



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

HENRIQUE SOUSA OLIVEIRA

PURIFICAÇÃO PARCIAL DE UMA LECTINA DE SEMENTES DE *Bauhinia*
***heterandra* Benth.**

FORTALEZA
2022

HENRIQUE SOUSA OLIVEIRA

PURIFICAÇÃO PARCIAL DE UMA LECTINA DE SEMENTES DE *Bauhinia heterandra* Benth.

Monografia apresentada à coordenação do Curso de Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Profa. Dra. Kyria Santiago do Nascimento

Fortaleza
2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

O47p Oliveira, Henrique Sousa.
Purificação parcial de uma lectina de sementes de Bauhinia heterandra Benth / Henrique Sousa Oliveira. – 2022.
38 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2022.

Orientação: Profa. Dra. Kyria Santiago do Nascimento.

1. Lectina. 2. Bauhinia heterandra. 3. BHL. 4. Atividade hemaglutinante. I. Título.

CDD 661

HENRIQUE SOUSA OLIVEIRA

PURIFICAÇÃO PARCIAL DE UMA LECTINA DE SEMENTES DE *Bauhinia heterandra* Benth.

Monografia apresentada à coordenação do Curso de Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Aprovada em: 09/12/2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Kyria Santiago do Nascimento (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Vanir Reis Pinto Júnior
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Messias Vital Oliveira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

RESUMO

Lectinas são proteínas de origem não imune capazes de se ligarem reversivelmente a carboidratos específicos, sendo proteínas de alto interesse em estudos envolvendo aplicações de glicoproteínas e glicoconjugados. Apesar da presença em diversos reinos da natureza, a maioria das lectinas foram isoladas a partir de fontes vegetais, principalmente a partir de suas sementes. *Bauhinia heterandra* Benth. é uma espécie da família *Leguminosae*, subfamília *Cercidoideae*, tribo *Cercideae*, subtribo *Bauhiniinae* e do gênero *Bauhinia*. O trabalho objetivou purificar parcialmente a lectina obtida a partir de sementes de *Bauhinia heterandra*. A lectina de *Bauhinia heterandra* (BHL) apresentou especificidade à α -Lactose e aglutinou eritrócitos de coelho e humano nativos e tratados com as enzimas tripsina e papaína e teve Glicina-HCl 0.1M pH 2,6 contendo NaCl 0,15M como melhor condição de extração. Foi obtido maior atividade específica na fração 25-50% de saturação no fracionamento proteico com sulfato de amônio. BHL foi parcialmente purificada em uma única etapa através de cromatografia de afinidade em matriz goma guar. De forma parecida com outras lectinas do gênero *Bauhinia*, BHL possui uma cadeia com massa aparente de 30 kDa, além de 2 cadeias menores de 20.1 e 14.4 kDa, além de não possuir ligações dissulfeto. O trabalho apresentou uma elucidação sobre a purificação da BHL, que poderá auxiliar em trabalhos de caracterização e em ensaios de atividades biológicas.

Palavras-chave: Lectina; *Bauhinia heterandra*; BHL; Atividade hemaglutinante

ABSTRACT

Lectins are proteins of non-immune origin capable of reversibly binding to specific carbohydrates, being proteins of high interest in studies involving applications of glycoproteins and glycoconjugates. Despite their presence in several kingdoms of nature, most lectins have been isolated from plant sources, mainly from their seeds. *Bauhinia heterandra* Benth. is a species in the family Leguminosae, subfamily Cecidoideae, tribe Cercideae, subtribe Bauhiniinae, and genus *Bauhinia*. The aim was to partially purify the lectin from *Bauhinia heterandra* seeds. *Bauhinia heterandra* lectin (BHL) showed specificity to α -Lactose and agglutinated erythrocytes from rabbit and human, native and treated with trypsin and papain enzymes, and had Glycine-HCl 0.1M pH 2.6 containing NaCl 0.15M as the best extraction condition. Higher specific activity was obtained in the 25-50% saturation fraction in protein fractionation with ammonium sulfate. BHL was partially purified in a single step by affinity chromatography on a guar gum matrix. Similar to other lectins of the genus *Bauhinia*, BHL has a chain with an apparent mass of 30 kDa, in addition to 2 smaller chains of 20.1 and 14.4 kDa, in addition to not having disulfide bonds. The work presented an elucidation on the purification of BHL, which may help in characterization works and in tests of biological activities.

Keywords: Lectin; *Bauhinia heterandra*; BHL; Haemagglutinating activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação da classificação dos quatro tipos de lectinas vegetais baseado em estrutura	15
Figura 2 – Motivo <i>jelly-roll</i> do monômero da lectina de <i>Canavalia ensiformis</i> (ConA)	19
Figura 3 – Fotos das sementes e das folhas de <i>Bauhinia heterandra</i>	23
Figura 4 – Perfil eletroforético da lectina de <i>Bauhinia heterandra</i>	34

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Perfil cromatográfico da fração com 25-50% de saturação de sementes de <i>Bauhinia heterandra</i> em cromatografia de afinidade em matriz goma guar	33
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Atividade hemaglutinante específica do <i>screening</i> de extração da farinha de <i>Bauhinia heterandra</i>	30
Tabela 2 – Atividade hemaglutinante específica das frações precipitadas com sulfato de amônio	31
Tabela 3 – Ensaio de inibição da atividade hemaglutinante com carboidratos das frações 25-50% e 50-75% de <i>Bauhinia heterandra</i>	32
Tabela 4 – Tabela de purificação da lectina de <i>Bauhinia heterandra</i>	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A.H.	Atividade hemaglutinante
ABA	aglutinina de <i>Agaricus bisporus</i>
BBL	Lectina de <i>Bauhinia bauhinioides</i>
BFL	Lectina de <i>Bauhinia forficata</i>
BHL	Lectina de <i>Bauhinia heterandra</i>
BmoLL	Lectina da folha de <i>Bauhinia monandra</i>
BPA	Aglutinina de <i>Bauhinia purpurea</i>
BPL	Lectina de <i>Bauhinia pentandra</i>
BSA	Albumina de soro bovino
CIM	Concentração inibitória mínima
ConA	Lectina da Concavalina A
CRD	Domínio de reconhecimento a carboidrato
GalNAc	<i>N</i> -acetilgalactosamina
Glicnac	<i>N</i> -acetilglicosamina
GNA	aglutina de <i>Galanthus nivalis</i>
GSL	Lectina de <i>Griffonia simplicifolia</i>
Nictaba	aglutinina de <i>Nicotiana tabacum</i>
P1	Pico não retido
P2	Pico retido
pH	Potencial hidrogeniônico
RIPs	Proteínas inativadoras de ribossomos
RNA	Ácido ribonucleico
SDS-PAGE	Eletroforese na presença de SDS
TxLCI	Superlectina extraída da tulipa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	Aspectos gerais e breve histórico	12
1.2	Definições	13
1.3	Classificação	14
1.4	Lectinas de Leguminosas	17
1.5	Lectinas de <i>Cercidoideae</i>	19
1.6	Lectinas de <i>Bauhinia</i>	20
1.7	<i>Bauhinia heterandra</i>	22
2	OBJETIVO	24
2.1	Objetivo geral	24
2.2	Objetivos específicos	24
3	MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1	Origem do material	25
3.2	Obtenção da farinha	25
3.3	Extração total de proteínas solúveis	25
3.4	Atividade hemaglutinante	25
3.5	Dosagem de proteínas solúveis	26
3.6	Cálculo da atividade hemaglutinante específica	26
3.7	Fracionamento com sulfato de amônio do extrato total	26
3.8	Inibição da atividade hemaglutinante por açúcar	27
3.9	Cromatografia de afinidade em matriz goma guar	27
3.10	Eletroforese em SDS-PAGE	28
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1	Purificação parcial da lectina de sementes de <i>Bauhinia heterandra</i>	29
5	CONCLUSÃO	35
	REFERÊNCIAS	36

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais e breve histórico

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas de origem não imune que são capazes de se ligar reversivelmente a carboidratos (PEUMANS; VAN DAMME, 1995), essas proteínas servem como moléculas de reconhecimento dentro de uma célula, entre células ou entre organismos, desempenhando importantes funções fisiológicas (PAN; TANG; GU, 2010). Dessa forma existe um grande interesse em suas aplicações nos mais diversos setores econômicos e atividades biológicas, como atividade inseticida (MACEDO, et al., 2007), antifúngica (VAZ; COSTA, et al., 2009), antibacteriana (PAN; TANG; GU, 2010; OLIVEIRA; ANDRADE, et al., 2008), anti-inflamatória e atividade analgésica (NUNES; RENSSONET, et al., 2009).

As lectinas interagem com carboidratos de uma forma tão específica quanto a interação enzima/substrato (GHAZARIAN; IDONI; OPPENHEIMER, 2011), essa interação acontece por haver um domínio de reconhecimento a carboidrato (CRD) nas lectinas (SHARON; LIS, 2004).

As lectinas estão presentes em toda a natureza, desde os organismos mais simples como bactérias, fungos e vírus, até os organismos mais complexos como plantas e animais. Contudo, apesar de estar bem distribuído, as lectinas de plantas são as mais estudadas (VAN HOLLE; VAN DAMME, 2019).

Em 1888 Stillmark relatou uma proteína altamente tóxica em extrato de sementes de *Ricinus communis*. A proteína, conhecida como Ricina, apresentou atividade hemaglutinante, sendo então a primeira lectina descoberta (SHARON; LIS, 2004). 1888 então é aceito como o ano em que começou a lectinologia. A relação entre a toxicidade da Ricina e a presença de atividade hemaglutinante foi importante para a bioquímica vegetal pois a Ricina é a primeira proteína de planta que teve uma atividade biológica reportada (VAN DAMME *et al.*, 1998; SHARON; LIS, 2004).

Posteriormente, H. Hellin descreveu uma toxicidade semelhante à da Ricina em uma proteína de sementes de jiquiti (*Abrus precatorius*), chamada de Abrina (SHARON; LIS, 2004). Paul Ehrlich usou a Ricina e a Abrina como modelos de antígenos em estudos imunológicos, com isso foi estabelecido vários princípios da imunologia (SHARON; LIS, 2004).

Em 1898, Esfstrand usou pela primeira vez o termo "hemaglutinina", fazendo

referência às proteínas vegetais com capacidade de aglutinar hemácias. Até então se tinha que todas as lectinas eram necessariamente tóxicas, mas em 1907 foi relatado, por Ladsteiner e Raubitscheck, uma lectina sem toxicidade nas leguminosas *Phaseolus vulgaris* (feijão), *Pisum sativum* (ervilha), *Lens culinaris* (lentilha). A partir de então outras hemaglutininas vegetais não tóxicas foram relatadas, dessa forma se tornou claro que as lectinas estão bem distribuídas no reino vegetal e que haver toxicidade não é uma regra desse grupo de proteínas (VAN DAMME et al., 1998).

A primeira lectina purificada foi obtida em 1919, a concanavalina A (ConA), a partir de sementes de *Canavalia ensiformes*, por James Sumner. Em 1936 Summer e Howell determinaram que a concanavalina A aglutinava eritrócitos e precipitava glicogênio de soluções. Além disso, foi demonstrado que a hemaglutinação era inibida por sacarose, sendo então a primeira constatação da especificidade das lectinas por açúcares (SHARON; LIS, 2004). Entretanto, apenas em 1952 foi demonstrado que o caráter hemaglutinante de lectinas era fundamentado em uma atividade específica de ligação a açúcar (WATKINS; MORGAN, 1952).

O próximo importante passo na história das lectinas vegetais foi quando Renkonen, em 1948, e Boyd e Reguera, em 1949, descobriram que algumas hemaglutininas demonstravam um favoritismo por eritrócitos de um determinado tipo sanguíneo dentro do sistema ABO. Foi observado que algumas proteínas vegetais de sementes de plantas podiam identificar um grupo específico e aglutina-lo, onde os eritrócitos do sistema ABO respondiam à interação com essas hemaglutininas de maneira ímpar, algumas aglutinando e outras não (VAN DAMME et al., 1998).

Em 1954 foi apresentado por Boyd e Shapleigh o termo "lectina" (do latim "*legere*", escolher) por causa da habilidade das aglutininas de plantas de distinguir eritrócitos de diferentes tipos sanguíneos (SHARON; LIS, 2004).

Outro grande evento na história das lectinas foi quando Nowell demonstrou que a lectina de *Phaseolus vulgaris* tem atividade mitogênica sobre linfócitos. Foi uma descoberta revolucionária para a imunologia pois o que se sabia até então era que os linfócitos não tinham capacidade de se diferenciar ou dividir-se (SHARON; LIS, 2004).

1.2 Definições

A primeira definição de lectinas baseava-se inibição de aglutinação por mono ou oligossacarídeos simples (GOLDSTEIN et al., 1980). Entretanto, essa definição contempla apenas as lectinas com domínios múltiplos de ligação a carboidratos.

Em 1993 foi proposto por Kocourek e Horejsi uma nova definição, que incluiria lectinas com baixa atividade hemaglutinante, tóxicas, mas atentando que poderiam existir lectinas com pelo menos uma subunidade de função diferente. No entanto, essa definição também foi considerada restritiva (SHARON; LIS, 2004).

A definição atual de lectinas foi proposta por Peumans e Van Damme (1995), como sendo proteínas de origem não imune que possuem pelo menos um domínio não catalítico capaz de se ligar específica e reversivelmente a mono ou oligossacarídeo sem alterar suas estruturas.

1.3 Classificação

Apesar da ampla distribuição das lectinas na natureza, elas mantiveram uma característica em comum que as distingue de todas as outras proteínas por um parâmetro funcional bem definido, que é a capacidade de reconhecer e se ligar especificamente a carboidratos. As lectinas constituem então um grupo heterogêneo de proteínas cuja heterogeneidade se baseia nas suas propriedades bioquímicas e físico-químicas, estrutura molecular, especificidade e atividades biológicas (PEUMANS; VAN DAMME, 1995).

Baseado em suas características estruturais, Peumans e Van Damme classificaram as lectinas vegetais de acordo com a estrutura em quatro classes principais: Merolectinas, Hololectinas, Quimerolectinas e Superlectinas (FIGURA 1) (VAN DAMME et al., 1998).

Merolectinas são proteínas que possuem apenas um domínio de ligação a carboidratos, não têm a capacidade de oligomerização, de aglutinar células e de precipitar glicoconjugados. Um exemplo dessa classe de lectinas é a heveína, que se liga à quitina e é extraída do látex da *Hevea brasiliensis* (VAN PARIJS et al., 1991).

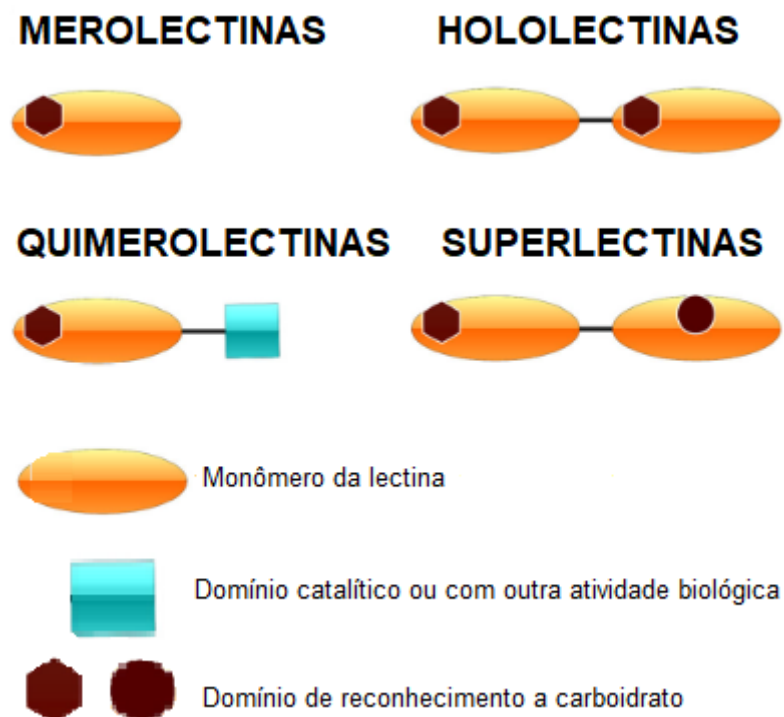
As **hololectinas** possuem mais de um domínio de ligação a carboidratos, com esses domínios sendo específicos para um mesmo carboidrato ou para carboidratos estruturalmente similares. A maioria das lectinas de plantas são hololectinas e elas representam as lectinas mais bem estudadas. As lectinas isoladas de sementes de

plantas dos gêneros *Canavalia* e *Dioclea* são típicas hololectinas (DEVI; KUMAR, 2019).

As **quimerolectinas** possuem um ou mais domínios de ligação a carboidratos ligados a pelo menos um domínio sem relação com atividade lectínica que tem atividade catalítica bem definida e independente de outros domínios. Exemplos de quimerolectinas são as RIPs (Proteínas inativadoras de ribossomos), como a Ricina (toxina de *Ricinus communis*, mamona) e Abrina (toxina de *Abrus precatorius*), que possuem dois domínios de ligação a carboidrato e um domínio para a inativação do ribossomo (PEUMANS; VAN DAMME, 1998).

As **superlectinas** possuem mais de um domínio de ligação a carboidrato que reconhecem açúcares distintos, estrutural e funcionalmente. A lectina isolada do bulbo de tulipa (TxLCI) é um exemplo dessa classe, pois é composta de um domínio de ligação a carboidrato que reconhece manose e outro domínio que reconhece N-acetil-galactosamina (VAN DAMME et al., 1996).

Figura 1 - Representação da classificação dos quatro tipos de lectinas vegetais baseado em estrutura.



Fonte: Elaborado pelo autor, adaptado de Van Damme (2020).

As lectinas podem também ser classificadas em 12 famílias de acordo com as características estruturais e evolutivas (TSANEVA; VAN DAMME, 2020).

A família das lectinas de leguminosas é a mais estudada. As proteínas deste grupo se caracterizam por serem bastante similares em suas características físico-químicas (PINTO et al., 2005). São semelhantes em suas estruturas primárias e terciárias, contudo, as características estruturais quaternárias variam bastante (LORIS et al., 1998). A família **Ricina-B** é conhecida pela potente atividade citotóxica, por possuir atividade catalítica e capacidade de inativar ribossomos eucarióticos. Ocorre essa atividade pela clivagem de uma ligação N-glicosídica de um resíduo de adenina no RNA. Além disso, a maioria dos domínios de ricina-B mostra ligação preferencial para galactose ou GalNAc contendo estruturas de glicano (VAN HOLLE; VAN DAMME, 2019).

Agaricus bisporus agglutinin (ABA) é uma família com um único representante, obtido a partir do cogumelo comestível *A. bisporus*. ABA tem uma dobra única com duas folhas β conectadas por um motivo hélice-alça-hélice. Cada monômero ABA possui dois sítios de reconhecimento para GlcNAc e GalNAc (NAKAMURA-TSURUTA et al., 2006). A família das lectinas **cianovirina** tem uma distribuição limitada em algumas algas azuis, bactérias, fungos e samambaias, mas está ausente em gimnospermas e angiospermas. A cianovirina é uma proteína em folha β de forma alongada que exhibe pseudosimetria. A lectina interage com N-glicanos manose (BOTOS et al., 2002).

O grupo das **lectinas que se ligam à quitina** é uma família que é capaz de se ligar a resíduos de *N*-acetilglicosamina, que é a principal unidade monomérica da quitina. São também exemplos de lectinas que se ligam a quitina as quitinases classe I (VAN DAMME et al., 1998).

Galanthus nivalis agglutinin (GNA) é a família de lectinas que estão relacionadas por possuírem especificidade de ligação para manose. As lectinas dessa família possuem até 4 subunidades de 12kDa sendo todas lectinas específicas a manose. Cristalografia de raio x mostrou que cada subunidade se dobra como um prisma β composto por três folhas β antiparalelas de quatro fitas que formam três sítios de ligação de manose. Este motivo de lectina foi originalmente descoberto em espécies de monocotiledôneas, mas também foi relatado em gimnospermas, dicotiledôneas, bem como em algumas bactérias, fungos, peixes e até mesmo em um vírus (VAN DAMME et al., 2008).

Nicotiana tabacum agglutinin (Nictaba) é uma família que foi isolada pela primeira vez de folhas do tabaco (*Nicotiana tabacum*). É um homodímero composto por duas subunidades de 19 kDa e se liga fortemente a N-glicanos ricos em manose, N-glicanos complexos e em menor grau para oligômeros de GlcNAc. A estrutura tridimensional do domínio Nictaba não foi resolvida ainda. A modelagem molecular sugere que Nictaba essencialmente consiste em uma estrutura β -sanduíche composta por duas folhas β conectadas por laços estendidos (SCHOUPE et al., 2010).

A seguir, a próxima família é a das **lectinas relacionadas a jacalina**, são lectinas estruturalmente semelhantes à Jacalina, uma lectina específica para galactose obtida de sementes de jaca (*Artocarpus integrifolia*) (BOURNE et al., 2002).

As lectinas isoladas do floema das ***Cucurbitaceae*** são proteínas formadas por duas subunidades de 24kDa ligantes à *N*-acetilglicosamina. De forma geral são glicosiladas, possuindo domínio para a ligação a quitina. Todas as lectinas dessa família são similares sequencialmente entre si, contudo, não tem similaridade sequencial com outras lectinas de outras espécies botânicas (VAN DAMME et al., 1998). Por último, a família de **lectinas relacionadas a amarantina**. Essa família é bastante restrita, pois a lectina extraída de *Amaranthus caudatos*, a amarantina, não se assemelha a nenhuma outra lectina de plantas tanto em relação a sequência de aminoácidos quanto em relação a estrutura tridimensional. Outras lectinas extraídas de espécies do gênero *Amaranthus* contêm lectinas similares a amarantina, e todas são ligantes específicas por *N*-acetilgalactosamina (VAN DAMME et al., 1998).

1.4 Lectinas de Leguminosas

As lectinas da família *Leguminosae* fazem parte do grupo de lectinas de plantas mais bem estudadas, dezenas de lectinas isoladas dessa família já foram caracterizadas quanto às suas propriedades biológicas, químicas, físicas e estruturais. Bastante do conhecimento obtido sobre lectinas de forma geral foi a partir dos estudos com essa família (SHARON; LIS, 1990). Estão presentes em sementes, folhas, caules e raízes (LORIS et al., 1998).

As lectinas dessa família são sintetizadas no retículo endoplasmático na forma de pré-pro-lectinas. A proteína ainda não formada possui na sua extremidade

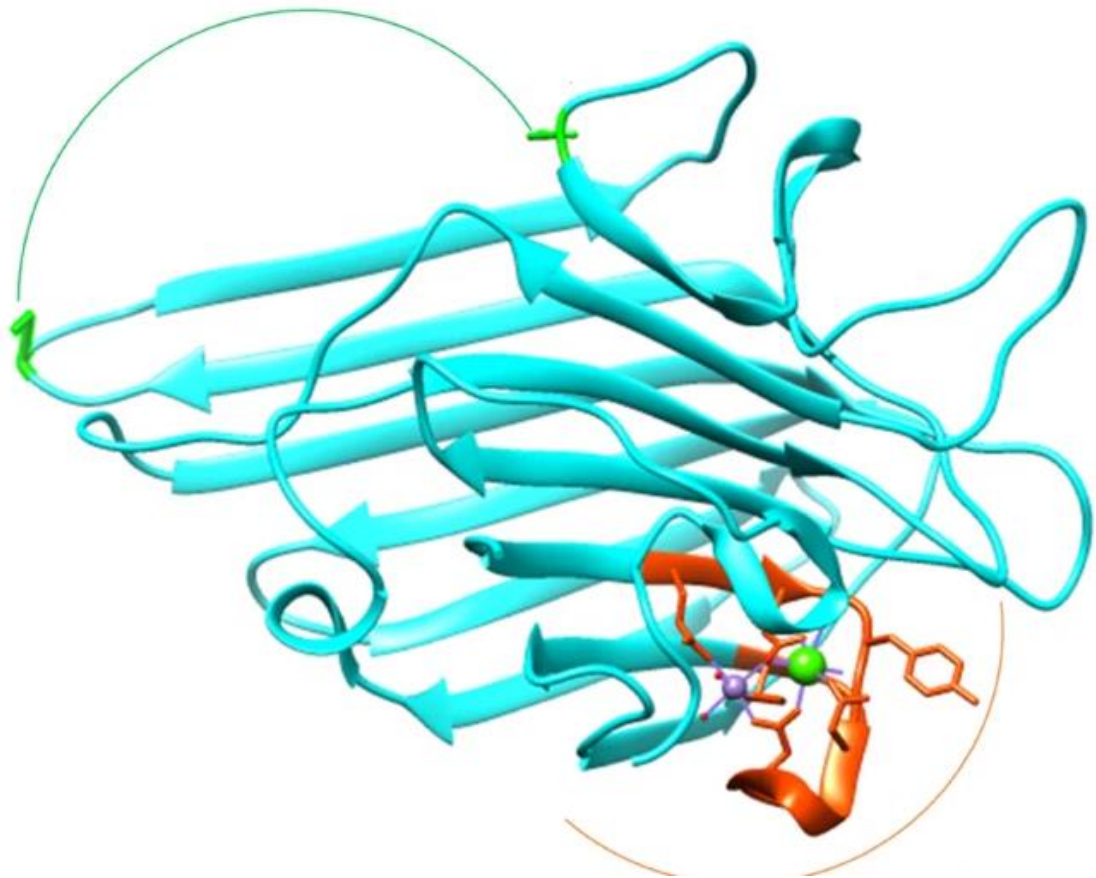
N-terminal um peptídeo sinal com 20 a 30 resíduos de aminoácidos, que é retirado durante o transporte da pré-pro-lectina para o lúmen do retículo endoplasmático, gerando uma pró-lectina. A pró-lectina passa por modificações pós-traducionais, como glicosilação e clivagens proteolíticas, originando então a lectina madura (SHARON; LIS, 1990).

Lectinas de leguminosas costumam ocorrer como dímeros ou tetrâmeros, compostos por monômeros iguais ou diferentes com massa molecular próxima de 25 a 30 kDa, e cada uma dessas subunidades apresenta um único sítio de ligação a carboidrato. As subunidades constantemente são compostas por uma única cadeia polipeptídica, que é unida por forças não covalentes como ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e eletrostáticas que levam a formação de dímeros canônicos, e a união dos dímeros estabiliza o tetrâmero (SHARON; LIS, 1989).

Uma característica particular do domínio de lectinas de leguminosas é que elas requerem íons Ca^{2+} e Mn^{2+} para manter a estrutura adequada, fazer ligações de sacarídeos e manter atividades biológicas. A estrutura quaternária das lectinas de leguminosas também podem ser muito distintas, como resultado de modificações, como a glicosilação, embora as estruturas primárias e secundárias dos monômeros sejam semelhantes (LAGARDA-DIAZ, 2017).

O domínio das lectinas de leguminosas tem um motivo conhecido como *jelly-roll*, também conhecido como dobramento β -sanduíche, que tem em suas porções uma folha- β estendida de seis filamentos e uma folha β curvada de sete filamentos antiparalelos, unidas por uma terceira folha- β de cinco fitas, localizada na porção superior do motivo. Essas folhas são conectadas por alças, de modo que a estrutura se assemelha a um sanduíche (FIGURA 2) (BANERJEE et al., 1996).

FIGURA 2 - Motivo *jelly-roll* do monômero da lectina de *Canavalia ensiformis* (ConA)



Fonte elaborada pelo autor, adaptado de Huldani (2022).

Até 2017 a família das leguminosas era dividida em 3 subfamílias: *Papilionoideae*, *Caesalpinioideae* e *Mimosoideae*, e dentre as lectinas de plantas, a maior parte dos estudos estavam concentrados nas lectinas extraídas de membros da subfamília *Papilionoideae*, enquanto os estudos envolvendo lectinas de membros das outras subfamílias, *Mimosoideae* e *Caesalpinioideae* eram mais escassos (MANN et al., 2001). A classificação atual reconhece 6 subfamílias: *Duparquetioideae*, *Cercidoideae*, *Detarioideae*, *Dialioideae*, *Faboideae* e *Caesalpinioideae* (LPWG, 2017). O gênero *Bauhinia* que fazia parte da subfamília *Caesalpinioideae* agora faz parte da subfamília *Cercidoideae*.

1.5 Lectinas de Cercidoideae

A subfamília *Cercidoideae* é composta por 12 gêneros divididos em 335 espécies. Ao comparar os gêneros, as lectinas desta subfamília não possuem

propriedades físico-químicas ou estruturais similares, apesar de atividades antibacterianas, antivirais e atividades anticancerígenas terem sido relatadas (AYOUBA et al., 1994; LIN., NG 2008; MADDOX et al., 1982). Quatro gêneros da subfamília *Cercidoideae* apresentaram lectinas: *Bauhinia* (SILVA et al 2012), *Griffonia* (LAMB et al., 1983), *Phanera* (PINTO; LUCIANO., et al 2008) e *Piliostigma* (NWOSU; OLUCHI; et al 2016), com o gênero *Bauhinia* comportando o maior número de espécies com lectinas purificadas e caracterizadas (CAVADA et al., 2020).

O método usado para purificar lectinas neste grupo normalmente é a cromatografia de afinidade. As sementes de *Griffonia simplicifolia* produziram quatro lectinas, a primeira, GSL I, foi purificada em dois passos: fracionamento do extrato bruto com sulfato de amônio, seguido de uma aplicação desta fração em uma coluna de afinidade de matriz de melibionato usando D-galactose como eluente (HAYES; GOLDSTEIN, 1974). As isoformas da GSL I foram obtidas usando cromatografias de afinidade em matrizes diferentes (MURPHY; GOLDSTEIN, 1977).

O padrão de hemaglutinação demonstra que a maioria das lectinas dessa subfamília apresentou atividade hemaglutinante em todos os tipos de sangue humano e/ou eritrócitos de coelhos. Entretanto, algumas lectinas específicas apresentaram atividade hemaglutinante para outros tipos de células, como a lectina de *Bauhinia purpurea* (BPA), que constatou atividade contra linfócitos, mas não contra eritrócitos de coelho (YOUNG et al., 1985).

A maioria das lectinas de *Cercidoideae* parecem ser glicosiladas, com a porcentagem de glicosilação variando de 3,1% para a lectina de *Griffonia simplicifolia* (HAYES; GOLDSTEIN, 1974) até 8,4% para a lectina de *Bauhinia forficata* (BFL) (SILVA et al., 2012). Entretanto, a lectina de *Bauhinia bauhinioides* (BBL) (SILVA et al., 2011) e da *Bauhinia pentandra* (BPL) não são glicosiladas (SILVA et al., 2001). As lectinas testadas para termoestabilidade mostraram-se estáveis em torno de 30 a 40°C, com algumas delas permanecendo estáveis até 100°C, como a BFL (SILVA et al., 2012).

1.6 Lectinas de *Bauhinia*

Lectinas extraídas das sementes do gênero *Bauhinia* têm alguns aspectos em comum, como especificidade por D-galactose e derivados, além de apresentar um perfil eletroforético composto por uma banda única de aproximadamente 30 kDa

(SILVA et al., 2007; SILVA et al., 2001). Atividades biológicas foram reportadas em lectinas isoladas das sementes de plantas do gênero *Bauhinia*, como da BPA, que é usada em estudos citoquímicos e imunológicos (WU et al., 2004), ou da lectina da folha de *Bauhinia monandra* (BmoLL) que demonstrou ter atividade inseticida ao diminuir as taxas de sobrevivência em mais de 50% em *Zabrotes subfasciatus* e *Callosobruchus maculatus*, espécies conhecidas por danificarem sementes armazenadas (MACEDO et al., 2007).

Todas as lectinas de *Bauhinia* foram extraídas de sementes, com exceção da *Bauhinia monandra*, cujas hemaglutininas foram isoladas de suas folhas e raiz secundária (COELHO et al., 2000). A extração de proteínas é realizada em solução tamponada com pH variando de 6,5 a 7,6 para a maioria das Lectinas de *Bauhinia*, excluindo por exemplo a BPL, que foi extraída usando solução de NaCl 0,15M (YOUNG et al., 1985).

O extrato é então centrifugado e sulfato de amônio é adicionado ao sobrenadante para promover precipitação em um único agregado por *salting-out*, seguido de diálise (WINGFIELD., 1998). A etapa final de purificação geralmente inclui uma cromatografia de afinidade, usando carboidratos específicos ligados a uma matriz, ou a própria matriz como adsorvente. As lectinas ligadas são então eluídas por competição, usando uma solução com o açúcar específico, ou através de mudança de conformação usando um tampão ácido (POHLEVEN et al., 2012).

A lectina de *Bauhinia bauhinioides* possui especificidade aos açúcares α -metil-D-galactopiranosídeo e D-galactose e foi purificada em 2 passos cromatográficos, em matriz de DEAE-Sephacel e cromatografia de troca catiônica em coluna HiTrap SP XL acoplada a um sistema de cromatografia líquida de alta Eficiência. A lectina pura é formada de 4 subunidades com pesos aparentes de 28 kDa (SILVA et al., 2011). A lectina da *Bauhinia forficata* é específica para N-D-acetilgalactosamina e foi purificada em 4 passos cromatográficos, o primeiro em matriz de DEAE-Sephacel, em seguida foi passado em uma coluna de Sepharose-4B, que em seguida foi aplicada em coluna de quitina e por último em cromatografia de exclusão molecular com uma coluna Superdex 75 10/300 GL. A lectina pura é formada por 2 subunidades com pesos aparentes de 27 kDa (SILVA et al., 2012).

A lectina de *Bauhinia pentandra* possui especificidade a α -D-Melibiose, D-Galactose, D-Rafinose e D-Lactose e foi purificada em apenas 1 passo cromatográfico em cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose 4B e a

lectina pura apresenta apenas uma subunidade com peso aparente de 30 kDa (SILVA et al., 2001). A lectina de *Bauhinia purpurea* possui especificidade a *N*-D-acetilgalactosamina e foi isolada em apenas 1 passo cromatográfico em cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose-Lactose e possui 4 subunidades com pesos aparentes de 32 kDa (YAMAMOTO et al., 1991).

A lectina de *Bauhinia unguolata* possui especificidade a *N*-D-acetilgalactosamina, D-Lactose e D-galactose e foi purificada em apenas um passo cromatográfico em cromatografia de afinidade em coluna de Agarose-Lactose e possui 1 subunidade com peso aparente de 30 kDa (SILVA et al., 2014).

A lectina de *Bauhinia variegata* possui especificidade a α -D-Melibiose, D-Galactose e ácido glicurônico e foi isolada em um passo cromatográfico usando coluna de Agarose-Lactose, apresentando 2 subunidades com pesos aparentes de 32 kDa (PINTO et al., 2008).

Considerando os estudos que demonstram as diversas aplicações de lectinas como instrumentos biotecnológicos, há um estímulo para identificação e caracterização de novas lectinas. Sobre a espécie de *B. heterandra* não há relatos prévios relacionados a purificação de lectina. Este é o primeiro estudo que trata sobre o isolamento de uma lectina extraída das sementes de *Bauhinia heterandra*, denominada de BHL.

1.7 *Bauhinia heterandra*

Bauhinia heterandra Benth. (Figura 1) é um espécime do reino *Viridiplantae*, da ordem *Fabales*, da família *Leguminosae*, da subfamília *Cercidoideae*, da tribo *Cercideae* e do gênero *Bauhinia*. As plantas do gênero *Bauhinia* são conhecidas como “pata de vaca” por causa do formato de suas folhas, sendo comumente encontrado em áreas tropicais, como África, Ásia e América do Sul. Apresenta mais de 300 espécies e na medicina popular é usada em tratamentos contra inflamação e diabetes (FILHO, 2009).

Estudos indicam a presença de metabólitos, como terpenos, esteroides, ácidos aromáticos, quinonas, lactonas e alcalóides, sendo responsáveis pelas suas propriedades medicinais (SINGH et al., 2016). Moléculas metabolicamente ativas, como as lectinas, também foram relatadas como responsáveis por várias dessas propriedades, como a atividade antitumoral atribuída a essas plantas (PANDEY;

AGRAWAL, 2009).

Bauhinia heterandra está presente na Bolívia e Brasil, nos biomas Caatinga e Cerrado, distribuída nos estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte, São Paulo e Sergipe. Até 1870 *Bauhinia heterandra* era sinônimo para *Bauhinia Pentandra*, mas George Bentham reconheceu as duas como espécies distintas. As distinções de identificação principais foram: estaminódios filiformes e botões 5-costados em *B. pentandra* e filetes alternos com anteras pequenas e botões 5-alados em *B. heterandra*. Além disso, a área de distribuição de *B. pentandra* incluiu o Estado do Mato Grosso e o Paraguai, e a área de *B. heterandra* foi basicamente o Nordeste, com um ponto em Goiás (VAZ; TOZZI, 2005).

Figura 3 – Fotos das sementes e das folhas de *Bauhinia heterandra*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve por objetivo detectar, isolar e purificar parcialmente uma lectina presente nas sementes de *Bauhinia heterandra* Benth.

2.2 Objetivos específicos

- Detectar a atividade hemaglutinante de lectinas a partir de extratos de sementes de *Bauhinia heterandra*;
- Realizar quantificação proteica e determinar atividade específica dos extratos, frações e picos cromatográficos;
- Determinar a fração proteica com maior atividade específica;
- Determinar a especificidade da fração proteica por ensaios de hemaglutinação;
- Realizar cromatografia líquida de afinidade para purificação da lectina;
- Verificar a massa molecular aparente da BHL e o grau de pureza por eletroforese em condições desnaturante (SDS-PAGE) e presença de ligações dissulfeto.

3 MATERIAS E MÉTODOS

3.1 Origem do material

Sementes de *Bauhinia heterandra* Benth. foram colhidas através de colheita manual no Horto de Plantas Medicinais na Universidade Federal do Ceará. Posteriormente, as sementes foram transportadas para o laboratório de moléculas biologicamente ativas (BioMol-Lab).

3.2 Obtenção da farinha

As sementes sofreram processo de secagem em uma estufa a 37° C. Foram então descascadas e trituradas em moinho elétrico. Por conta da riqueza de lipídios das sementes, a farinha triturada foi delipidada com n-hexano. A farinha delipidada foi então armazenada em recipiente fechado.

3.3 Extração total de proteínas solúveis

As proteínas solúveis contidas na farinha de sementes de *Bauhinia heterandra* Benth foram extraídas com três tampões: glicina-HCl 0,1 M pH 2,6, tris-HCl 0,1 M pH 7,6 e glicina-NaOH 0,1 M pH 9,0, todos contendo NaCl 0,15 M, na proporção 1:10 (p/v), sob agitação constante durante 4 horas. A suspensão obtida foi centrifugada a 10400 xg a uma temperatura de 4 °C por 25 minutos, que gerou um sobrenadante que foi filtrado, chamado de extrato total. O extrato total de cada extração foi utilizado para execução de ensaios de atividade hemaglutinante e de dosagem de proteínas solúveis.

3.4 Atividade hemaglutinante

A presença de lectina no extrato foi determinada a partir de ensaios de aglutinação celular de acordo com o protocolo descrito por Moreira e Perrone 1977, quando foi observada a formação de precipitado visível macroscopicamente. O protocolo é referido como: o extrato total e as frações obtidas no fracionamento por sulfato de amônio foram submetidos ao teste de atividade hemaglutinante usando hemácias de coelho e humano (sangue A, B, O) ao longo das etapas de purificação

da lectina. As amostras foram diluídas em série e em duplicata, em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,6 contendo NaCl 0,15 M, CaCl₂ e MnCl₂ 5mM. Em 50µL de cada diluição adicionou-se 50µL da suspensão de hemácias nativas ou previamente tratadas com enzimas proteolíticas (papaína e tripsina) a 2% em NaCl 0,15 M. O ensaio foi incubado à 37 °C por 30 minutos, logo após foi deixado em repouso à temperatura ambiente por 30 minutos. Os títulos de hemaglutinação foram medidos em Unidades de Hemaglutinação por mL (U.H./mL).

3.5 Dosagem de proteínas solúveis

A concentração de proteínas solúveis no extrato de sementes de *Bauhinia heterandra* Benth e nas frações obtidas durante a purificação parcial da lectina foi determinada pelo método apresentado por BRADFORD (1976) que descreveu que a cada 100 µL de amostra diluída ou não, em tampão NaCl 0,15 M, é adicionado 2,5 mL de reagente de Bradford. A mistura foi deixada em repouso por 10 minutos e teve sua absorvância determinada a 595 nm em um espectrofotômetro de luz visível, e sua concentração foi determinada por uma curva padrão obtida com o uso de soluções de concentrações conhecidas de albumina sérica bovina (BSA).

3.6 Atividade hemaglutinante específica

Em posse do título de hemaglutinação e da quantidade de proteínas solúveis, a atividade específica foi calculada para a monitoração da concentração/purificação da lectina investigada. Dessa forma, é feita a divisão do valor do título de hemaglutinação (U.H./mL) pelo valor da dosagem de proteínas solúveis (mg/mL), resultando num quociente expresso em U.H/mg (Unidade de hemaglutinação por miligrama de proteína).

3.7 Fracionamento com sulfato de amônio do extrato total

O extrato total foi submetido a um fracionamento proteico, que é a adição de sulfato de amônio sólido de forma lenta e constante em diferentes concentrações, obtendo as frações 0-25%, 25-50%, 50-75%, 75-100% de saturação. Após 4 horas em repouso, as suspensões foram centrifugadas a 10400 xg a uma temperatura de

4 °C por 25 minutos, sendo obtido no precipitado as respectivas frações. As frações foram ressuspensas em Tris-HCl 0,025 M pH 7,6 contendo NaCl 0,15 M e foram dialisadas contra água destilada e então acondicionadas de novo em Tris-HCl 0,025 M pH 7,6 contendo NaCl 0,15 M.

3.8 Inibição da atividade hemaglutinante por açúcar

Alguns mono e dissacarídeos disponíveis foram usados. Nas placas de atividade hemaglutinante foram adicionados, em duplicata, 25 µL da solução de NaCl 0,15 M com CaCl₂ 5mM e MnCl₂ 5mM em cada poço, 25 µL de cada um dos açúcares em uma concentração de 100 mM (D-glucose, D-manose, α-metil-D-glicopiranosídeo, α-metil-D-manosídeo, D-galactose, α-lactose e N-acetil-D-glucosamina). Após a diluição, 25 µL de uma diluição do extrato apresentando atividade de 4 U.H./mL (previamente determinada) foram adicionados em todos os poços. O ensaio foi incubado à 37°C em estufa por 30 minutos e após esse período deixado em repouso à temperatura ambiente por mais 30 minutos. 50 µL de suspensão de eritrócitos de coelho nativo foram adicionados a cada poço e a placa foi novamente incubada à 37 °C durante 30 minutos e deixada em repouso à temperatura ambiente por 30 minutos. A inibição da A.H pelos açúcares foi determinada ao notar-se a menor concentração dos açúcares que inibe a A.H., ou seja, a concentração inibitória mínima (CIM) (RAMOS et al., 1996).

3.9 Cromatografia de afinidade

A purificação parcial da lectina foi executada por meio de uma cromatografia de afinidade em matriz goma guar. A fração 25-50% foi aplicada em na coluna e equilibrada com Tris-HCl 0,1 M pH 7,6 contendo NaCl 0,15 M, CaCl₂ 5mM e MnCl₂ 5mM, sendo mantido em contato com a matriz *overnight*. A fração não retida foi eluída com o mesmo tampão de equilíbrio e foi coletada 1,5 mL por tubo de ensaio. O pico retido na fase estacionária foi adquirido com tampão glicina-HCl 0,1 M pH 2,6 com NaCl 0,15M, que também foi coletado 1,5 mL por tubo de ensaio. As frações coletadas foram monitoradas no espectrofotômetro com leituras de absorvância de 280 nm. Os picos obtidos foram dialisados contra água destilada e então liofilizados. Foi avaliado a atividade hemaglutinante, o teor de proteínas solúveis e a atividade

específica das frações cromatográficas.

3.10 Eletroforese em SDS-PAGE

Para acompanhar a pureza e a massa molecular aparente das amostras obtidas foi realizado eletroforese em SDS-PAGE seguindo o protocolo desenvolvido por Laemmli em 1970 (LAEMMLI., 1970). O gel de empilhamento foi elaborado com água destilada ultrapura; acrilamida/bisacrilamida 4%; tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8; SDS 10%; persulfato de amônio (100 mg/ml) e TEMED. O gel de separação da amostra foi preparado usando tampão Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8; acrilamida/bisacrilamida 12%; SDS 10%; TEMED e persulfato de amônio (100 mg/mL).

As amostras liofilizadas foram solubilizadas a uma concentração de 4 mg/mL em tampão de amostra contendo Tris-HCl 0,0625 M pH 6,8%; 10% de glicerol; 0,02% de azul de bromofenol e 1% de SDS. Foi aplicado no gel 4 µL do marcador molecular e entre 5 a 10 µL de cada amostra. A corrida eletroforética foi executada com a voltagem variando até 150V, amperagem constante de 30 mA e potência de até 10W. O tampão de corrida continha água ultra pura; Tris 0,25 M pH 8,8; Glicina 1,92M e SDS 1%.

Os marcadores moleculares foram fosforilase b (97 kDa), albumina de soro de bovino (66 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), inibidor de tripsina (20.1 kDa) e α -lactalbumina, (14 kDa). A presença de ligações dissulfeto foi determinada por adição de β -mercaptoetanol 2% em tampão de amostra.

Após a corrida eletroforética o gel foi corado com o corante coomasie blue G-250 a 0,05%, dissolvido em metano, ácido acético e água a uma proporção de 1:3:5:8 (v/v/v). Após 24 horas com o gel corando ele foi lavado com água destilada.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Purificação parcial da lectina de sementes de *Bauhinia heterandra*

Os procedimentos usados para a extração e purificação parcial da BHL foram os padrões para lectinas vegetais, como extração utilizando soluções salinas e/ou ácidas, precipitação com sais neutros e fracionamento por técnicas cromatográficas (BELITZ et al. 1990).

Foi realizado um *screening* de extração para determinar qual tampão extrairia proteínas de forma mais eficiente com os tampões Glicina-HCl 0,1 M pH 2,6, Tris-HCl 0,1 M pH 7,6 e Glicina-NaOH 0,1 M pH 9,0, todos com NaCl 0,15M. O extrato de proteínas obtido da farinha das sementes de *Bauhinia heterandra* apresentou atividade hemaglutinante com eritrócitos de coelho e de humanos do sistema ABO (Tabela 1), tratados ou não tratados com enzimas proteolíticas. Observamos um maior título de atividade hemaglutinante com eritrócitos de coelho tratados com papaína e tripsina (256 UH/mL) em duas condições tamponantes (Tris-HCl 0.1 M, pH 7.6 com NaCl 0,15 M e glicina-HCl 0.1 M, pH 2.6 com NaCl 0,15 M), porém a melhor condição de extração foi com tampão glicina-HCl 0,1M pH 2,6 com NaCl 0,15M, pois apresentou atividade específica de 70,13 UH/mg, que foi definida como a condição de extração.

A extração de lectinas de sementes de plantas do gênero *Bauhinia* normalmente é feita em solução tampão com pH próximo do neutro, 6.5 a 7.6, com exceção da BPL (SILVA et al. 2001) e da lectina de *Bauhinia variegata var. candida* (BvcL) (CHAN; NG, 2015) que foram extraídas com solução NaCl 0,15M. A BHL extraída em pH neutro perdia costumeiramente atividade após os processos de cromatografia e liofilização, além do perfil de eletroforese não ser ideal, então seguiu-se a extração com a condição com maior atividade específica, mesmo que extração em pH ácido seja incomum para lectinas do gênero.

Com exceção da BvcL, todas as lectinas obtidas do gênero *Bauhinia* também apresentaram atividade hemaglutinante contra eritrócitos de coelhos, e apenas a BFL (SILVA et al., 2012) e BPA (YOUNG et al., 1985) apresentaram atividade contra os eritrócitos humanos do tipo A, B e O, além da BHL.

Tabela 1. Atividade hemaglutinante específica do *screening* de extração da farinha de *B. heterandra*.

Condição de extração	Tipo sanguíneo	Título de atividade hemaglutinante¹ (U.H x mL⁻¹)	Quantidade de proteínas solúveis² (mg x mL⁻¹)	Atividade específica³ (U.H / mg)
Tris-HCl pH 7.6 0,1M + NaCl 0,15M	Humano	-	37.93	-
	CN	2	37.93	0.05
	CT	256	37.93	6.75
	CP	256	37.93	6.75
Glicina-NaOH pH 9.0 0,1M + NaCl 0,15M	Humano	-	19.78	-
	CN	-	19.78	-
	CT	128	19.78	6.47
	CP	128	19.78	6.47
Glicina-HCl pH 2.6 0,1M + NaCl 0,15M	AN	128	3.65	35
	ON	64	3.65	17.5
	BN	128	3.65	35
	AT	64	3.65	17.5
	OT	128	3.65	35
	BT	128	3.65	35
	AP	64	3.65	17.5
	OP	64	3.65	17.5
	BP	128	3.65	35
	CN	32	3.65	8.7
	CT	256	3.65	70.13
	CP	256	3.65	70.13

Fonte: Elaborado pelo autor. CN – Sangue de coelho nativo; CT – Sangue de coelho tratado com a enzima tripsina; CP – Sangue de coelho tratado com a enzima papaína; AN – Sangue humano do tipo A nativo; AT - Sangue humano do tipo A tratado com enzima tripsina; AP - Sangue humano do tipo A tratado com enzima papaína; BN - Sangue humano do tipo B nativo; BT - Sangue humano do tipo B tratado com enzima tripsina; BP - Sangue humano do tipo B tratado com enzima papaína; ON - Sangue humano do tipo O nativo; OT - Sangue humano do tipo O tratado com enzima tripsina; OP - Sangue humano do tipo O tratado com enzima papaína.

¹ hemaglutinação contra eritrócitos expressa em unidades de hemaglutinação. (U.H x mL). ² Concentração de proteínas solúveis. ³ Atividade Hemaglutinante Específica calculada pela divisão entre a atividade hemaglutinante e concentração de proteínas.

A partir do resultado do *screening* de extração foi realizado o fracionamento com sulfato de amônio com o extrato total em 4 frações: 0-25%, 25-50%, 50-75%, 75-100%, que apresentou atividade hemaglutinante em todas as frações (Tabela 3). Os resultados foram mais expressivos nas frações 25-50% e 50-75%, com atividade hemaglutinante específica de 177.78 e 206.45, respectivamente. Normalmente as frações intermediárias apresentam melhor atividade, como a BPL, que a maior parte da atividade foi precipitada entre 50 e 70% de saturação com sulfato de amônio (SILVA et al. 2001), ou a BFL que teve como melhor fração a precipitação entre 40 e

80% de saturação (SILVA et al., 2012). Então essas duas frações, 25-50% e 50-75% foram escolhidas para o teste de especificidade a carboidrato.

Tabela 2 – atividade hemaglutinante específicas das frações precipitadas com sulfato de amônio.

Frações	Título de atividade hemaglutinante ¹ (U.H. x mL ⁻¹)	Quantidade de proteínas solúveis ² (mg. x mL ⁻¹)	Título de atividade hemaglutinante específica ³ (U.H x mg ⁻¹)
0-25%	32	1.74	18.39
25-50%	256	1.44	177.78
50-75%	128	0.62	206.45
75-100%	4	0.06	30.30

Fonte: Elaborado pelo autor ¹hemaglutinação contra eritrócitos expressa em unidades de hemaglutinação. (U.H.). ²Concentração de proteínas solúveis. ³Atividade hemaglutinante específica calculada pela divisão entre o título de atividade hemaglutinante e concentração de proteínas.

A especificidade da lectina de *Bauhinia heterandra* foi determinada pela capacidade de diferentes carboidratos inibirem a atividade hemaglutinante da lectina. O teste de inibição foi realizado com as frações precipitadas com sulfato de amônio, 25-50% e 50-75% de precipitação. Foi alcançado resultado com D-galactose e α -Lactose (Tabela 3). Nenhuma lectina do gênero *Bauhinia* demonstrou especificidade apenas por D-galactose e α -Lactose, mas todas apresentaram inibição de atividade hemaglutinante a açúcares com resíduos de galactose, como a lectina de *Bauhinia bauhinoides* (BBL) (SILVA; CAVADA et al., 2011) que apresentou especificidade a α -metil-D-galactopiranosídeo e D-galactose, Já a BPL manifestou especificidade aos açúcares D-galactose e D-Lactose, além de α -D-melibiose e D-rafinose (SILVA et al. 2001). Galactose é um monossacarídeo presente na matriz de goma guar que é uma galactomanana formada por cadeias lineares de unidades de D-manopiranosil ligadas entre si por ligações β (1 \rightarrow 4) e unidades de D-galactopiranosil, ligadas entre si por ligações α (1 \rightarrow 6) (HATAKEYAMA et al. 1989). A lectina de *Vaitairea macrocarpa* (VML) foi obtida em apenas um passo em cromatografia de afinidade em matriz de goma guar (CAVADA et al. 1998). Pela diferença no perfil de inibição, em que a fração 25-50% apresenta especificidade apenas a α -Lactose, foi determinado que a purificação seria de apenas uma fração, a 25-50%, a ser purificada na matriz goma guar.

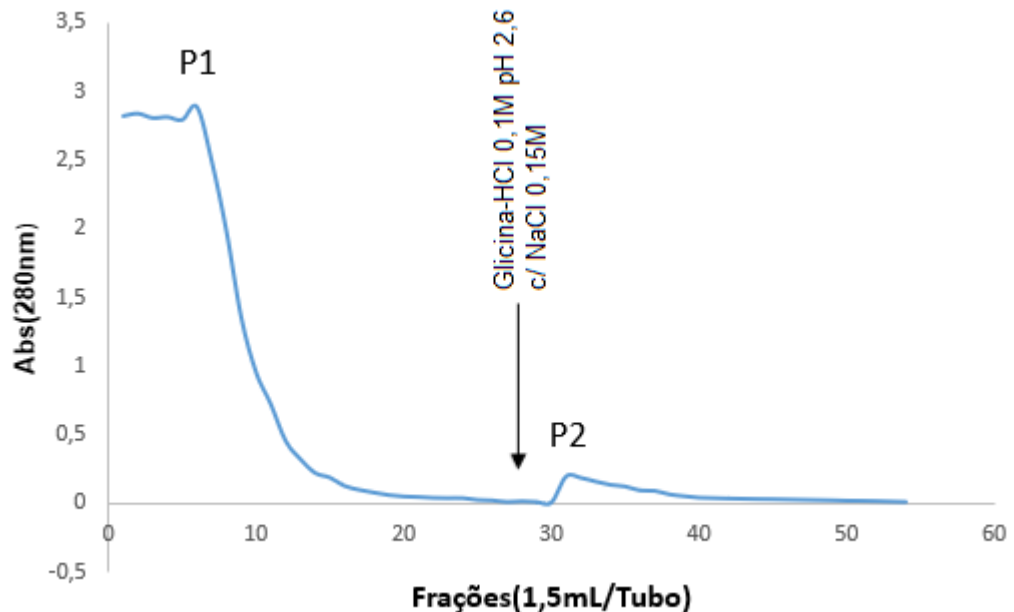
Tabela 3. Ensaio de inibição da atividade hemaglutinante com carboidratos das frações 25-50% e 50-75% de *Bauhinia heterandra*.

Carboidrato (100mM)	CMI (mM) fração 25-50%	CMI (mM) fração 50-75%
D-Glicose	N. I	N. I
D-Manose	N. I	N. I
α -metil-D-glicopiranosídeo	N. I	N. I
α -metil-D-Manosídeo	N. I	N. I
D-Galactose	N. I	6.25
α -Lactose	3.1	6.25
N-Acetil-D-glicosamina	N. I	N. I

Fonte: Elaborado pelo autor. (CMI), Concentração mínima inibitória. (N.I), não inibiu.

A lectina de *Bauhinia heterandra* foi parcialmente purificada em um passo de cromatografia de afinidade em coluna de goma guar (Gráfico 1). Nenhuma lectina do gênero *Bauhinia* foi purificada em matriz goma guar, mas o perfil de cromatografia de outras espécies é parecido com o da BHL como o da VML (CAVADA et al. 1998), apesar dos picos retidos das proteínas de interesse obtidos serem baixos. Usando esse protocolo foi obtido a lectina com grau de pureza 3,5 vezes em relação ao extrato bruto (Tabela 4). O procedimento de purificação mostrou-se semelhante ao de outras lectinas ligantes a galactose do gênero *Bauhinia*. a BFL teve 13,5 como grau de pureza em matriz de Sepharose-4B, que também é de afinidade (SILVA et al., 2012) e de 7,6 com a BPL, também em matriz Sepharose-4B (SILVA et al., 2001).

Gráfico 1 - Perfil cromatográfico da fração com 25-50% de saturação de sementes de *Bauhinia heterandra* em cromatografia de afinidade em matriz goma guar.



Fonte: Elaborado pelo autor. Fração 25-50% solubilizada em Tris 0,1 M pH 7,6 com NaCl 0,15M e MnCl₂ 5 mM e CaCl₂ 5 mM. A fração não retida (P1) foi eluída com o tampão de equilíbrio e a fração retida (P2) foi eluída com o tampão Glicina-HCl 0,1M pH 2,6 com NaCl 0,15M. Em cada tubo foram coletadas alíquotas de 1,5mL com fluxo de 1mL/min. Absorbância: 280 nm.

Tabela 4 - Tabela de purificação da lectina de *Bauhinia heterandra*

Fração	^a Proteína Total (mg/mL)	^b U.H.	^c Atividade específica (U.H./mg)	^d Fator de purificação
Extrato Bruto	3.65	256	70.13	1
Fração 25-50%	1.44	256	177.78	2.5
P2 (Goma guar)	0.26	64	246.15	3.5

a Concentração de proteínas solúveis

b Hemaglutinação contra eritrócitos nativos de coelho expressa em unidades de hemaglutinação. (U.H.)

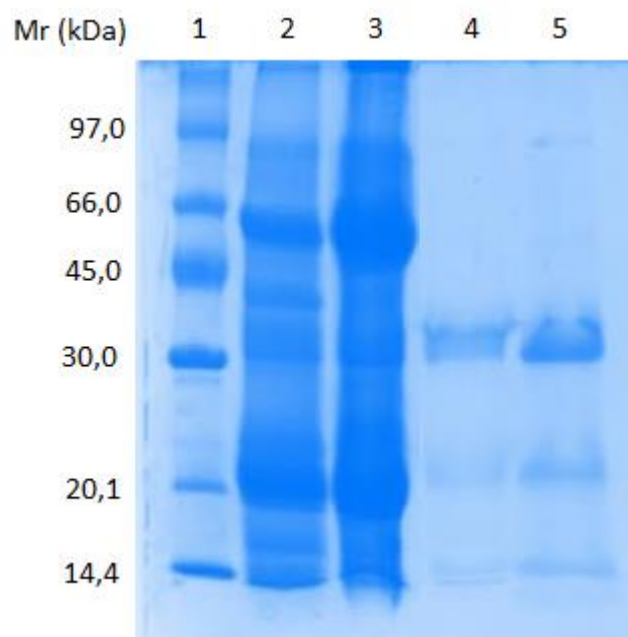
c A atividade específica calculada como a razão entre a atividade de hemaglutinação e a concentração de proteínas

d Fator de Purificação, calculado como a relação entre a atividade hemaglutinante específica do PII e do extrato total.

O processo de purificação de BHL foi monitorado por SDS-PAGE. O perfil eletroforético (FIGURA 2) de BHL parcialmente pura corresponde a uma banda com peso molecular aparente de 30 kDa e outras duas entre 20.1-14.4 kDa. Na presença

do agente redutor (β -mercaptoetanol) não houve mudanças no perfil eletroforético, o que indica que a proteína não apresenta pontes dissulfeto. O peso molecular das subunidades das lectinas do gênero tem valores entre 26 kDa, na lectina das raízes de *Bauhinia monandra* (SOUZA et al., 2011) até 33 kDa na lectina das folhas de *Bauhinia monandra* (COELHO et al., 2000), sendo então lectinas com peso aparente próximos de 30 kDa.

Figura 2 - Perfil eletroforético da lectina.



Fonte: Elaborado pelo autor. No poço 1 se encontram os marcadores: Fosforilase b (97 kDa), Albumina sérica bovina (66 kDa) Ovoalbumina (45 kDa) Anidrase carbônica (30 kDa), Inibidor de tripsina (20.1 kDa) e α -Lactalbumina (14.4 kDa); Poço 2 se encontra extrato bruto; Poço 3 se encontra Fração 25-50%; Poço 4 se encontra BHL (20 μ g) na presença de redutor (β -mercaptoetanol); Poço 5 se encontra BHL (20 μ g) na ausência de redutor

5 CONCLUSÃO

Os resultados demonstram que uma lectina (BHL) foi purificada parcialmente a partir do extrato de sementes de *Bauhinia heterandra*, o seu perfil de massa molecular aparente foi determinado em SDS-PAGE. Foi observado que BHL aglutina eritrócitos de coelho e de humanos (ABO) tratados com enzimas proteolíticas e é específica à α -Lactose.

Esses resultados fornecem informações que poderão ser usadas para a determinação da purificação da BHL. Os próximos passos consistem de realizar cromatografias em novas condições, e confirmando a proteína pura será possível realizar uma caracterização físico-química e estrutural, além de tornar possível estudos de atividades biológicas.

REFERÊNCIAS

- AYOUBA, A. et al. Interactions of plant lectins with the components of the bacterial cell wall peptidoglycan. **Biochemical systematics and ecology**, v. 22, n. 2, p. 153-159, 1994.
- AZANI, N. et al. A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny: The Legume Phylogeny Working Group (LPWG). **taxon**, v. 66, n. 1, p. 44-77, 2017.
- BANERJEE, R. et al. Conformation, protein-carbohydrate interactions and a novel subunit association in the refined structure of peanut lectin-lactose complex. **Journal of molecular biology**, v. 259, n. 2, p. 281-296, 1996.
- BELITZ, H.D; WEDER, J.K.P. Protein inhibitor of hidrolases in plant foodstuffs. **Food Rev. Int.**, v. 6, p. 151-211, 1990.
- BOTOS, I. et al. Structures of the complexes of a potent anti-HIV protein cyanovirin-N and high mannose oligosaccharides. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 37, p. 34336-34342, 2002.
- BOURNE, Y. et al. Structural basis for the unusual carbohydrate-binding specificity of jacalin towards galactose and mannose. **Biochemical Journal**, v. 364, n. 1, p. 173-180, 2002.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- C SILVA, H. et al. Purification and partial characterization of a new pro-inflammatory lectin from *Bauhinia bauhinioides* Mart (Caesalpinioideae) seeds. **Protein and Peptide Letters**, v. 18, n. 4, p. 396-402, 2011.
- CAVADA, B. S. et al. Purification and characterization of a lectin from seeds of *Vatairea macrocarpa* Duke. **Phytochemistry**, v. 49, n. 3, p. 675-680, 1998.
- CAVADA, B. S. et al. Comprehensive review on Caesalpinioideae lectins: From purification to biological activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 162, p. 333-348, 2020.
- CAVADA, B. S. et al. Revisiting proteus: do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins. **Current Protein and Peptide Science**, v. 2, n. 2, p. 123-135, 2001.
- CHAN, Y. S; NG, T. B. *Bauhinia variegata* var. *variegata* lectin: isolation, characterization, and comparison. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 175, n. 1, p. 75-84, 2015.

COELHO, L. C. B. B; DA SILVA, M. B. R. Simple method to purify milligram quantities of the galactose-specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*. **Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques**, v. 11, n. 5, p. 295-300, 2000.

CORREIA, S. E. G. Purificação e caracterização físico-química de lectina isolada de sementes de *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub. 2019.

FILHO, V. C. Chemical composition and biological potential of plants from the genus *Bauhinia*. **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v. 23, n. 10, p. 1347-1354, 2009.

GHAZARIAN, H.; IDONI, B.; OPPENHEIMER, S. B. A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. **Acta Histochemica**. v. 113, p. 236–247, 2011.

GOLDSTEIN IJ, HUGHES RC, MONSIGNY M, OSAWA T, SHARON N. What should be called a lectin?. **Nature**; 285:66, 1980.

HATAKEYAMA, T. et al. The interaction of castor bean lectins with galactomannan. **Agricultural and biological chemistry**, v. 53, n. 3, p. 853-854, 1989.

HAYES, C. E.; GOLDSTEIN, I. J. An α -d-galactosyl-binding lectin from *Bandeirae simplicifolia* seeds: isolation by affinity chromatography and characterization. **Journal of Biological Chemistry**, v. 249, n. 6, p. 1904-1914, 1974.

LAGARDA-DIAZ, I.; GUZMAN-PARTIDA, A. M.; VAZQUEZ-MORENO, L. Legume lectins: proteins with diverse applications. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 6, p. 1242, 2017.

LAMB, J. E.; SHIBATA, S.; GOLDSTEIN, I. J. Purification and characterization of *Griffonia simplicifolia* leaf lectins. **Plant physiology**, v. 71, n. 4, p. 879-887, 1983.

LIN, P.; NG, T. B. Preparation and biological properties of a melibiose binding lectin from *Bauhinia variegata* seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 22, p. 10481-10486, 2008.

LORIS, R. et al. Legume lectin structure. **Biochimica et biophysica acta (BBA)-Protein structure and molecular enzymology**, v. 1383, n. 1, p. 9-36, 1998.

MACEDO, M. L. R. et al. Insecticidal action of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotes subfasciatus* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 146, n. 4, p. 486-498, 2007.

MADDOX, D. E.; GOLDSTEIN, I. J.; LOBUGLIO, A. F. *Griffonia simplicifolia* I lectin mediates macrophage-induced cytotoxicity against Ehrlich ascites tumor. **Cellular Immunology**, v. 71, n. 1, p. 202-207, 1982.

MARTINS, F. W. V. Caracterização físico-química parcial de uma lectina isolada de sementes de *Machaerium acutifolium* Vogel. 2017.

MOREIRA, R.A.; PERRONE, J.C. Purification and partial characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiol.** 59: 783–787, 1977.

NAKAMURA-TSURUTA, S. et al. Evidence that *Agaricus bisporus* agglutinin (ABA) has dual sugar-binding specificity. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 347, n. 1, p. 215-220, 2006.

NUNES, B. S. et al. Lectin extracted from *Canavalia grandiflora* seeds presents potential anti-inflammatory and analgesic effects. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 379, n. 6, p. 609-616, 2009.

NWOSU, O. E. et al. Detection and isolation of novel lectin gene from *Piliostigma thonningii* seeds. **Am J Biochem**, v. 6, p. 72-81, 2016.

OLIVEIRA, M. D. L. et al. Purification of a lectin from *Eugenia uniflora* L. seeds and its potential antibacterial activity. **Letters in applied microbiology**, v. 46, n. 3, p. 371-376, 2008.

PAN, S.; TANG, J.; GU, X. Isolation and characterization of a novel fucose-binding lectin from the gill of bighead carp (*Aristichthys nobilis*). **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 133, n. 2-4, p. 154-164, 2010.

PANDEY, S.; AGRAWAL, R. C. Effect of *bauhinia variegata* bark extract on DMBA-induced mouse skin carcinogenesis: a preliminary study. **Global Journal of Pharmacology**, v. 3, n. 3, p. 158-162, 2009.

PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E. J. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**, v.109, p. 347-352, 1995.

PINTO, L. S. et al. Caracterização química e bioquímica de sementes de *Bauhinia variegata* L. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 9, p. 385-390, 2005.

PINTO, L. S. et al. Purification and molecular cloning of a new galactose-specific lectin from *Bauhinia variegata* seeds. **Journal of biosciences**, v. 33, n. 3, p. 355-363, 2008.

POHLEVEN, J.; ŠTRUKELJ, B.; KOS, J. Affinity chromatography of lectins. **Affinity Chromatography. InTech**, p. 49-74, 2012.

RAMOS, M.V.; MOREIRA, R.A.; CAVADA, B.S.; OLIVEIRA, J.T.A.; ROUGE, P. Interaction of lectins from the sub tribe Diocleinae with specific ligands. **R. Bras. Fisiol. Veg.**, v. 8, p. 193 – 199, 1996.

SCHOUPPE, D. et al. Mutational analysis of the carbohydrate binding activity of the tobacco lectin. **Glycoconjugate journal**, v. 27, n. 6, p. 613-623, 2010.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from haemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v. 14(11), p. 53–62. 2004.

SHARON, N.; LIS, H. Legume lectins--a large family of homologous proteins. **The FASEB Journal**, v. 4, p. 3198-3208, 1990.

SHARON, N; LIS, H. Lectins as cell recognition molecules. **Science**, v. 246, n. 4927, p. 227-234, 1989.

SILVA, A. L. C.; HORTA, A. C.; MOREIRA, R. A. Isolation and partial characterization of a lectin from *Bauhinia pentandra* (bong) vog. Ex. Steua. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, p. 262-269, 2001.

SILVA, H. C. Purificação e caracterização parcial de uma lectina pró-inflamatória de sementes de *Bauhinia bauhinioides* MART. 2010.

SILVA, J. A. et al. Isolation and biochemical characterization of a galactoside binding lectin from *Bauhinia variegata* candida (BvCL) seeds. **The Protein Journal**, v. 26, n. 3, p. 193-201, 2007.

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

SILVA, H. C. et al. BUL: a novel lectin from *Bauhinia unguolata* L. seeds with fungistatic and antiproliferative activities. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 2, p. 203-209, 2014.

SINGH, K. LATA; SINGH, D. K.; SINGH, V. K. Multidimensional uses of medicinal plant kachnar (*Bauhinia variegata* Linn.). **Am J Phytomed Clin Ther**, v. 4, n. 2, p. 58-72, 2016.

TSANEVA, M; VAN DAMME, E. J. M. 130 years of plant lectin research. **Glycoconjugate journal**, v. 37, n. 5, p. 533-551, 2020.

VAN DAMME, E. J. M. *et al.* Plant Lectins: A Composite of Several Distinct Families of Structurally and Evolutionary Related Proteins with Diverse Biological Roles. **Critical Reviews In Plant Sciences**, [s.l.], v. 17, n. 6, p.575-692, nov. 1998.

VAN DAMME, E. J. M. et al. Molecular cloning of two different mannose-binding lectins from tulip bulbs. **European journal of biochemistry**, v. 236, n. 2, p. 419-427, 1996.

VAN DAMME, E. J. M; LANNOO, N; PEUMANS, Willy J. Plant lectins. In: **Advances in botanical research**. Academic Press, 2008. p. 107-209.

VAN HOLLE, S; VAN DAMME, E. J. M. Messages from the past: New insights in plant lectin evolution. **Frontiers in plant science**, v. 10, p. 36, 2019.

VAN PARIJS, J. et al. Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. **Planta**, v. 183, n. 2, p. 258-264, 1991.

VAZ, A. M. SF; TOZZI, A. M. GA. Sinopse de *Bauhinia* sect. *Pauletia* (Cav.) DC. (Leguminosae: Caesalpinioideae: Cercideae) no Brasil. **Brazilian Journal of Botany**, v. 28, p. 477-491, 2005.

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

WATKINS, W. M.; MORGAN, W. T. J. Neutralization of the anti-H agglutinin in eel serum by simple sugars. **Nature**, v. 169, n. 4307, p. 825-826, 1952.

WINGFIELD, P. Protein precipitation using ammonium sulfate. **Current protocols in protein science**, v. 13, n. 1, p. A. 3F. 1-A. 3F. 8, 1998.

WU, A. M. et al. Recognition profile of *Bauhinia purpurea* agglutinin (BPA). **Life sciences**, v. 74, n. 14, p. 1763-1779, 2004.

YAMAMOTO, K et al. Purification and characterization of a carbohydrate-binding peptide from *Bauhinia purpurea* lectin. **FEBS letters**, v. 281, n. 1-2, p. 258-262, 1991.

YOUNG, N.; WATSON, D. C.; WILLIAMS, E. Lectins and legume chemotaxonomy: Characterisation of the N-acetyl-D-galactosamine specific lectin of *Bauhinia purpurea*. **FEBS letters**, v. 182, n. 2, p. 403-406, 1985.