2,5), *Gleditsia amorphoides* (razão 1/2,5) e *Cocos nucifera* (razão 1/2,57) (SRIVASTAVA e KAPOOR, 2005; PRAJAPATI *et al.*, 2013).

Sobre os resultados encontrados nesta pesquisa sobre a razão Galactose/manose da cadeia polimérica da galactomanana de sementes de *P. confertiflora* encontramos apenas uma pesquisa com resultados semelhantes quanto a razão Galactose/manose da cadeia polimérica da galactomanana, realizada por Rodrigues *et al.*, (2015) em análise estrutural dos polissacarídeos por RMN para galactomana de *P. juliflora* e obtiveram a razão Gal/Man 1/1.13, essa mesma razão foi encontrada por Vieira *et al.* (2007), ao realizarem a mesma análise de RMN e com o mesmo material.

#### **5.6. Dosagem de proteínas solúveis dos extratos brutos totais (EBTs) das farinhas de sementes de *A. incisa*, *A. integrifolia*, *A. precatorius*, *A. pulchellus* e *R. communis*.**

Todos os EBTS foram submetidos ao ensaio de Bradford para a determinação do teor de proteínas solúveis visando a padronização nos volumes dos extratos a serem aplicados nas matrizes cromatográficas. Esse ensaio baseia-se na interação entre o corante *Coomassie brillante blue G-250* e as proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas (BRADFORD, 1976). No pH de reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595 nm (COMPTON e JONES, 1985).

Conforme apresentado na tabela 4, todos os EBts analisados apresentaram concentrações proteicas  $\geq 9$  mg/mL. Esses valores foram compatíveis aos já citados na literatura para as espécies vegetais analisadas (MONTEIRO-MOREIRA, 2002; REDDY *et al.*, 2006; RAMOS *et al.*, 1998; PRATUSH *et al.*, 2011) viabilizando assim, o uso dos EBts nos ensaios cromatográficos

**Tabela 4.** Quantificação de proteínas nos extratos brutos totais (EBts) das farinhas de sementes de *A. incisa*, *A. integrifolia*, *A. precatorius*, *A. pulchellus* e *R. communis*.

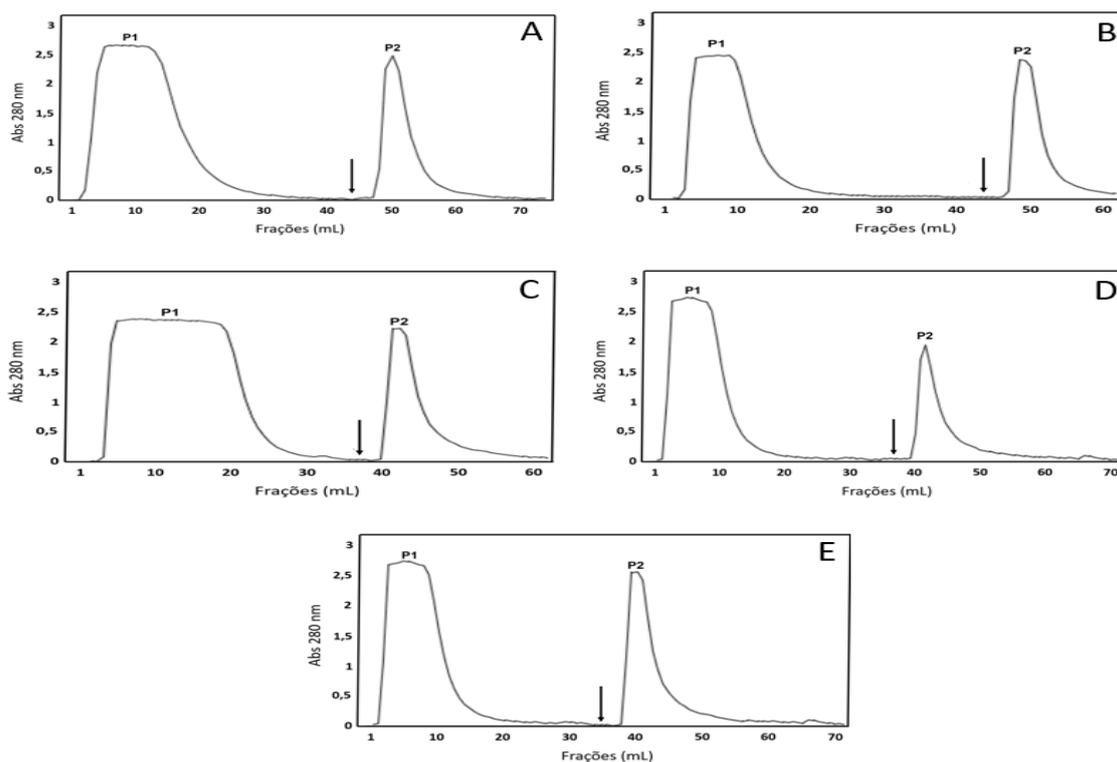
Extratos brutos totais (EBt)	Concentração de proteínas (mg/mL)
EBt de <i>A. incisa</i>	10,7 ± 0,6
EBt de <i>A. integrifolia</i>	9,1 ± 0,2
EBt de <i>A. precatorius</i>	13,1 ± 0,9
EBt de <i>A. pulchellus</i>	11,8 ± 1,2
EBt de <i>R. communis</i> .	12,02 ± 0,7

### 5.7. Avaliação da matriz reticulada de galactomanana na purificação das lectinas galactose-ligantes.

Para avaliar a eficiência da galactomanana reticulada de *P. confertiflora* como matriz cromatográfica de afinidade na purificação de lectinas galactose-ligantes, todos os EBts das farinhas de sementes de *A. incisa*, *A. integrifolia*, *A. precatorius*, *A. pulchellus* e *R. communis* foram utilizados nesta etapa. Os volumes utilizados desses extratos foram ajustados para que todos tivessem a mesma concentração inicial de proteínas solúveis totais (~ 2,8 mg/mL).

Nestes ensaios cromatográficos foi observado que quando submetidos à cromatografia de afinidade em matriz de galactomanana, todos os EBts apresentaram dois picos cromatográficos referentes a uma fração retida (P1) e a uma fração não retida na matriz (P2) (Gráfico 3).

**Gráfico 3.** Purificação das proteínas Frutalina (A), Jacalina (B), Abrina (C), Pulchellina (D) e Ricina (E) por cromatografia de afinidade em matriz de galactomanana reticulada de sementes de *P. confertiflora*. As colunas foram equilibradas e as frações não-retidas (P1) foram eluídas com o tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,6 com NaCl 150 mM. As frações retidas (P2) foram eluídas com galactose 200 mM contendo NaCl 150 mM. As cromatografias foram realizadas em coluna de 5 mL, utilizando um fluxo de 0,75 L/min. coletando frações de 1,5 mL. A seta indica o início da eluição do P2.



Fonte: Autor (2021)

Os primeiros picos (P1) dos referidos EBTs, eluídos com o tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,6 com NaCl 150 mM, não apresentaram atividade lectínica quando submetidos aos ensaios de hemaglutinação. Ressaltando que uma das principais características das lectinas presentes nesses extratos é a capacidade de aglutinar hemácias, principalmente as de coelho (MONTEIRO-MOREIRA, 2002; REDDY *et al.*, 2006; RAMOS *et al.*, 1998). Já os picos secundários (P2), correspondentes as frações lectínicas (Frutalina, Jacalina, Abrina, Pulchellina e Ricina) interagiram e ficaram retidas na matriz, sendo eluídas com uma solução contendo galactose, carboidrato pelo qual essas lectinas possuem afinidade. Quanto a este aspecto, embora a matriz de galactomanana de *P. confertiflora* tenha sido capaz de reter todas as lectinas presentes nos EBts, as concentrações finais das lectinas Frutalina (2,46 mg/mL) e Jacalina (2,48 mg/mL) foram um pouco maiores do que as obtidas para Abrina (2,43 mg/mL), Pulchellina (2,30 mg/mL) e Ricina (2,0 mg/mL). Essas diferenças podem estar relacionadas a especificidade fina dessas lectinas pela galactose ou pela complexidade estrutural dos seus sítios ativos ligantes (OLIVEIRA *et al.*, 2008; AROCKIA *et al.*, 2005; KARSIN *et al.*, 1991; SILVA *et al.*, 2005; SINGH, 2018).

Moreira e colaboradores (2008) isolou pela primeira vez a lectina de sementes de *Artocarpus incisa* utilizando uma matriz de galactomanana de *Adenantha pavonina*

L. reticulada com epiclorigidrina. Cruz (2015) também mostrou que a lectina de *Bauhinia cheilantha* (BcL) pode ser facilmente purificada em uma única etapa quando submetida à cromatografia de afinidade em matriz de galactomanana reticulada de *A. pavonina*. Tais evidências e adição aos resultados observados nesta etapa do trabalho, reforçam que as galactomananas vegetais, após o processamento adequado e reticulação, podem ser eficientes substituintes das matrizes de afinidade comerciais geralmente utilizadas para o isolamento e purificação de proteínas galactose-ligantes.

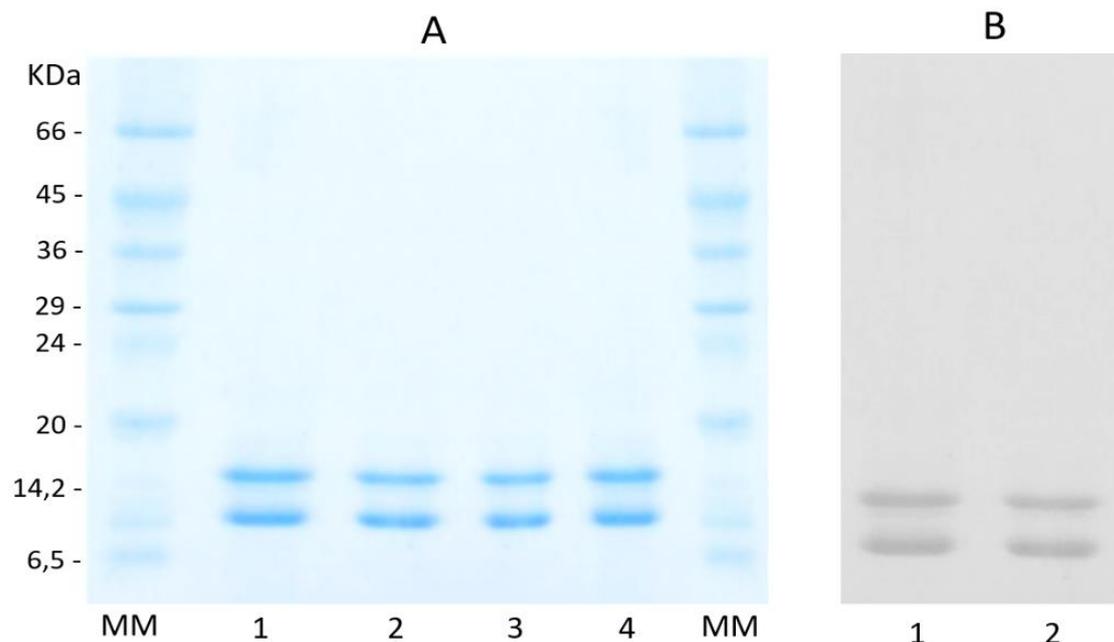
Após rigorosa etapa de diálise para remover o açúcar ligantes, as frações lectínicas obtidas das cromatografias em galactomanana reticulada de *P. confertiflora* foram submetidas ensaios eletroforéticos, de imunodeteccção e de hemaglutinação.

### **5.8. Análise da integridade, pureza e imunodeteccção das lectinas purificadas na matriz de galactomanana reticulada de sementes de *P. confertiflora*.**

As frações dialisadas correspondentes aos picos 2 (frações lectínicas) das cromatografias foram coletadas separadamente, sendo que uma alíquota de 40 µL de cada fração foi submetida a ensaios eletroforéticos e de imunodeteccção para confirmar a integridade, pureza e correspondência da lectina.

O gel SDS-PAGE das alíquotas coletadas dos picos 2 correspondentes as lectinas frutalina e jacalina isoladas na matriz de galactomanana (Figura 5A) apresentou somente duas bandas protéicas homogêneas, com massas moleculares aparente similares (de 12 e 14 KDa) aos normalmente obtidos para essas proteínas (MOREIRA *et al.*, 1998; KABIR, 1998). Esse resultado foi similar ao obtido na purificação dessas lectinas utilizando a matriz comercial Sepharose-4B conforme pode ser observado nas Raias 3 e 4 da figura 5A. Isto indica que a matriz de galactomanana comercial foi tão eficiente quanto a matriz cromatográfica comercial utilizada como controle.

**Figura 5.** (A) SDS-PAGE 12,5% da Frutalina e da Jacalina purificadas em matriz galatomanana reticulada de sementes de *P. confertiflora*. MM: marcadores moleculares; Raia 1: Frutalina; Raia 2: Jacalina; Raia 3: Controle (Frutalina purificada em matriz comercial D-gal); Raia 4: Controle (Frutalina purificada em matriz comercial Sepharose-4B). (B) Imunodeteccção da Frutalina (Raia 1) e da Jacalina (Raia 2) por *Western blot*.

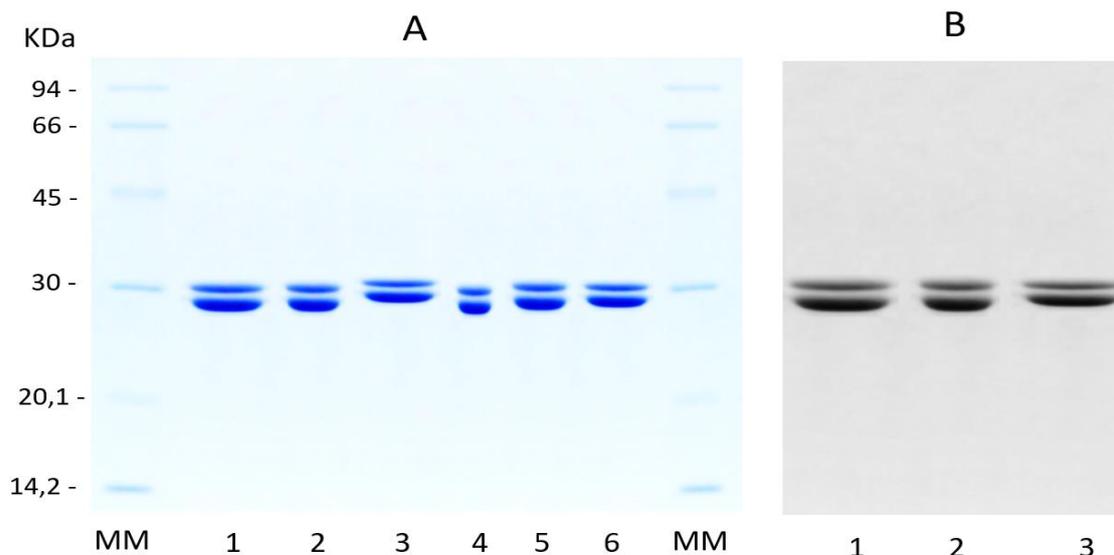


Fonte: Autor (2021)

Para a inteira certificação de que as frações eram referente às lectinas frutalina e jacalina, um ensaio de imunodeteccção foi realizado usando-se a técnica de *Western blot* conforme foi descrito no item 4.13 da metodologia. Como resultado, verificou-se que os anticorpos policlonais anti-frutalina e anti-jacalina (Figura 5B) foram capazes de reconhecer e interagir fortemente com as bandas protéicas das lectinas frutalina e jacalina presentes nas frações referentes aos picos 2 das cromatografias. A confirmação das lectinas por *Western blot* também é um indicativo que essas lectinas purificadas na matriz de galactomanana demonstram um elevado grau de pureza, devido a eficiência dessa matriz.

Já no gel eletroforético referente à análise das alíquotas coletadas dos picos 2 correspondentes as proteínas abrina, pulchellina e ricina (Figura 6A) também foi observado somente duas bandas proteicas com massas moleculares aparente (de 29 e 31 KDa) similares aquelas normalmente obtidas para essas proteínas (RAMOS *et al.*, 1998). É importante destacar que a pulchellina, a abrina e a ricina são heterodímeros e que em condições redutoras elas apresentam duas bandas proteicas de 29 e 31 KDa (referentes as cadeias lectínicas e RNA-*N*-glicosidase, respectivamente). No entanto, sob condições não redutoras elas apresentam apenas uma banda proteica de 60 KDa (OLSNES, 2004).

**Figura 6.** (A) SDS-PAGE 12,5% da Abrina, da Pulchellina e da Ricina purificadas em matriz galatomanana reticulada de sementes de *P. confertiflora*. MM: marcadores moleculares; Raia 1: Abrina; Raia 2: Pulchellina; Raia 3: Ricina; Raias 4 a 6: Controles (Abrina, Pulchellina e Ricina purificadas em matriz comercial Sepharose-4B). (B) Imunodeteccção da Abrina (Raia 1), da Pulchellina (Raia 2) e da Ricina (Raia 3) por *Western blot*.



Fonte: Autor (2021)

Analisando a figura 6B também observou-se que os anticorpos policlonais anti-abrina, anti-pulchellina e anti-ricina foram capazes de reconhecer e interagir fortemente com as bandas protéicas das proteínas abrina, pulchellina e ricina presentes nas frações referentes aos picos 2 obtidos da matriz de galactomanana. Essas lectinas purificadas também apresentaram um grau de pureza satisfatório, uma vez que não foram observados contaminantes e nem evidências de reações cruzadas na membrana de *blotting*.

### 5.9. Avaliação da bioatividade das lectinas via ensaio de hemaglutinação

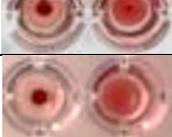
Tratando-se de lectina, o termo aglutinação refere-se ao resultado da interação entre os carboidratos existentes na superfície celular com os sítios de ligação para os mesmos presentes nas lectinas (SINGH *et al.*, 1999). Assim, as lectinas são geralmente detectadas através de ensaios de aglutinação, onde existe a interação com as células, por

meio de seus sítios de ligação aos carboidratos, formando diversas ligações reversíveis entre estas. Isso se deve ao fato de grande parte das lectinas serem di ou polivalentes formando ligações específicas entre carboidratos ou glicoproteínas em solução ou ligadas à membrana celular (CORREIA *et al.*, 2008). O ensaio de hemaglutinação é o mais comumente utilizado para possibilitar a visualização desta propriedade aglutinante dos eritrócitos pelas lectinas, podendo ser utilizados para o ensaio hemácias humanas ou de animais, não tratadas ou tratadas química- e/ou enzimaticamente (SANO e OGAWA, 2014).

Conforme os resultados apresentados na tabela 5, todas lectinas isoladas na matriz de galactomanana foram capazes de aglutinar eritrócitos de coelho a 2% igualmente aquelas isoladas na matriz cromatográfica comercial. No entanto, foi observado que a frutalina e a jacalina apresentaram títulos e valores de UH superiores aos observados para abrina, pulchellina e ricina. Isto ocorre devido as diferenças estruturais nos sítios de ligação dessas proteínas e porque as lectinas frutalina e jacalina apresentam uma maior afinidade pelo tipo sanguíneo testado (MOREIRA *et al.*, 1998; KABIR, 1998; OLIVEIRA *et al.*, 2008; AROCKIA *et al.*, 2005; KARSIN *et al.*, 1991; SILVA *et al.*, 2005; SINGH, 2018). Destacando que a atividade hemaglutinante de uma lectina pode variar quanto a sua especificidade entre eritrócitos de diferentes animais ou dentro do sistema ABO humano (SHARMA *et al.*, 2009; POMPEU *et al.*, 2015).

**Tabela 5.** Atividade hemaglutinante das proteínas Frutalina, Jacalina, Abrina, Pulchellina e Ricina purificadas na matriz de galactomanana reticulada de sementes de *P. confertiflora*.

Proteínas	Título	UH <sup>b</sup>	Cont <sup>c</sup> /Hem <sup>d</sup> .
Frutalina	2 <sup>10</sup>	1.024	
Frutalina– Controle <sup>a</sup>	2 <sup>10</sup>	1.024	

Jacalina	$2^{10}$	1.024	
Jacalina–Controle <sup>a</sup>	$2^{10}$	1.024	
Abrina	$2^{10}$	1.024	
Abrina – Controle <sup>a</sup>	$2^{10}$	1.024	
Pulchellina	$2^9$	512	
Pulchellina – Controle <sup>a</sup>	$2^9$	512	
Ricina	$2^7$	128	
Ricina – Controle <sup>a</sup>	$2^7$	128	

<sup>a</sup>Proteína purificada utilizando a matriz comercial Sepharose-4B

<sup>b</sup>Unidades de hemaglutinação

<sup>c</sup>Controle: Ensaio realizado apenas com NaCl 150 mM e sem hemaglutinação.

<sup>d</sup>Hemaglutinação promovida pela atividade da proteína testada

### 5.10. Atividade RNA *N*-glicosidase das quimerolectinas isoladas em matriz de galactomanana reticulada de sementes de *P. confertiflora*.

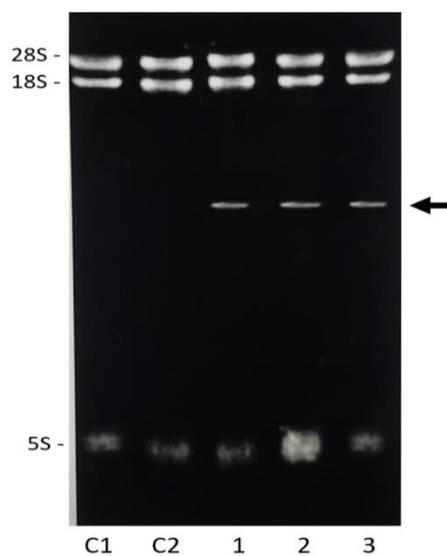
As quimerolectinas, além do domínio ligante a carboidratos, elas possuem um outro domínio não relacionado com este. Na abrina, pulchellina e ricina, esse segundo domínio apresenta uma atividade catalítica RNA-*N*-glicosidase, assim elas também pertencem a classe das Proteínas Inativadoras de Ribossomos (RIPs, do termo em inglês

*Ribosome Inactivating Proteins*). Essas proteínas que promovem a depurinação de uma adenina específica, situada em uma alça exposta do RNA ribossomal 28S, através do rompimento da ligação glicosídica entre a base e a ribose. Com isso, a atividade das RIPs é caracterizada como RNA-*N*-glicosidase (ENDO *et al.*, 1987; ZAMBONI *et al.*, 1989).

A avaliação da atividade RNA-*N*-glicosidase da Abrina, Pulchellina e Ricina purificadas em matriz de galactomanana reticulada de sementes de *P. confertiflora* foi realizada conforme a metodologia descrita por Smith *et al.*, (2003). Esta metodologia, mostra-se como um eficiente teste confirmatório da atividade enzimática das RIPs e o resultado pode facilmente ser observado através de uma eletroforese em gel de agarose/formamida.

Como resultado da atividade RNA *N*-glicosidase (Figura 7), todas as amostras de RNA ribossomal (rRNA) de *Pichia pastoris* tratadas com a abrina, a pulchellina e com a ricina (isoladas na matriz de galactomanana) apresentaram uma banda similar ao fragmento de Endo. Este fragmento é uma sequência de aproximadamente 370 nucleotídeos liberada da subunidade e 28S do rRNA e detectado após o tratamento com anilina (ENDO *et al.*, 1987; STIRPE *et al.*, 1988; SMITH *et al.*, 2003). Este fragmento diagnóstico da atividade RNA *N*-glicosidase não foi detectado nas amostras controle (contendo apenas o rRNA e o rRNA tratado somente com a anilina).

**Figura 7.** Análise da atividade RNA *N*-glicosidase *in vitro* da Abrina, Pulchellina e Ricina purificadas em matriz de galactomanana reticulada de sementes de *P. confertiflora*. C1: Controle 1 (RNAr não tratado); C2: Controle 2 (RNAr tratado apenas com anilina); Raia 1: RNAr tratado com Abrina; Raia 2: RNAr tratado com Pulchellina; Raia 3: RNAr tratado com a Ricina. A seta indica o fragmento de Endo liberado e detectado após o tratamento com anilina.



Fonte: Autor (2021)

Esses dados confirmam que as quimerolectinas isoladas na matriz de galactomanana de *P. confertiflora*, além de apresentarem atividade hemaglutinante típico das lectinas, elas também apresentam suas atividades rRNA-*N*-glicosidase preservadas.

## 6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados, pode-se concluir que as sementes de jatobá-de-brinco (*P. confertiflora*) são uma excelente fonte para obtenção de galactomananas que, após processadas e reticuladas, funcionam como uma eficiente matriz cromatográfica de afinidade para a purificação de lectinas galactose-ligantes.

O presente estudo demonstrou que o potencial uso de galatomananas vegetais como insumo biotecnológico destinado a purificação de biomoléculas pode contribuir para valorização dos recursos naturais do semiárido brasileiro, adicionado valor agregado aos seus produtos.

## REFERÊNCIAS

ALVES, R. C. Caracterização de gomas extraídas de seis tipos de sementes de leguminosas. **Trabalho para obtenção de título de mestrado**. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2013.

ANDRADE, C. T. et al. Solution properties of the galactomannans extracted from the seeds of *Caesalpinia pulcherrima* and *Cassia javanica*: comparison with locust bean gum. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 26, n. 2-3, p.181-185, nov. 1999

APPUKUTTAN, P. S.; SUROLIA, A.; BACHAWAT, B. K. Isolation of two galactose-binding proteins from *Ricinus communis* by affinity chromatography. **Indian journal of biochemistry e biophysics**, v. 14, n. 4, p. 382-384, 1977.

AROCKIA JA, JAYASHREE G, MAHANTA SK, SWAMINATHAN CP, SEKAR K, SUROLIA A, VIJAYAN M. Structural basis for the energetics of jacalin-sugar interactions: promiscuity versus specificity. **J Mol Biol**,v. 347, n. 1, p.181-8, 2005.

AXELOS, M. A. V. et al, Rheology of pectin dispersions and gels. **The chemistry and technology of pectin**, p. 227-250, 1991.

AZERO, E. G.; ANDRADE, C. T. Extraction and characterization of the galactomannan from the seeds of *Caesalpinia pulcherrima*. **Polímeros**, v. 9, n. 2, p. 54-59, 1999.

AZERO, E. G.; ANDRADE, C. T. Testing procedures for galactomannan purification. **Polymer Testing**, [s.l.], v. 21, n. 5, p.551-556, jan. 2002.

AZEVEDO, C. F. Algarobeira na alimentação animal e humana. Algarobeira na alimentação animal e humana. **Simpósio Brasileiro Sobre Algaroba**, 1982b.

AZEVEDO, G. de. Algaroba. **Publicação**. Rio de Janeiro: Ed. Serviço de Informação Agrícola, v. 843, 1982.

AZEVEDO, G. F. Como e porque a algarobeira será introduzida no Nordeste. **Simpósio Brasileiro Sobre Algaroba**, v. 1, p. 300-306, 1982a.

AZERO, E. G.; ANDRADE, C. T. Extração e caracterização da galactomanana de sementes de *Caesalpinia pulcherrima*. **Polímeros**, v. 9, n. 2, p.54-59, 1999.

BAVEJA, S. K.; RANGA RAO, K. V.; ARORA, J.; MATHUR, N. K.; VINAYAK, V. K.. Chemical investigations of some galactomannan gums as matrix tablets for sustained drug delivery. **Indian journal of chemistry. Sect. B: Organic chemistry, including medical chemistry**, v. 30, n. 2, p. 133-137, 1991.

BEMILLER, J. N. An introduction to pectins: structure and properties. **Chemistry and function of pectins**, v. 310, p. 2-12, 1986.

BENTO, J. F.; MAZZARO, I.; DE ALMEIDA SILVA, L. M.; DE AZEVEDO MOREIRA, R.; FERREIRA, M. L.; REICHER, F.; DE OLIVEIRA PETKOWICZ, C. L. Diverse patterns of cell wall mannan/galactomannan occurrence in seeds of the Leguminosae. **Carbohydrate Polymer**, v. 92, n. 1, p. 192-9, 2013.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. Seeds: Physiology of development and germination. Plenum, New York. **Seeds: Physiology of development and germination. Plenum, New York.**1985.

BRAGA, R. C; TEIXEIRA-SÁ, D. M. A.; RIBEIRO, A. F.; MIRANDA, R. L.; ALMEIDA, L. M. D., HORTA, A. C. G.; MOREIRA, R. A. Evaluation of *Caesalpinia Pulcherrima* endospermic gum as affinity matrices for galactose-binding lectins interaction. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, n. 2, p. 283-292, 2011.

BRESOLIN, T. M. B.; MILAS, M.; RINAUDO, M.; REICHER, F.; GANTER, J. L. M. S. Role of galactomannan composition on the binary gel formation with xanthan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 26, n. 4, p. 225-231, 1999.

BOURBON, A. I.; PINHEIRO, A. C.; RIBEIRO, C.; MIRANDA, C.; MAIA, J. M.; TEIXEIRA, J. A.; VICENTE, A. A. Characterization of galactomannans extracted from seeds of *Gleditsia triacanthos* and *Sophora japonica* through shear and extensional rheology: comparison with guar gum and locust bean gum. **Food Hydrocolloids**, v. 24, n. 2-3, p.184-192, 2010.

BUCKERIDGE, M. S.; DIETRICH, S. M. C. Galactomannan from Brazilian legume seeds. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 13, n. 1, p. 109-112, 1990.

BUCKERIDGE, M. S.; PANEGASSI, V. R.; ROCHA, D. C.; DIETRICH, S. M. Seed galactomannan in the classification and evolution of the Leguminosae. **Phytochemistry**, v. 38, n. 4, p. 871-875, 1995.

BURITI, F. C. A.; SANTOS, K. M. O.; SOMBRA, V. G.; MACIEL, J. S.; SÁ, D. M. A. T.; SALLES, H. O.; OLIVEIRA, G.; PAULA, R. C. M.; FEITOSA, J. P. A.; MOREIRA, A. C. O. M.; MOREIRA, R. A.; EGITO, A. S. Characterisation of partially hydrolysed galactomannan from *Caesalpinia pulcherrima* seeds as a potential dietary fibre. **Food Hydrocolloids**, v. 35, p.512-521, 2014.

BUCKERIDGE, M. S.; TINÉ, M. A. S.; SANTOS, H. P.; LIMA, D. U. Polissacarídeos de reserva de parede celular em sementes. Estrutura, metabolismo, funções e aspectos ecológicos. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12 (Edição especial), p. 137-162, 2000.

BURKART, A. A monograph of the genus *Prosopis* (Leguminosae subfam. Mimosoideae). **Journal of the Arnold Arboretum**, v. 57, p. 219-249, 1976.

CATÁLOGO DE PLANTAS E FUNGOS DO BRASIL. (2010) [organização Rafaela Campostrini Forzza... *et al* ]-Rio de Janeiro: Andrea Jakobosson estúdio: Instituto de pesquisas jardim Botânico do Rio de Janeiro.2.v. p. 1075

CAMPELO, C. R. **Algaroba: planta mágica**. Edições Edificantes, 1997.

CANEVAROLO, J. R. S. V. Técnicas de caracterização de polímeros. **Artliber, São Paulo**, v. 430, n. 2004, 2004.

CERQUEIRA, M. A.; BOURBON, A. I.; PINHEIRO, A. C.; MARTINS, J. T.; SOUZA, B. W. S.; TEIXEIRA, J. A.; VICENTE, A. A. Galactomannans use in the development of edible films/coatings for food applications. **Trends in Food Science e Technology**, v. 22, n. 12, p. 662-671, 2011.

CERQUEIRA, M. A.; PINHEIRO, A. C.; SOUZA, B. W. S.; LIMA, Á. M. P.; RIBEIRO, C.; MIRANDA, C.; TEIXEIRA, J. A.; MOREIRA, R. A.; COIMBRA, M. A.; GONÇALVES, M. P.; VICENTE, A. A. Extraction, purification and characterization of galactomannans from non-traditional sources. **Carbohydrate polymers**, v. 75, n. 3, p. 408-414, 2009.

CHAIRES-MARTÍNEZ, L.; SALAZAR-MONTOYA, J.A.; RAMOS-RAMÍREZ, E. G.; Physicochemical and functional characterization of the galactomannan obtained from mesquite seeds (*Prosopis pallida*). **Eur Food Res Technol**, v. 227, p. 1669-1676, 2008.

CHICHARRO, M. 2005. Cromatografía, principios y aplicaciones. Análisis Químico. [http://www.uam.es/personal\\_pdi/ciencias/mo nchi/alim/traba3.pdf](http://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/mo nchi/alim/traba3.pdf) .

CRISÓSTOMO, C. V. Polissacarídeo Endospermico de *Bauhinia Pentandra*: Caracterização e Estudo de Interação com Lectina. Trabalho para obtenção de título de doutorado. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2008.

CRUZ, D. R. R. Isolamento, purificação e caracterização parcial da lectina de folhas de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel, nativa do bioma caatinga / Deize Raquel dos Reis Cruz—Petrolina, 2015. 89p.

COMPTON, S. J; JONES, C. G. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. **Anal Biochem**, v. 151, n. 2, p. 369-74 , 1985.

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.

CORTE, V. B.; BORGES, E. E. L.; PONTES, C. A; LEITE, I. T. A.; VENTRELLA, M. C., MATHIAS, A. A. Mobilização de reservas durante a germinação das sementes e crescimento das plântulas de *Caesalpinia peltophoroides* Benth.(Leguminosae-Caesalpinioideae). **Revista Árvore**, v. 30, n. 6, p. 941-949, 2006.

CUI, W.; ESKIN, N. A. M.; BILIADERIS, C. G.; MAZZA, G. Synergistic interactions between yellow mustard polysaccharides and galactomannans. **Carbohydrate polymers**, v. 27, n. 2, p. 123-127, 1995.

CUNHA, P. L. R.; VIEIRA, I. G. P.; ARRIAG, A. M. C.; PAULA, R. C. M.; FEITOSA, J. P. A. Isolation and characterization of galactomannan from *Dimorphandra gardneriana* Tul. seeds as a potential guar gum substitute. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 3, p. 880-885, 2009.

DA CUNHA, P. L. R.; PAULA, R. C. M.; FEITOSA, J. P. A. Polissacarídeos da biodiversidade brasileira: uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 649-660, 2009.

DAKIA, P. A.; BLECKER, C.; ROBERT, C.; WATHELET, B.; PAQUOT, M. Composition and physicochemical properties of locust bean gum extracted from whole seeds by acid or water dehulling pre-treatment. **Food Hydrocolloids**, v. 22, n. 5, p. 807-818, 2008.

DAKIA, P. A.; WATHELET, B.; PAQUOT, M. Isolation and chemical evaluation of carob (*Ceratonia siliqua* L.) seed germ. **Food Chemistry**, v. 102, p.1368-1374, 2007.

DEA, I. C. M.; CLARK, A. H.; McCLEARY, B. V. Effect of galactose substitution-pattern on the interaction properties of galactomannans. **Carbohydrate Research**, v. 147, p. 275-294, 1986.

DEA, I. C. M.; MORRISON, A. Chemistry and interactions of seed galactomannans. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, v. 31, p. 241-312, 1975.

DURANTINI, M.; CONSONNI, A.; MAGNI, C.; SESSA, F.; SCARAFONI, A. The major proteins of lupin seed: Characterisation and molecular properties for use as functional and nutraceutical ingredients. **Trends in Food Science & Technology**, v. 19, n. 12, p. 624-633, 2008.

EDWARDS, M.; BULPIN, P. V.; DEA, I. C. M.; REID, J. S. G. Biosynthesis of legume-seed galactomannans in vitro. **Planta**, v. 178, n. 1, p. 41-51, 1989.

EGOROV, A. V.; MESTECHKINA, N. M.; PLENNIK, R. Y.; SHCHERBUKHIN, V. D. Water-soluble galactomannans from the seeds of ground honey suckle (*Lotus corniculatus* L.): structure and properties. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 39, n. 5, p. 509-511, 2003.

FERNANDER, P. B.; DOUBLIER, J. L. Kappa-carrageenan/galactomannan mixed gels. **Carbohydrate Polymers**, v. 16, p. 253-274, 1991.

FERNANDES, P. B.; GONCALVES, M. P.; DOUBLIER, J-L. Rheological behaviour of kappa-carrageenan/galactomannan mixtures at a very low level of kappa-carrageenan. **Journal of texture studies**, v. 25, n. 3, p. 267-283, 1994.

FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004.

GALLARDO, K.; THOMPSON, R.; BURSTIN, J. Reserve accumulation in legume seeds. **Comptes Rendus Biologies**, v. 331, n. 10, p. 755-62, 2008.

GARROS-ROSA, I.; REICHER, F.; PETKOWICZ, C. L.; SIERAKOWSKI, M. R.; MOREIRA, R. A. Characterization of the galactomannans from *Parkinsonia aculeata* seeds and their application on affinity chromatography. **Polímeros**, v. 16, n. 2, p. 99-103, 2006.

GARTI, N.; MADAR, Z.; ASERIN, A.; STERNHEIM, B. Fenugreek galactomannans as food emulsifiers. **LWT - Food Science and Technology**, v. 30, n. 3, p. 305-311, 1997.

GRASDALEN, H.; PAINTER, T. NMR studies of the composition and sequence in legume-seed galactomannans. **Carbohydrate Research**, v.81, p.59–66, 1980.

GIANCONE, T.; TORRIERI, E.; DI PIERRO, P.; CAVELLA, S.; GIOSAFATTO, C. V. L.; MASI, P. Effect of surface density on the engineering properties of high methoxyl pectin based edible films. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, p. 1228-1236. 2011

GOMES, P. A algarobeira. **Publicação. Rio de Janeiro: Ed. Serviço de Informação Agrícola**, p. 49, 1961.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, [S.l.], v. 27, p. 1-93, 2006.

GOOR, A. Y.; BARNEY, C. W. **Forest tree planting in arid zones**. New York: Ronald Press Company, 2 ed., 1976, p. 504.

GRETHER, R.; MARTINEZ-BERNAL, A.; LUCKOW, M.; ZÁRATE, S. GRETHER, R. Flora del valle de Tehuacán-Cuicatlán. **Instituto de Biología. UNAM**, p. 44, 2006.

GUZMÁN, J. M.; HERNANDEZ, G. L. Anatomía de la semilla y germinación de *Turbina corumbosa* (L.) Raf., Convolvulaceae. **Phyton**, v. 42, p. 1-8, 1982.

HAYASHI, T. Xyloglucans in the primary cell wall. **Annual review of plant biology**, v. 40, n. 1, p. 139-168, 1989.

HIRST, E. L.; JONES, J. K. N.; WALDER, W. O. 230. Pectic substances. Part VII. The constitution of the galactan from *Lupinus albus*. **Journal of the Chemical Society (Resumed)**, p. 1225-1229, 1947.

HUECK, K. **As florestas da América do Sul:** ecologia, composição e importância econômica, p. 466. São Paulo: Polígono, 1972, p. 466.

JOSHI, H.; KAPOOR, V. P. Cassia grandis Linn. f. seed galactomannan: structural and crystallographical studies. **Carbohydrate Research**, v. 338, n. 18, p. 1907-1912, 2003.

KAPOOR, V.P.; TARAVEL, F. R.; JOSELAU, J-P; MILAS, M.; CHANZY, H., RINAUDO. M. Cassia spectabilis DC seed galactomannan: Structural, crystallographical and rheological studies. **Carbohydrate Research**, v.306, p.231–241, 1998.

KAISER, C. R. RMN 2D: Detecção inversa e gradientes de campo na composição estrutura de compostos orgânicos. **Química Nova**, v.23 , p.231-236, 2000.

Kabir S. Jacalin: a jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seed-derived lectin of versatile applications in immunobiological research. *J Immunol Methods*. 1998 Mar 15;212(2):193-211.

KARZIN, B.J., COLLINS, E.J., ROBERTUS, J.D. Structure of ricin A-chain at 2.5 Å. *Proteins: Struct. Funct. Genet.*, v.10, p. 251-259, 1991.

KEULEMANS, A. I. M. 1959. “Gas Chromatography”, Second Edition, Reinhold Publisher Corp. New York (USA).

KÖK, M. S.; HILL, S. E.; MITCHELL, J. R. Viscosity of galactomannans during high temperature processing: influence of degradation and solubilisation. **Food Hydrocolloids**, v. 13, n. 6, p. 535-542, 1999.

KRISHNAIAH, Y. S. R.; KARTHIKEYAN, R. S.; SANKAR, V. G.; SATYANARAYANA, V. Three-layer guar gum matrix tablet formulations for oral controlled delivery of highly soluble trimetazidine dihydrochloride. **Journal of controlled release**, v. 81, n. 1-2, p. 45-56, 2002.

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

LEITE, A. T. Caracterização Biofísica da Frutalina Recombinante e sua Aplicação na Purificação de Imunoglobulinas  $\alpha 1$  (SIgA1) Secretoras Humanas. **Trabalho para obtenção de título de mestrado**. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2016.

LEITE, L. L. B. Aplicação da espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear quantitativa de Hidrogênio (RMNq1H) na área farmacêutica e afins. **Trabalho para obtenção de título de mestrado**. Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2013.

LI, C. B., HEIN, S., WANG, K. Biosorption of chitin and chitosan. *Materials Science and Technology*, v. 24, n. 9. P. 1088–1099, 2008.

LIMA, P. C. F. Comportamento silvicultural de espécies de *Prosopis*, em Petrolina-PE, região semiárida brasileira. **Trabalho para obtenção de título de doutorado**. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 1994.

LIMA, G. C. Extração da Galactomanana por Diferentes Métodos e Caracterização das Vagens de Algaroba (*Prosopis juliflora*). **Trabalho para obtenção de título de mestrado**. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2015.

LINS E SILVA, A. C. B. Characteristics of *Prosopis juliflora* invasion of semi-arid habitats in Northeast Brazil. 1997. **Trabalho para obtenção de título de doutorado**. University of Durham, Durham, 1997

LIMA, S. J. Obtenção de Imunoglobulina G em Leite, Creme, Manteiga e leiteiro pelo Método Gravimétrico. **Trabalho para obtenção de título de mestrado**. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2017.

LIMA, H.C. de (2010). *Peltogyne in Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB078741>> Acesso: Janeiro de 2020.

LIYANAGE, S.; ABIDIA, N.; AULDB, D.; MOUSSACA, H. Chemical and physical characterization of galactomannan extracted from guar cultivars (*Cyamopsis tetragonolobus L.*), **Industrial Crops and Products**, v.74, p. 388-396. 2015.

LOBO, G, A. Ensaio Para a Validação de Metodologias para Germinação de Diásporos de Espécies Arbóreas do Cerrado. **Trabalho para obtenção de título de mestre**. Universidade Federal do Uberlândia. Uberlândia, 2012.

LORENZI, H. 1998. **Arvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas brasileiras**. Nova Odessa (SP): Editora Plantarum, v.1. 1<sup>a</sup> ed., 352 p

MANZI, A.E.; CERZO, A.S.; SHOOKERY, J.N. High Resolution <sup>13</sup>C-N.M.R. Spectroscopy of Legume-seed Galactomannans. **Carbohydrate Research**, v.148, p.189–197, 1986.

MARTINS, J. T., CERQUEIRA, M. A., BOURBON, A. I., PINHEIRO, A. C., SOUZA, B. W. S., & VICENTE, A. A. Synergistic effects between k-carrageenan and locust bean gum on physicochemical properties of edible films made thereof. **Food Hydrocolloids**, v. 29, p. 280- 289. 2012.

MENDES, F. R. da S. Blendas e Filmes de Galactomanana e Xiloglucana: Caracterização Físico-Química. **Trabalho para obtenção de título de mestrado**. FORTALEZA, Ceará, 2015.

MENDES, B. V. Potencialidades de utilização da algarobeira (*Prosopis juliflora* (SW) DC) no semi-árido brasileiro. **Mossoró: Coleção Mossoroense**, v. 1, n. 3, 1987.

MIKKONEN, K. S.; RITA, H.; HELÉN, H.; TALJA, R. A.; HYVÖNEN, L.; TENKANEN, M. Effect of polysaccharide structure on mechanical and thermal properties of galactomannan-based films. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 10, p. 3198-3205, 2007.

MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O. Caracterização estrutural de três lectinas com especificidades por açúcar distintas, isoladas de sementes de fruta-pão (*Artocarpus*

*incisa* L.) **Trabalho para obtenção de título de doutorado**. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Universidade Federal do Ceará. 110p. Fortaleza, Ceará. 2002.

MOREIRA, R. A. Desenvolvimento de um novo método para o isolamento de lectinas ligantes de galactose, por cromatografia de afinidade. In: VI Reunião Regional da SBBq, 2002, Fortaleza. Anais da VI Reunião Regional da SBBq, 2002. p. 1-9

MOREIRA, R. A.; PERRONE, J. C. Purification and Partial Characterization of a Lectin from *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiology**, v. 59, p. 783-787, 1977. MOREIRA, R. A.; CASTELO-BRANCO, C. C.; MONTEIRO, A. C.; TAVARES, R. O.; BELTRAMINI, L. M. Isolation and partial characterization of a lectin from *Artocarpus incisa* L. seeds. **Phytochemistry**, v. 47, n. 7, p. 1183-1188, 1998.

MU, C.; GUO, J.; LI, X.; LIN, W.; LI, D. Preparation and properties of dialdehyde carboxymethyl cellulose crosslinked gelatin edible films. **Food Hydrocolloids**, p. 27, p. 22- 29. 2012.

NASCIMENTO, R. M. Utilização da algaroba (*Prosopis juliflora*) como plataforma para obtenção de bionanocompósito. **Trabalho para obtenção de título de mestrado**. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2014.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre: Artmed, 6ª edição, 2014. ISBN 9781429234146.

NKAFAMIYA, I. I.; BARMINAS, J. T.; ALIYU, B. A.; OSEMEAHON, S. A. Swelling behaviour of konkoli (*Maesopsis eminii*) galactomannan hydrogels. **International Research Journal Plant Science**, v. 2, n. 3, p. 78-86, 2011.

NOBRE, F. V. A algarobeira no Nordeste brasileiro, especialmente no Rio Grande do Norte. **I Simpósio Brasileiro sobre algaroba**. EMPARN, documento, v. 7, 1982.

OLIVEIRA, V. B.; YAMADA, L. T.; FAGG, C. W.; BRANDÃO, M. G. L. Native foods from Brazilian biodiversity as a source of bioactive compounds. **Food Research International**, v. 48, n. 1, p. 170-179, 2012.

OLIVEIRA C, FELIX W, MOREIRA RA, TEIXEIRA JA, DOMINGUES L. Expression of frutalin, an alpha-D-galactose-binding jacalin-related lectin, in the yeast *Pichia pastoris*. **Protein Expr Purif**, v. 60, n. 2, p.188-93, 2008.

OLSNES, S. The history of ricin abrin and related toxins. *Toxicon. official journal of the International Society on Toxinology*, v. 44, p. 361-70, 2004..

OLSNES, S.; REFSNES, K.; PIHL, A. Mechanism of action of the toxic lectins abrin and ricin. **Nature**, v. 249, n. 5458, p. 627, 1974.

PAVARINI, D. P.; PAVARINI, S. P.; NIEHUES, M.; LOPES, N. P. Exogenous influences on plant secondary metabolite levels. **Animal Feed Science and Technology**, v. 176, n. 1-4, p. 5-16, 2012.

PETKOWICZ, C.L.; SIERAKOWSKI, M.-R.; GANTER, J.M.L.S; REICHER, F. Galactomannans and Arabinans from the seeds of Caesalpiniceae. *Phytochemistry*, v. 49, n. 3, p. 737-743, 1998.

PEREIRA, D. R. **Purificação, Caracterização e Atividades Biológicas de Proteína de Folhas de *Indigofera suffruticosa*. Trabalho para obtenção de título de doutorado.** Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2013.

PINHEIRO A. C.; CERQUEIRA M. A.; SOUZA, B. W. S.; MARTINS J. T.; TEIXEIRA J. A.; VICENTE, A. A. Utilização de revestimentos/filmes edíveis para aplicações alimentares. **Boletim de Biotecnologia**, n. 85, p. 18-28, 2010.

PINHEIRO, A. C.; BOURBON, A. I.; ROCHA, C.; RIBEIRO, C.; MAIA, J. M.; GONÇALVES, M. P.; VICENTE, A. A. Rheological characterization of κ-carrageenan/galactomannan and xanthan/galactomannan gels: Comparison of

galactomannans from non-traditional sources with conventional galactomannans. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 2, p. 392-399, 2011.

PLANTAS DO BRASIL. Leguminosea-Fabacea. [http://rubens-plantasdobrasil.blogspot.com/2015/07/blog-post\\_22.html](http://rubens-plantasdobrasil.blogspot.com/2015/07/blog-post_22.html). Acesso: 29/03/2020.

POVINELI, K.L.; FINARDI FILHO, F., The multiple functions of plant lectins. **Nutrire; rev. Soc. Bras. Alim. Nutr.= J. Brazilian Soc. Food Nutr.**, São Paulo, SP. , v.24, p.135-156, dez., 2002

PRAJAPATI, V. D.; JANI, G. K.; MORADIYA, N. G.; RANDERIA, N. P.; NAGAR, B. J.; NAIKWADI, N. N.; VARIYA, B. C. Galactomannan: a versatile biodegradable seed polysaccharide. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 60, p. 83-92, 2013.

PRATUSH, A.; SHARMA, M.; SETH, A.; BHALLA, T. C. Seeds of rosary pea, *Abrus precatorius*: A novel source of hydroxynitrile lyase. **J Biochem Tech**, v. 3, n. 2, p. 274-279, 2011.

RAMOS, M.V., MOTA, D.M., TEIXEIRA, C.R., CAVADA, B.S., MOREIRA, R.A. Isolation and partial characterization of highly toxic lectins from *Abrus pulchellus* seeds. **Toxicon**, v. 36, n. 3, p. 477-484, 1998.

REDDY, M. V. B.; BANIK, N. L.; SASIKALA, P. Extraction and Purification of Lectin from Plant Seeds an Empirical Study on *Artocarpus Sp.* **International Journal of Research in Ayurveda & Pharmacy**,v.7, p. 236-240, 2016.

REID, J.; MEYER, H. Chemotaxonomic aspects of the reserve galactomannans in leguminous seeds. **Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie**, v. 62, n. 1, p. 89-92, 1970.

REID, J.S.G. Structure and function in legumeseed polysaccharides. **SEBS 28 Biochemistry of Plant Cell Walls**, v. 70, p. 259, 1985.

RIBEIRO, E.S.; VARGAS, L.E.P.; DE PAULA, M.H.; CAMPOS, A.N. PROPRIEDADES TECNOLÓGICAS DA ESPÉCIE *Peltogyne confertiflora* (Mart. ex Hayne) Benth. **Biodiversidade** - V.18, N1, 2019.

RIZZINI, C.T. 1971. *Árvores e madeiras úteis do Brasil*: manual de dendrologia brasileira. São Paulo: Edgard Blücher, 296 p.

RIBASKI, J. Comportamento de algaroba (*Prosopis juliflora* (SW) DC) e do capim-búfel (*Cenchrus ciliaris* L.) em plantio consorciado, na região de Petrolina, PE. **Revista da Associação Brasileira de Algaroba**, v. 1, n. 2, 1987.

ROOS, Y., & KAREL, M.; Amorphous state and delayed ice formation in sucrose solutions. **Int. J. Food Sci. Technol.**, v. 26, p. 553-566, 1991.

ROMERO, J.C.T.,<sup>1</sup> 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, p. 63-69, 2017.

SALVALAGGIO, M. O. Galactomananas de sementes de espécies brasileiras: otimização da extração, caracterização físico-química e por espalhamento de luz. **Trabalho para obtenção de título de mestrado.** Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

SANO, K.; OGAWA, H. (2014). Hemagglutination (Inhibition) Assay. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.). 1200. 47-52.

SCHORSCH, C.; GARNIER, C.; DOUBLIER, J-L. Viscoelastic properties of xanthagalactomannan mixtures: comparison of guar gum with locust bean gum. **Carbohydrate Polymers**, v. 34, n. 3, p. 165-175, 1997.

SCHULZE, E.; STEIGER, E. Zur Kenntnis des Paragalaktans. Landwirtsch. Vers. Stn, v. 41, p. 223-229, 1892.

SESHAGIRIRAO, K.; LEELAVATHI, C.; SASIDHAR, V. Cross-linked leucaena seed gum matrix: an affinity chromatography tool for galactose-specific lectins. **BMB Reports**, v. 38, n. 3, p. 370-372, 2005.

SILVA, A. L.; GOTO, L. S.; DINARTE, A. R.; HANSEN, D.; MOREIRA, R. A.; BELTRAMINI, L. M.; ARAÚJO, A. P. Pulchellin, a highly toxic type 2 ribosome-inactivating protein from *Abrus pulchellus*. Cloning heterologous expression of A-chain and structural studies. **FEBS J.**, v. 272, n. 5, p.1201-10, 2005

SILVA, A. L. C.; HORTA, A. C. G.; MOREIRA, R. A. Isolation and partial characterization of a lectin from *Bauhinia pentandra* (Bong) Vog. ex. Steua. Braz. J. **Plant Physiol.**, v.13, p. 262-269, 2001.

SILVA, H. C. *et al.*, Purification and partial characterization of a new pro-inflammatory lectin from *Bauhinia bauhinioides* Mart (Caesalpinoideae) seeds. **Protein Pept Lett.**, v.18, n. 4, p. 396– 402, 2011.

SILVA, M. I. G. *et al.*, Bioactivity and potential therapeutic benefits of some medicinal plants from the Caatinga (semi-arid) vegetation of Northeast Brazil: a review of the. **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy.**, v. 22, n. 1, p. 193-207, 2012.

SILVA, M. F., (1976). Revisão taxonômica do gênero *Peltogyne* Vog. (Leguminosae - Caesalpinioideae). *Acta Amazonica* 6(1): 1-61 (supl.).

SINGH, R. S.; TIWARY, A. K.; KENNEDY, J. F. Lectins: Sources, Activities, and Applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 19, p. 145-178, 1999.

SINGH, S. (2018), A Review- Structure-Function studies of Abrin: A ribosome inactivation toxin. *The FASEB Journal*, 32: 1b40-1b40.

SITTIKIYOTHIN, W.; TORRES, D.; GONÇALVES, M. P. Modelling the rheological behaviour of galactomannan aqueous solutions. **Carbohydrate Polymers**, v. 59, n. 3, p. 339-350, 2005.

SOUZA, C. F.; LUCYSZYN, N.; FERRAZ, F. A.; SIERAKOWSKI, M. R. *Caesalpinia ferrea* var. *ferrea* seeds as a new source of

partially substituted galactomannan. **Carbohydrate Polymers**, Curitiba, v. 82, n. 3, p. 641-647, 2010.

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

SRIVASTAVA, M.; KAPOOR, V. P. Seed galactomannans: an overview. **Chemistry e Biodiversity**, v. 2, n. 3, p. 295-317, 2005.

STEPHEN, A. M.; PHILLIPS, G. O. **Food polysaccharides and their applications**. Florida: CRC press, 2016, Cap. 2, 6, 10 e 13.

SOUZA, C. F. de et al. *Caesalpinia ferrea* var. *ferrea* seeds as a new source of partially substituted galactomannan. **Carbohydrate Polymers**, [s.l.], v. 82, n. 3, p.641-647, out. 2010

ŠUBARIĆ, D.; BABIĆ, J.; AČKAR, D.; PILIŽOTA, V.; KOPJAR, M.; LJUBAS, I.; IVANOVSKA, S. Effect of galactomannan hydrocolloids on gelatinization and retrogradation of tapioca and corn starch. **Croatian Journal of Food Science and Technology**, v. 3, n.1, p.26-31, 2011.

SUTHERLAND, I. W. Em *Polysaccharides: structural diversity and functional versatility*; Dumitriu, S., ed.; Marcel Dekker: New York, 2nd ed., 2005, Cap. 16.

TAVARES, R. Galactomanana de *Adenanthera pavonin* L. Aplicação para o Isolamento de Lectinasgalactose-especifica. **Trabalho para obtenção de título de mestrado**. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, Ceara, 2013.

TONZANI, S. **Journal of Applied Polymer Science**, v.126, 2012.

VENDRUSCOLO, C. W.; ANDREAZZ, I. F.; GANTER, J. L. M. S.; FERRERO, C.; BRESOLIN, T. M. B. Xanthan and galactomannan (from *M. scabrella*) matrix tablets

for oral controlled delivery of theophylline. **International journal of Pharmaceutics**, v. 296, n. 1-2, p. 1-11, 2005.

VENDRUSCOLO, C. W. et al. Physicochemical and mechanical characterization of galactomannan from *Mimosa scabrella*: Effect of drying method. **Carbohydrate Polymers**, [s.l.], v. 76, n. 1, p.86-93, mar. 2009.

VIEIRA, Í. G. P.; MENDES, F. N. P.; GALLÃO, M. I.; DE BRITO, E. S. NMR study of galactomannans from the seeds of mesquite tree (*Prosopis juliflora* (Sw) DC). **Food Chemistry**, v. 101, n. 1, p. 70-73, 2007.

VON MAYDELL, H. J. Tree and shrub species for agroforestry systems in the Sahelian zone of Africa. In: **Proceedings of the Eighth World Forestry Congress, Jakarta, 16-28 Oct. 1978.: World Forestry Congress: Forestry for food.** 1978.

WHITE, E.V.; RAO, P.S. **Journal of the American Chemical Society**, v. 75, p. 2617, 1953.

## ANEXO A – Parecer do SISGEN



Ministério do Meio Ambiente  
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Certidão  
Cadastro n° AE23AF6

Declaramos, nos termos do art. 41 do Decreto n° 8.772/2016, que o cadastro de acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado, abaixo identificado e resumido, no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado foi submetido ao procedimento administrativo de verificação e não foi objeto de requerimentos admitidos de verificação de indícios de irregularidades ou, caso tenha sido, o requerimento de verificação não foi acatado pelo CGen.

Número do cadastro: AE23AF6  
 Usuário: Universidade Federal do Ceará  
 CPF/CNPJ: 07.272.636/0001-31  
 Objeto do Acesso: Patrimônio Genético  
 Finalidade do Acesso: Pesquisa

**Espécie**

Bauhinia unguolata  
 Canavalia brasiliensis  
 Peltogyne confertiflora  
 Tecoma stans  
 Cnidocolus phyllacanthus  
 Couroupita gulanensis  
 Qualea parviflora  
 Título da Atividade: Plant lectins from the semi-arid region of Ceará

**Equipe**

André Luis Coelho da Silva	Universidade Federal do Ceará
Bruno Anderson Mattias da Rocha	Universidade Federal do Ceará
Bartolomeu Warlene da Silva Sousa	Universidade Federal do Ceará
Einatan Bezerra de Souza	Universidade Estadual Vale do Acaraú
Ana Cecília Góes Horta	Universidade Federal do Ceará

**Parcelas Nacionais**

07.821.622/0001-20 / Universidade Estadual Vale do Acaraú

**Resultados Obtidos**

Divulgação de resultados em meios científicos ou de comunicação  
 Identificação do meio onde foi divulgado: Eventos científicos e periódicos científicos

Data do Cadastro: 19/09/2018 20:18:05  
 Situação do Cadastro: Concluído

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético  
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 16:54 de 15/04/2020.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO  
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO  
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL  
 ASSOCIADO - SISGEN



Edson Holanda Telxela	UFC
Bartolomeu Wartene Silva de Souza	UFC
Celso Shiniti Nagano	UFC
Wanlus José Garcia da Silva	Universidade Federal do ABC
José Roberto Viana Silva	UFC
Carla Freire Celedonio Fernandes	FIOCRUZ-Ce
Einatan Bezerra de Souza	Universidade Estadual Vale do Acaraú
Lúcia Betânia da Silva Andrade	Universidade Estadual Vale do Acaraú
Luiz Ferreira Aguiar Ponte	Universidade Federal Vale do Acaraú
Luclano da Silva Pinto	Universidade Federal de Pelotas
Men de Sá Moreira de Souza Filho	Embrapa Agroindústria Tropical
Samara Sena da Penha	UFC
Talita Abrante Leite	UFC
Vanessa de Abreu Fátima	UFC
Vinicius Rodrigues de Castro e Silva	UFC
Germana Nogueira Bezerra	UFC
Bruna Maria Nepomuceno Sousa Lino	UFC
Wallady da Silva Barroso	UFC
Ricardo Oliveira Tavares	Universidade Estadual Vale do Acaraú

#### Parcelas Nacionais

07.722.779/0001-06 / Fundação Universidade Federal do ABC  
 07.821.622/0001-20 / Universidade Estadual Vale Do Acaraú

#### Parcelas no Exterior

Universidade do Minho

#### Resultados Obtidos

Divulgação de resultados em meios científicos ou de comunicação

Identificação do meio onde foi divulgado: Resumos em congressos, artigos científicos, n

Requerimento de propriedade intelectual

Órgão no qual foi requerido: INPI

Código do requerimento: FQ001

Número da patente: BR1020170058310

Data do Cadastro: 22/03/2018 08:12:18

Situação do Cadastro: Concluído

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético  
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 16:56 de 15/04/2020.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO  
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO  
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL  
 ASSOCIADO - SISGEN