



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRARIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE RECURSOS
NATURAIS

ALFA UMARO BARI

**LECTINAS PURIFICADAS DE SEMENTES DE *PARKIA NITIDA* MIQ. E *PARKIA*
PANURENSIS EX H. C. HOPKINS: DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA
PRIMÁRIA E ATIVIDADE CITOTÓXICA CONTRA NÁUPLIOS DE ARTEMIA**

FORTALEZA

2021

ALFA UMARO BARI

LECTINAS PURIFICADAS DE SEMENTES DE *PARKIA NITIDA* MIQ. E *PARKIA PANURENSIS* EX H. C. HOPKINS: DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA PRIMÁRIA E ATIVIDADE CITOTÓXICA CONTRA NÁUPLIOS DE ARTEMIA

Tese apresentada a Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos naturais da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção de título de Doutor em Biotecnologia de Recursos Naturais. Área de concentração: Biotecnologia de recursos naturais.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Kyria Santiago do Nascimento.

FORTALEZA

2021

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)

- B2321 Bari, Alfa Umaro.
Lectinas purificadas de sementes de *Parkia nitida* MIQ. e *Parkia panurensis* EX H. C. Hopkins :
determinação da estrutura primária e atividade citotóxica contra náuplios de *Artemia* / Alfa Umaro Bari. –
2021.
95 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, Fortaleza, 2021.
Orientação: Profa. Dra. Kyria Santiago do Nascimento.
1. Lectina de leguminosa. 2. *Parkia nitida*. 3. *Parkia panurensis*. 4. Estrutura primária. 5. Efeitos
biológico. I. Título.

CDD 660.6

ALFA UMARO BARI

LECTINAS PURIFICADAS DE SEMENTES DE *PARKIA NITIDA* MIQ. E *PARKIA PANURENSIS* EX H. C. HOPKINS: DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA PRIMÁRIA E ATIVIDADE CITOTÓXICA CONTRA NÁUPLIOS DE ARTEMIA

Tese apresentada a Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos naturais da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção de título de Doutor em Biotecnologia de Recursos Naturais. Área de concentração: Biotecnologia de recursos naturais.

Aprovada em 08/11/2021.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada (Coorientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

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

Dr. Vinícius José da Silva Osterne
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Maria Gleiciane de Queiroz Martins
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Prof. Dr. João Batista Cajazeiras
Centro Universitário INTA (UNINTA)

A minha família.

A todas as pessoas que me inspiram e incentivam a seguir em frente mesmo nos tempos de dificuldades, principalmente aos que andam comigo sem se importarem com o caminho.

AGRADECIMENTOS

A minha vida no Brasil, assim como a trajetória acadêmica que me trouxe até escrita desta tese tem sido de bastantes desafios e dificuldades, mas também de momentos bastante prazerosos. As barreiras que apareceram foram possíveis de superar graças à Deus, ao meu empenho com apoio de muitas pessoas, circunstâncias e situações aleatórias. Por isso gostaria de agradecer com toda a minha sinceridade;

À Allah pela misericórdia e a existência plena de vida.

À minha orientadora Professora Dra. Kyria Santiago do Nascimento e o meu coorientador Professor Dr. Benildo Sousa Cavada, pelas orientações, apoio e pelos os conhecimentos transmitidos dentro de laboratório e, por estarem sempre dispostos a ajudar no que for preciso para meu crescimento científico e pessoal.

À banca examinadora pelas valiosas colaborações e sugestões neste trabalho.

Aos meus colegas do trabalho: Dr. Vanir, Dra. Mayara T., Dra. Cláudia, Dr. Vinicius, Dra. Ivanice, Dra. Clareane, Dra. Gleiciane, Dr. Neto, Me. Messias, Ma. Mayara Q. Ma. Lara, Cláudio Dahne, Paula Ingrid, Yara, Maiara, a todos que fazem parte do BioMol-Lab pela rica convivência, reflexões, críticas e pela grande contribuição que deram para o desenvolvimento deste trabalho.

A todos os meus irmãos(as) e amigos(as) de continente e da diáspora que juntos formamos uma grande família de africanos no Ceará. De forma especial ao Jackson Candido, Massude, Fany Ramos, Perfirio, Lazaro Cá, Neirilene, Zé lopes, Zeca, Aldevino (Dadi), Fernando Pedro, Mariama Drame, Mancal, Alécio (Jahfar), Pericles, Nino Nhanca, Sebastião (Bato), Oda, Dario, Armando Kumara, Valdo, Sibelia, Tchonas, Andy, Lai Ucera e a todo(a)s que não consigo citar aqui por falta de espaço.

Às instituições CAPES e CNPq pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

De uma forma muito especial a toda minha família, a minha mãe Cadijatu Bari, o meu pai Abduramane Bari, a minha filha Sadja Oliveira Bari, a minha companheira Mariana Chaves, o Tio Sinhu Mustafa, a minha irmã Aissatu Sauane, irmãos, irmãs, tios, tias, primos, primas, pelo amor, educação, compreensão, paciência, carinho e por estarem sempre me apoiando. Sem vocês nada seria possível.

“Meu conhecimento aumenta

Minha memória reflete

Marcus Garvey disse”.

Winston Rodney “Burning Spear”.

RESUMO

Lectinas são proteínas encontradas em todas as classes de organismos vivos, elas desempenham diversas funções biológicas, sendo que nas plantas apresentam como uma das funções a defesa contra patógenos e predadores. As funções biológicas das lectinas estão relacionadas à sua capacidade de reconhecer e se ligar reversivelmente aos carboidratos. Duas novas lectinas de sementes de *Parkia panurensis* e *Parkia nitida* (família *Leguminosae*; subfamília *Mimosoideae*) foram purificadas com sucesso neste trabalho através da combinação de técnicas de química de proteínas, como precipitação com sulfato de amônio e as cromatografias de afinidade, de troca iônica e de exclusão molecular. As novas lectinas chamadas de PpaL e PNL, são metaloproteínas não-glicosiladas e específicas para os açúcares D-manose, D-glicose e seus derivados, e também são estáveis em ampla faixa de temperatura e pH. A PpaL apresentou massa molecular intacta de 50.5660 Da, já a PNL possui massa molecular intacta de 48760.3008 Da. Ambas as lectinas em solução na condição nativa se comportam como um dímero. O sequenciamento parcial da estrutura primária do PpaL resultou em um total de 334 resíduos de aminoácidos correspondente a 75% da cobertura total, enquanto que a sequência de estrutura primária da PNL resultou em um total de 451 resíduos de aminoácidos correspondendo a cobertura total da sequência. Tanto a PpaL como a PNL apresentaram alta homologia com outras lectinas do gênero *Parkia*. Estudos estruturais da PNL sugerem possível processamento pós traducional para as lectinas do gênero *Parkia*. PpaL e PNL são tóxicas contra *Artemia sp* com um valor de CL₅₀ de 20 e 61,38 µg/mL respectivamente. Diversas atividades biológicas de lectinas do gênero *Parkia* têm sido relatadas. Características essas que as tornam boas alternativas como biofármacos e candidatos para o tratamento de diversos tipos de doenças.

Palavras-chave: lectina de leguminosa; *Parkia nitida*; *Parkia panurensis*; estrutura primária; efeitos biológico.

ABSTRACT

Lectins are proteins found in all classes of living organisms. They perform several biological functions, and in plants they present as one of the functions the defense against pathogens and predators. The biological functions of lectins are related to their ability to recognize and bind reversibly to carbohydrates. Two new lectins from *Parkia panurensis* and *Parkia nítida* seeds (family *Leguminosae*; subfamily *Mimosoideae*) were successfully purified in this work through the combination of protein chemistry techniques, such as ammonium sulfate precipitation and affinity, ion exchange and molecular exclusion chromatographies. The new lectins, called PpaL and PNL, are non-glycosylated metalloproteins and specific for the sugars D-mannose, D-glucose and their derivatives. They are also stable over a wide temperature and pH range. The PpaL had an intact molecular mass of 50.5660 Da, whereas PNL has an intact molecular mass of 48760.3008 Da. Both lectins in solution in the native condition behave like a dimer. The partial sequencing of the primary structure of the PpaL resulted in a total of 334 amino acid residues corresponding to 75% of the total coverage, while the primary structure sequence of PNL resulted in a total of 451 amino acid residues corresponding to the total coverage of the sequence. Both PpaL and PNL showed high homology with other lectins of the genus *Parkia*. Structural studies of PNL suggest possible post-translational processing for lectins of the genus *Parkia*. PpaL and PNL are toxic against *Artemia* sp with an LC₅₀ value of 20 and 61.38 µg/mL respectively. Several biological activities of lectins of the genus *Parkia* have been reported. These characteristics make them good alternatives as biopharmaceuticals and candidates for the treatment of different types of diseases.

Keywords: *leguminosae* lectin; *Parkia nítida*; *Parkia panurensis*; primary structure, biological effects.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Classificação das lectinas dos vegetais de acordo com as suas características estruturais 25
- Figura 2 - Arvore evolutiva de lectinas relacionadas a jacalina. Uma visão taxonômica da distribuição de JRLs em várias famílias de plantas. Os nomes das plantas a partir das quais as estruturas da lectina foram experimentalmente determinadas estão indicados em negrito 29
- Figura 3 - Estrutura geral de uma subunidade tridimensional de jacalina e outros JRLs mostrando a prega β -prisma. BL1 a BL3 indicam os três loops de ligação a carboidratos, IL o loop de influência, QI a região envolvida na associação quaternária e PTM a região referente ao local de clivagem devido a uma modificação pós-tradução. As três folhas β (rotulados como sheet 1,2 e 3) 30
- Figura 4 - (A) Folhas, (B) inflorescência, (C) vagens (D) semente de *Parkia panurensis* 34
- Figura 5 - Cromatografia de afinidade em matriz Sepharose 4B-Manose (15 x 50 mm Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). 5 mg/mL de amostra (f0-60) aplicada. A amostra ficou em contato com a matriz por aproximadamente 12 horas. As proteínas não ligantes a matriz foram eluidas com tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,6 contendo NaCl 150mM (PI). As proteínas ligantes foram eluidas com Glicina 100 mM pH 2,6 contendo NaCl 150 mM (PII). As amostras foram coletadas em volume de 1 mL, a um fluxo de 0,7 mL/min e foram detectadas por espectrofotometria em 280 nm 42
- Figura 6 - Cromatografia de troca iônica em matriz DEAE-Sephacel (7,5 mm x 75 cm; ACQUITY, UPLC Waters). Foi aplicada 4 mg/mL de amostra (PII). As proteínas foram eluidas com tampão Tris-HCl 100 mM pH 7,6, contendo gradiente salina de 0,0 a 1 M. As amostras foram coletadas em volume de 1 mL, a um fluxo de 0,5 mL/min e foram detectadas por espectrofotometria em 280 nm 43

- Figura 7 - Cromatografia de exclusão molecular (7,8 mm x 30 cm, BioSuite, UPLC Waters). 2 mg/mL PpaL foi aplicada na coluna. Foi usado o tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,0, contendo NaCl 150 mM tanto para equilibrar a coluna como para eluir as proteínas em fluxo de 0,5 ml/min. As proteínas foram detectadas por espectrofotometria a absorvância de 280 nm 44
- Figura 8 - Eletroforese (SDS – PAGE). Gel de 15% corado com Coomassie Brilliant Blue G-250. (A) 1- 10 µg de PII. 2- 10 µg de PpaL. 3- Marcadores moleculares (120 kDa- β-galactosidase, 85 kDa-Albumina sérum bovina, 50 kDa-Ovalbumina, 35 kDa-Anidrase carbonico, 25 kDa-β-lactobumina e 20 kDa-lisozima). 4- 10 µg de PpaL na condição reduzida com β-mercaptoetanol. (B) Proteinas em condição nativa: 1- Marcadores moleculares (669 kDa -tiroglobulina, 440 kDa-baço equino, 232 kDa-fígado bovino, coração bovino 140 kDa, 66 kDa-soro bovino). 2- PpaL em condições nativas 46
- Figura 9 - Estabilidade térmica (A) e Estabilidade em diferentes pH (B) de PpaL 47
- Figura 10 - Efeito dos íons metálico sobre a Atividade Hemaglutinante de PpaL 47
- Figura 11 - Análise de espectrometria de massas de PpaL (ionização por electrospray). Espectro de massa deconvoluido mostra a massa média isotópica de PpaL obtido usando um espectrômetro de massa hibrido (SYNAPT HDMS System) 49
- Figura 12 - Predição da estrutura secundária de PpaL baseado na Sequência parcial 50
- Figura 13 - Ensaio de toxicidade contra Artemia sp. (A) Efeito tóxico de PpaL contra Artemia sp em diferentes concentrações (200, 100, 50 e 12,5 µg/ml); (B) O controle negativo: poços contendo apenas água do mar e Artemia sp. Controle positivo: 200 mg/ml da PpaL. Efeito tóxico da PpaL (200 µg/ml) previamente incubado com manose 100 mM e PpaL (200 µg/ml) desnaturado por aquecimento a 100 °C. EPM (n=5). *p <0,05 comparado com controle; #p <0,05 comparado com PpaL (200 µg/ml) 50

Figura 14 - Isoformas de peptídeos da preparação de PpaL. Duas isoformas dos peptídeos T12 e C8 obtidas através da técnica de dissociação induzida por colisão. (A) íon de serie Y com m/Z 1798,9750 e sequencia especifica interpretada como LSVGPGWGGSGGNYWSFK. (B) íon de serie Y com m/Z 1658,7442 e sequencia especifica interpretada como EGSLSLGPWGGSGGDPW

56

Figura 15 - Alinhamento de sequencias de aminoácidos das lectinas de *Parkia panurensis* (PpaL), *Parkia platycephala* (PPL) e *Parkia biglobosa* (PBL). Caixas vermelhas e branca representam aminoácidos idênticos e não idênticos respectivamente

57

Figura 16 - (A) Tronco, (B) folhas e vagens, (C) inflorescência e (D) sementes de *Parkia nítida*

61

Figura 17 - Cromatografia de afinidade em matriz Sepharose 4B-Manose. Volume do gel: 8 mL, 6 mg/mL de amostra (f0-60) aplicada. A amostra ficou em contato com a matriz por aproximadamente 14 horas. As proteínas não ligantes a matriz foram eluidas com tampão Tris-HC 50 mM pH 7,6 contendo NaCl 150mM (PI). A proteína ligante foram eluidas com Glicina 100 mM pH 2,6 contendo NaCl 150 mM (PII). As amostras foram coletadas em volume de 1 mL, a um fluxo de 0,7 mL/min e foram detectadas por espectrofotometria em 280 nm

66

Figura 18 - Cromatografia de exclusão molecular em matriz BioSuite, UPLC Waters. Volume do gel: 14,3 mL, 3 mg/mL de amostra (PII) aplicada. As proteínas foram eluidas com solução NaCl 300 mM. As amostras foram coletadas em volume de 1 mL, Fluxo de 0,6 mL/min e foram detectadas por espectrofotometria em 280 nm

67

Figura 19 - Eletroforese (SDS – PAGE). Gel de 15% corado com Coomassie Brilliant Blue G-250. (A) 1- Marcadores moleculares (120 kDa- β -galactosidase, 85 kDa- Albumina sérum bovina, 50 kDa-Ovalbumina, 35 kDa-Anidrase carbonico, 25 kDa- β -lactobumina e 20 kDa-lisozima). 2- 20 μ g de PI. 3- 20 μ g de PII (B); 1-

	Marcadores moleculares (120 kDa, 85 kDa, 50 kDa, 35 kDa e 25 kDa). 2- 20 µg de AII. 3- 20 µg de AI (PNL)	70
Figura 20 -	Estabilidade térmica (A) e Estabilidade a variação de pH (B) de PNL	71
Figura 21 -	Efeito dos íons metálico sobre a Atividade Hemaglutinante de PNL	72
Figura 22 -	Análise de espectrometria de massas de PNL (ionização por electrospray). Espectro de massa deconvoluido mostra a massa média isotópica de PNL obtido usando um espectrômetro de massa híbrido (SYNAPT HDMS System)	73
Figura 23 -	Estrutura primária. Sobreposição dos peptídeos de lectina de <i>Parkia nitida</i> obtidos pela digestão enzimática. As enzimas utilizadas são diferenciadas pelas cores; verde para tripsina (T), azul para quimiotripsina (C) e amarelo para pepsina (P)	74
Figura 24 -	Alinhamento de sequências de aminoácidos das lectinas de <i>Parkia nitida</i> (PNL), <i>Parkia platycephala</i> (PPL) e <i>Parkia biglobosa</i> (PBL). Caixas vermelhas e branca representam aminoácidos idênticos e não idênticos respectivamente	78
Figura 25 -	Estrutura primária parcial de cadeia β. Sobreposição dos peptídeos obtidos pela digestão enzimática. As enzimas utilizadas são diferenciadas pelas cores; verde para tripsina (T) e azul para quimiotripsina (Q)	80
Figura 26 -	Alinhamento de sequências de aminoácidos da lectina de <i>Parkia nitida</i> (PNL) com a cadeia-β de PNL. Caixas vermelhas e branca representam aminoácidos idênticos e não idênticos respectivamente	81
Figura 27 -	Ensaio de toxicidade contra <i>Artemia</i> sp. (A) Efeito tóxico de PNL contra núprios de <i>Artemia</i> sp em diferentes concentrações (200, 100, 50 e 12,5 µg/ml); (B) Controle negativo: poços contendo apenas água do mar e <i>Artemia</i> sp. Controle positivo: 200 µg/ml da PNL. Efeito tóxico da PNL (200 µg/ml) previamente incubado com manose 100 mM e PNL (200 µg/ml) desnaturado por aquecimento a 100 °C. *p <0,05 comparado com controle; #p <0,05 comparado com PNL (200 µg/ml)	

Figura 28 - Peptídeos da estrutura primaria de PNL. Duas isoformas dos peptídeos P5 e T9 obtidas através da técnica de dissociação induzida por colisão. (A) íon de serie Y com m/Z 760.37560 e sequencia especifica interpretada como PNDLGVF. (B) íon de serie Y com m/Z 863.43893 e sequencia especifica interpretada como NDLFVEK

Figura 29 - Fragmentos de PNL. (A) Cadeia- α : composta por domínios β -prisma I, II e III. (B) Cadeia- β : composta por domínios β -prisma I e II. (C) Cadeia- γ : composta apenas por domínios β -prisma I

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resumo de algumas propriedades físico-químicas e estruturais das lectinas do gênero <i>Parkia</i>	27
Tabela 2 - Inibição de atividade Hemaglutinante de lectina de semente de <i>Parkia panurensis</i> por diferentes carboidratos	41
Tabela 3 - Tabela de purificação da lectina de sementes de <i>Parkia panurensis</i>	45
Tabela 4 - Peptídeos usados para determinar a sequência de aminoácidos de lectina de sementes de <i>Parkia panurensis</i> . peptídeo identificado como T foi digerido com tripsina. Q foi digerido com quimiotripsina e P foi digerido com pepsina. A letra X na sequência representa resíduos de leucina ou isoleucina, quais não podem ser distinguidas pela massa	51
Tabela 5 - Atividade Hemaglutinante nos extratos proteicos de sementes de <i>Parkia nítida</i>	64
Tabela 6 - Inibição de atividade Hemaglutinante de lectina de semente de <i>Parkia nítida</i> por diferentes carboidratos	65
Tabela 7 - Tabela de purificação da lectina de sementes de <i>Parkia nítida</i>	68
Tabela 8 - Peptídeos usados para determinar a sequência de aminoácidos de lectina de sementes de <i>Parkia nitida</i> . peptídeo identificado como T foi digerido com tripsina. Q foi digerido com quimiotripsina e P foi digerido com pepsina. A letra X na sequência representa resíduos de leucina ou isoleucina, quais não podem ser distinguidas pela massa (continua)	75
Tabela 9 - Peptídeos usados para determinar a sequência parcial de cadeia β de lectina de sementes de <i>Parkia nitida</i> . peptídeo identificado como T foi digerido com tripsina. Q foi digerido com químiotripsina. A letra X na sequência representa resíduos de leucina ou isoleucina, quais não podem ser distinguidas pela massa	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Å	Angstrom
AH	Atividade Hemaglutinante
AHE	Atividade Hemaglutinante Especifica
BSA	Albumina Sérica Bovina
CID	Collision Induced Dissociation (Dissociação Induzida por colisão)
CRD	Carbohydrate Recognition Domain (Domínio de Reconhecimento a Carboidrato)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ESI	Ionização por Eletro Spray
HCl	Ácido clorídrico
kDa	Kilodalton
M	Concentração molar
mgP	Miligrama de proteína
mL	Mililitro
MS	Mass Spectrometry (Espectrometria de Massas)
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
nm:	Nanômetro
PBL	Lectina purificada de sementes de <i>Parkia biglobosa</i>
PNL	Lectina purificada de sementes de <i>Parkia nitida</i>
PpaL	Lectina purificada de sementes de <i>Parkia panurensis</i>
PpeL	Lectina purificada de sementes de <i>Parkia pendula</i>
PPL	Lectina purificada de semente de <i>Parkia platycephala</i>
pH	Logaritmo negativo da concentração de íons de hidrogênio
RPM	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-	Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de dodecil sulfato de sódio
PAGE	
Tris	Hidroximetil Aminometano
UH	Unidade Hemaglutinante
µg	Micro grama

μL Micro Litro

α Alfa

β Beta

γ Gama

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	Considerações gerais	21
1.2	Lectinas dos vegetais de família Leguminosae	23
1.3	Lectinas de gênero Parkia	26
1.4	Aplicação biológica das lectinas do gênero Parkia	32
2	PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE UMA NOVA TECTINA DE SEMENTES DE PARKIA PANURENSIS EX H. C. HOPKINS E AVALIAÇÃO DOS SEUS SEFEITOS BIOLÓGICOS	34
2.1	Objetivos	34
2.1.1	<i>Objetivo geral</i>	34
2.1.2	<i>Objetivos específicos</i>	34
2.2	Matérias e métodos	35
2.2.1	<i>Animais</i>	35
2.2.2	<i>Matérias vegetais</i>	35
2.2.3	<i>Ensaio de hemaglutinação e inibição de atividade hemaglutinante por carboidratos</i>	36
2.2.4	<i>Extração, fracionamento, dosagem de proteínas e carboidratos</i>	36
2.2.5	<i>Purificação de lectina de sementes de Parkia panurensis</i>	37
2.2.6	<i>Caracterização físico-química</i>	38
2.2.6.1	<i>Eletroforese em condição desnaturante (SDS-PAGE)</i>	38
2.2.6.2	<i>Efeito de temperatura, pH e íons metálicos sobre a atividade hemaglutinante de PpaL</i>	38
2.2.7	<i>Determinação de massa molecular intacta por espectrometria de massas (ESI- MS)</i>	39
2.2.8	<i>Determinação de estrutura primária por espectrometria de massa em tandem e predição de estrutura secundária</i>	39
2.2.9	<i>Teste de toxicidade contra Artemia sp</i>	40
2.2.9.1	<i>Obtenção de náuplios de Artemia sp</i>	40
2.2.9.2	<i>Teste de letalidade contra Artemias sp</i>	40

2.2.9.3	<i>Efeitos de manose e desnaturação térmica da lectina em toxicidade contra Artemia sp</i>	41
2.2.9.4	<i>Análises estatísticas</i>	41
2.3	Resultados	42
2.3.1	<i>Extração proteica, ensaios de hemaglutinação e inibição de atividade hemaglutinante por carboidratos</i>	42
2.3.2	<i>Análise eletroforética, efeitos da temperatura, pH e íons metálicos sobre atividade hemaglutinante da PpaL</i>	46
2.3.3	<i>Determinação de massa molecular intacta e predição das estruturas primária e secundária da proteína</i>	49
2.3.4	<i>Ensaio de citotoxicidade contra Artemia sp</i>	53
2.4	Discussão	54
2.5	Conclusão	60
3	PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO DA ESTRUTURA PRIMARIA E AVALIAÇÃO DE EFEITOS BIOLÓGICOS DE UMA NOVA LECTINA DE SEMENTE DE PARKIA NÍTIDA MIQ.	61
3.1	Objetivos	61
3.1.1	<i>Objetivo geral</i>	61
3.1.2	<i>Objetivos específicos</i>	61
3.2	Materiais e métodos	62
3.2.1	<i>Animais</i>	62
3.2.2	<i>Materiais vegetais</i>	62
3.2.3	<i>Extração e fracionamento proteico</i>	63
3.2.4	<i>Purificação de lectina de sementes da Parkia nitida</i>	63
3.3	Resultados	65
3.3.1	<i>Extração proteica, ensaios de hemaglutinação e inibição de atividade hemaglutinante por carboidratos</i>	65
3.3.2	<i>Purificação de lectina de sementes da Parkia nitida</i>	67
3.3.3	<i>Caracterização físico-química</i>	70
3.3.3.1	<i>SDS – PAGE</i>	70
3.3.3.2	<i>Efeito de temperatura, pH e EDTA sobre atividade hemaglutinante</i>	72
3.3.4	<i>Determinação de massa molecular intacta e a estrutura primária de PNL</i>	73

3.3.5	<i>Determinação de estrutura primaria parcial de cadeia β de PNL</i>	80
3.3.6	<i>Teste de toxicidade contra Artemia sp</i>	83
3.4	Discussão	84
3.5	Conclusões	92
	REFERÊNCIAS	93

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais

Lectinas são proteínas encontradas em todas as classes de organismos vivos. Elas desempenham diversas funções biológicas, sendo que nas plantas apresentam como uma das suas funções a defesa contra os patógenos e os predadores. Acredita-se que as plantas acumulam parte de sua reserva de nitrogênio na forma de proteínas ligantes a carboidratos, que podem ser utilizadas como proteínas de defesa passiva (Peumans and Damme 1994). Progressos importantes nos estudos sobre as lectinas vem sendo registrados ao longo dos anos, porém, muitas dos seus potenciais funções biológicas ainda não são bem elucidadas. Entretanto, as funções biológicas das lectinas geralmente estão relacionadas com o seu domínio de reconhecimento a carboidratos.

Os carboidratos, conhecidos também como glicídios, ou açúcares, são biomoléculas formadas fundamentalmente por átomos de carbono, hidrogênio e oxigênio podendo apresentar nitrogênio, fósforo ou enxofre na sua composição. A maioria destas biomoléculas apresenta à formula empírica de $[C(H_2O)]_n$, onde o "n" da fórmula geral pode variar de 3 a 7 (trioses, tetroses, pentoses, hexoses e heptoses). Os carboidratos podem ser divididos em 3 categorias: Monossacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos. Os monossacarídeos são as estruturas mais simples dos carboidratos. São aldeídos ou cetonas contendo um ou mais grupo hidroxila na molécula. Os átomos de carbono nos quais os grupos hidroxila estão ligados se constituem centros quirais, dando origem aos numerosos açúcares estereoisômeros (nas formas D e L) encontrados na natureza. O fenômeno da isomerização possibilita aos carboidratos assumirem elevados números de conformações fazendo delas moléculas biológicas mais complexas com grande variedade estrutural, aumentando assim, as possibilidades de interligações e de interação com outras classes das moléculas biológicas e conseqüentemente aumento na variedade de funções biológicas. A realização de diversas funções biológicas por carboidratos deve-se as suas propriedades hidrofílicas e alta carga eletrostática. Os oligossacarídeos covalentemente ligados influenciam o dobramento e a estabilidade das proteínas, fornecem informações críticas sobre o destino de proteínas recém-sintetizadas e permitem os reconhecimentos específicos por outras proteínas. A forma mais simples de detectar a presença de lectina num extrato proteico é explorando a sua habilidade de aglutinar eritrócitos sanguíneos ou precipitar glicoconjugados. Em alguns casos a atividade hemaglutinante pode ser potencializada pelo tratamento das células com enzimas proteolíticas e neuraminidase. O tratamento enzimático permite remoção de

proteínas expostas na superfície celular das hemácias que podem causar impedimento estérico na interação lectina hemácias. A técnica que determina a especificidade de uma lectina com determinado carboidrato, compara os açúcares com base na concentração mínima inibitória ou pela reação de precipitação (Moreira et al. 1991).

Algumas proteínas eventualmente sofrem processamento pós-traducional, onde os carboidratos são ligados covalentemente a proteína. Neste processo as ligações glicosídicas com proteínas podem ser formadas de duas formas. A primeira forma chamada de *N*-glicosilação envolve a ligação de uma *N*-Acetilglicosamina (GlcNAc) à cadeia amina lateral de um resíduo de asparagina. A sequência de aminoácidos (a.a) reconhecida para a *N*-ligação de carboidratos é Asparagina–X a.a.–Serina ou treonina, onde X pode ser qualquer aminoácido exceto prolina. A segunda forma chamada de *O*-glicosilação envolve a ligação do C-1 de uma GalNAc ao grupo hidroxil da cadeia lateral de um resíduo de serina ou treonina (Gorelik, Galili, and Raz 2001). Sendo a presença destas sequências de aminoácido em qualquer região da proteína não significa que obrigatoriamente ela será glicosilada, mas apenas indica que a proteína tem potencial de glicosilação uma vez que estas sequencias são necessárias para o reconhecimento das enzimas. Além das proteínas, os carboidratos também podem se ligar covalentemente com lipídios, formando o glicocálice presentes na superfície das células. Estes glicoconjugados podem desempenhar funções importantes como código postal para endereçamento de algumas proteínas ou como mediadores na interação célula–célula ou interação célula–moléculas extracelulares. Os carboidratos são as biomoléculas mais abundantes na natureza e desempenham diversas funções biológicas, portanto estudar a composição, sequência, organização estrutural e os mecanismos de interações com outras moléculas, sobre tudo com as lectinas que são capazes de reconhecer e se ligar com carboidratos podem fornecer informações importantes para detecção e/ou controle de doenças causadas por microrganismos patogênicos que possuem padrões de glicosilação específicos nas superfícies de parede celular. Dentro deste contexto, o presente trabalho tem como principal proposta purificar lectinas de duas espécies do gênero *Parkia*, caracterizar físico-química e estruturalmente através da combinação das técnicas de química de proteínas, espectrometria de massas e de bioinformática, determinar a especificidade com diferentes carboidratos e avaliar atividades biológicas como toxicidade contra *Artemia sp.*

1.2 Lectinas dos vegetais de família *Leguminosae*

A família *Leguminosae* (leguminosa) é considerada como a de maior riqueza de espécies arbóreas nas florestas neotropicais, havendo um grande número de táxons endêmicos nesta região. Alguns ecossistemas brasileiros são centros de diversidade para o grupo e muitas das espécies são exclusivas destes ambientes. No Brasil ocorrem cerca de 220 gêneros e 2736 espécies. Uma característica importante de algumas plantas desta família é a simbiose de suas raízes com as bactérias que fixam o nitrogênio. A hipótese de que este evento pode ser intermediado por lectinas tornou-se mais atrativo após a descoberta de que as bactérias de gênero *Rhizobium* produzem um fator extracelular que está envolvido nos eventos iniciais de simbiose, qual geralmente contém grupos de carboidratos nas suas estruturas e eventualmente estes carboidratos podem interagir com lectinas existentes nas raízes das plantas (Roche et al. 1991). Além disso, as lectinas de leguminosas desempenham um papel determinante no desenvolvimento da lectinologia, algumas lectinas desta família, inclusive, se tornaram ferramentas indispensáveis na pesquisa biológica e biomédica além de serem amplamente utilizadas como proteínas bioativas tanto na pesquisa quanto na medicina (Damme et al. 1998). É importante ressaltar que existe uma contradição em relação à divisão da subfamília da família *Leguminosae*, porque uma taxonomia mais recente classifica *Mimosoideae* como um clado dentro da subfamília *Caesalpinoideae*. No entanto neste trabalho adotaremos a taxonomia antiga que considera que a família das leguminosas é morfológicamente subdividida em três subfamílias que são: *Caesalpinoideae*, *Mimosoideae* e *Papilionoideae*. Dezenas de lectinas isoladas de membros desse táxon já foram caracterizadas quanto as suas propriedades químicas, físicas, estruturais e biológicas. O volume dos trabalhos publicados sobre as lectinas de plantas, demonstra que a família dos leguminosas é a mais bem estudada, sendo que a subfamília *Papilionoideae* se destaca como sendo a mais estudada dentro deste táxon (Mann et al. 2001). No entanto, essas proteínas que pertencem ao mesmo táxon e apresentam várias características estruturais e bioquímicas em comum, também exibem diferenças nas especificidades de ligações à monossacarídeos/glicanos e arranjos quaternários (Debray et al. 1981). Em geral, as lectinas de leguminosas têm uma estrutura monomérica conservada, apresentando certa similaridade nas sequências dos aminoácidos, ao mesmo tempo em que exibem uma notável variedade de associações terciárias e quaternárias com importantes implicações funcionais (Srinivas et al. 2001). A conservação das características gerais das suas estruturas 3D, pode significar que as lectinas de leguminosas evoluíram e principalmente divergiram-se nas regiões dos sítios de ligações combinados para exibirem especificidades diferentes e, portanto,

desempenharem funções específicas no metabolismo das plantas (Ramos et al. 2000). Algumas lectinas de leguminosas necessitam de íons metálicos bivalentes como cálcio e manganês na sua estrutura para se ligarem a carboidratos. A ausência desses metais resulta em uma instabilidade local e na perda da capacidade de ligar-se a carboidratos (Loris et al. 2004).

As lectinas de leguminosas são sintetizadas no retículo endoplasmático na forma de pré-pro-lectinas que depois passa por estágio de pro-lectina e finalmente a lectina madura. Durante todo o processo de síntese a pré-pro-lectina que possui na sua extremidade N-terminal um peptídeo sinal, com 20 a 30 resíduos de aminoácidos é transportado para outras organelas sofrendo uma série de modificações pós-traducionais como glicosilação e clivagens proteolíticas, dando origem a lectina madura (Sharon and Lis 1990).

As lectinas de leguminosas são interessantes devido as suas diversas funções fisiológicas nas plantas, tais como o reconhecimento e colonização de bactérias fixadores de nitrogênio nas células epidérmicas de raízes, o transporte de açúcares, hormônios ou glicoproteínas (Carrizo et al. 2005; Sreevidya et al. 2005; Wong and Ng 2006), além de estarem envolvidas na defesa contra microrganismos e insetos (Peumans and Damme 1994), em ações antifúngicas, em atividades bactericidas e inseticidas (Yan et al. 2005).

Desde a descoberta de primeira lectina dos vegetais denominada de ricina por Hermann Stillmark em 1888 quando estudava o princípio da toxicidade de sementes de mamona (*Ricinus communis*), houve várias tentativas de denominação e definição desta classe de proteína que começou com os termos Hemaglutininas ou fitoaglutininas, até que em 1954 Boyd e Shapligh propõem o termo “lectina” (do Latim *legere*, que significa escolher) pretendendo, assim, chamar atenção para sua especificidade, sem desvirtuar a questão quanto à sua natureza. Em 1972 Sharon e Lis, ampliaram esta definição, incluindo todos ligantes de açúcar, aglutinadores de células e proteínas de origem não imune, sejam eles de plantas, animais ou microorganismos. Sendo que esta definição deturpa o verdadeiro significado da palavra lectina. Neste ponto de vista, o nome aglutinina que geralmente é usada como sinônimo de lectina, talvez seja mais correto porque se refere à habilidade que as proteínas ligantes a carboidrato têm de se aglutinar eritrócitos ou outras células (Peumans and Damme 1994). Posteriormente as lectinas foram definidas como proteínas ou glicoproteínas ligantes a carboidratos de origem não imune que aglutinam células e/ou precipitam glicoconjugados (Goldstein et al. 1980). Entretanto essa definição é excludente a algumas lectinas, pois só contempla aquelas com domínios múltiplos de ligação a carboidratos. As definições para lectinas sofreram várias adaptações ao longo do tempo e atualmente, a definição mais aceita foi proposta por (Damme et al. 1998; Peumans and Damme 1994). Segundo estes autores, lectinas são proteínas de origem não imune contendo

pelo menos um domínio não catalítico que se liga reversivelmente a mono ou oligossacarídeos específicos. Esta nova definição inclui uma ampla variedade de proteínas que se comportam de forma bastante diferente do ponto de vista das suas propriedades de aglutinação e/ou precipitação de glicoconjugados.

As lectinas vegetais formam um grupo muito heterogêneo de proteínas podendo ser agrupadas em famílias caracterizadas por sequências similares dos aminoácidos ou organização estrutural. Van Damme e colaboradores (1998), subdividiram as lectinas dos vegetais de acordo com as suas características estruturais em quatro classes principais que são: merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas (Figura 1).

As merolectinas são proteínas que apresentam apenas um único domínio de ligação a carboidratos. Devido ao seu caráter monovalente são incapazes de precipitar glicoconjugados ou aglutinar células. Um exemplo dessa classe é a heveína, uma lectina que se liga a quitina e é extraída do látex da *Hevea brasiliensis* (Van Parijs et al. 1991).

As hololectinas são proteínas que possuem mais de um domínio de ligação a carboidrato, sendo estes domínios específicos para um mesmo carboidrato ou para carboidratos estruturalmente semelhantes. Elas representam a classe de lectina mais bem estudada e um exemplo desta classe é PBL, uma lectina que se liga a manose/glicose isolada de *Parkia biglobosa* Mart. (SILVA et al., 2013).

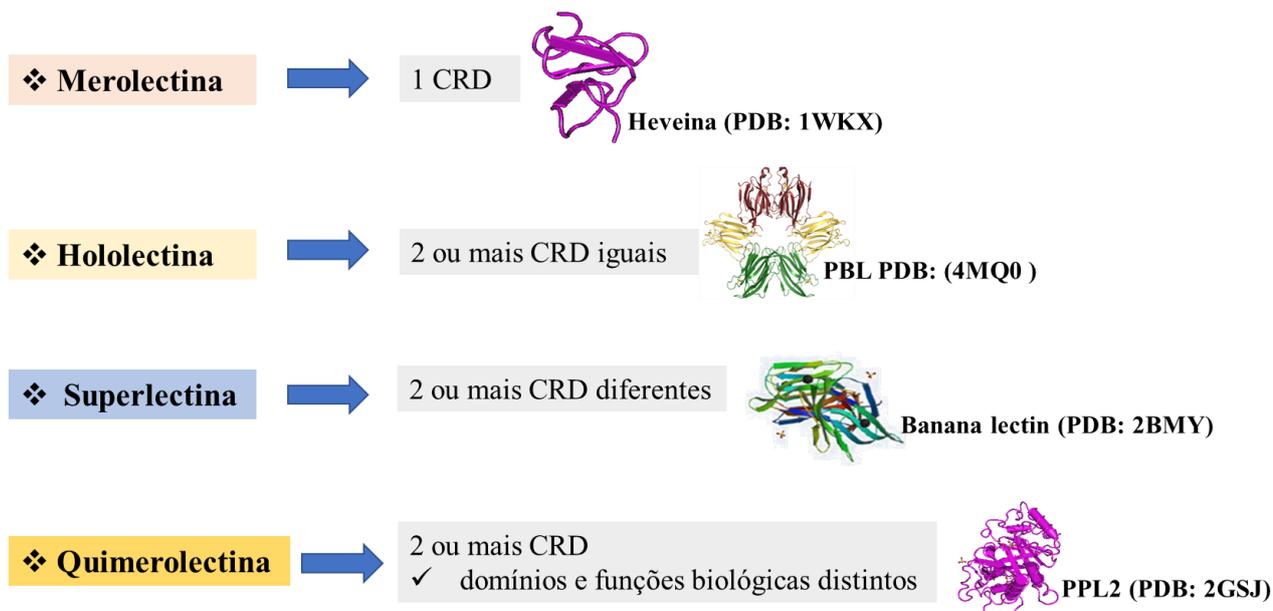
As quimerolectinas são proteínas que possuem um ou mais sítios de ligações a carboidratos e além disso um domínio não relacionado. Esse domínio não relacionado pode ter uma atividade enzimática bem definida ou qualquer outra atividade biológica que atue independentemente do sítio de ligação a carboidratos. Um exemplo dessa classe é a PPL-2, uma lectina ligante de quitina isolada de sementes de *Parkia platycephala* que possui um segundo sítio ativo, no caso um sítio catalítico endoquitinásico (Cavada et al. 2005).

As superlectinas são proteínas que de forma semelhante às hololectinas possuem mais de um domínio de ligação a carboidrato, porém esses domínios reconhecem carboidratos estruturalmente diferentes. Um exemplo dessa classe é a lectina de tulipa (família *Lilaceae*) que possui um domínio N-terminal manose-ligante arranjado a um domínio GalNac-ligante não relacionado (Damme et al. 1998).

Segundo o Van Damme e colaboradores (1998), as lectinas de vegetais ainda podem ser classificadas em sete famílias de acordo com as suas características evolutivas. São elas: 1) Lectinas de leguminosas; 2) Lectinas de monocotiledôneas ligantes a manose; 3) Lectinas

ligantes a quitina; 4) Proteínas inibidoras de ribossomo (RIPs tipo 2); 5) Lectinas relacionadas a jacalina; 6) Lectinas relacionadas a amarantina e 7) lectinas de floema de *Curcubitaceae*. Esta classificação baseia-se em características estruturais e de afinidade a carboidratos apresentadas por essas proteínas.

Figura 1. Classificação das lectinas dos vegetais de acordo com as suas características estruturais.



CRD = Domínio de reconhecimento a carboidrato.

Fonte. Elaborado pelo autor (figura adaptado de Peumans *et al.*, 1995)

1.3 Lectinas de gênero *Parkia*

A subfamília *Mimosoideae* é considerada o grupo mais primitivo dentro das plantas de família das leguminosas. A primeira detecção da lectina de subfamília *Mimosoideae* foi do gênero *Acácia*, porém a primeira lectina desta subfamília a ser purificada pertence a gênero *Mimosa* (Cavada *et al.* 2020). O gênero *Parkia* é mais bem estudada dentro desta subfamília, tendo muitas lectinas purificadas das suas sementes, caracterizadas físico-quimicamente, estruturalmente, e também, com algumas atividades biológicas determinadas. Dentro o gênero *Parkia* as espécies dos quais já foram purificadas as lectinas a partir dos sementes são: *P. speciosa* (Suvachittanont and Peutpaiboon 1992), *P. javanica* (Utarabhand and Akkayanont 1995), *P. platycephala* (Cavada *et al.* 1997), *P. discolor* (Cavada *et al.* 2000), *P. biglobosa* (Silva *et al.* 2013), *P. pendula* (Favacho *et al.* 2007), *P. biglandulosa*, *P. roxburghii* (Kaur *et*

al. 2005), *P. panurensis* (Cavada, Bari, et al. 2020) e a *P. nítida* que teve uma nova lectina purificada neste trabalho. Em geral, as lectinas de sementes de gênero *Parkia* pertencem ao grupo de lectinas ligantes a manose/glicose com preferência para manose e os seus derivados. As lectinas deste gênero compartilham algumas características e propriedades em comum, tais como conformação dimérica em solução e, na condição desnaturada, geralmente, apresentam o perfil eletroforético (SDS-PAGE) com pesos moleculares aparente em torno de 40–50 kDa. No entanto, os perfis podem ser diferentes no que diz respeito à quantidade de bandas que aparecem no gel de eletroforese, podendo ser de umas até quatro bandas dependendo da espécie, sendo que, provavelmente, o método de purificação utilizado pode influenciar na quantidade de bandas e, por outro lado, a quantidade das bandas também pode ser um indicativo de que as preparações destas lectinas podem ser compostas por hetero proteínas ou diferentes isoformas ou talvez um indicativo de possível processamento pós-traducional incompleto, provavelmente causada pelo baixa eficiência da enzima, gerando assim fragmentos de cadeias polipeptídicas (domínios) incompletas. Algumas das propriedades físico-químicas e estruturais de lectinas de gênero *Parkia* estão resumidas na tabela 1. Poucas lectinas do gênero *Parkia* tiveram as suas estruturas primárias completamente resolvidas, sendo elas: *Parkia platucephala* (PPL) (Mann et al. 2001), *Parkia biglobosa* (PBL) (Silva et al. 2013), *Parkia pendula* (PpeL) (Carneiro et al. 2021), *Parkia nítida* (PNL) e *Parkia panurensis* (PpaL) que tiveram as suas estruturas primárias determinadas neste trabalho. No entanto, apenas PPL, PBL, PpeL e PNL tiveram as suas estruturas tridimensionais resolvidas. As estruturas tridimensionais de PPL e PBL foram resolvidas experimentalmente por cristalografia e difração de raios-x, enquanto que as estruturas de PpeL e PNL foram preditas por modelagem molecular. O alinhamento das sequências de aminoácidos destas lectinas apresentou alta homologia, chegando acima de 90% de similaridade entre elas. Os dados obtidos das sequências dos aminoácidos que compõem as estruturas primárias das lectinas de *Parkia* mostram substituição conservadas de alguns resíduos de aminoácidos, reforçando a hipótese da presença de isoformas nas preparações destas proteínas. Os estudos estruturais demonstraram que as lectinas de *Parkia*, assim como as lectinas relacionados com jacalina são constituídas por três domínios β -prisma repetidos, arranjados em tandem, onde cada domínio é composto por cerca de 150 resíduos de aminoácidos e compartilham cerca de 45% de similaridade entre as suas sequências (Mann et al. 2001) (Silva et al. 2013) (Carneiro et al. 2021).

Tabela 1. Resumo de algumas propriedades físico-químicas e estruturais das lectinas do gênero *Parkia*.

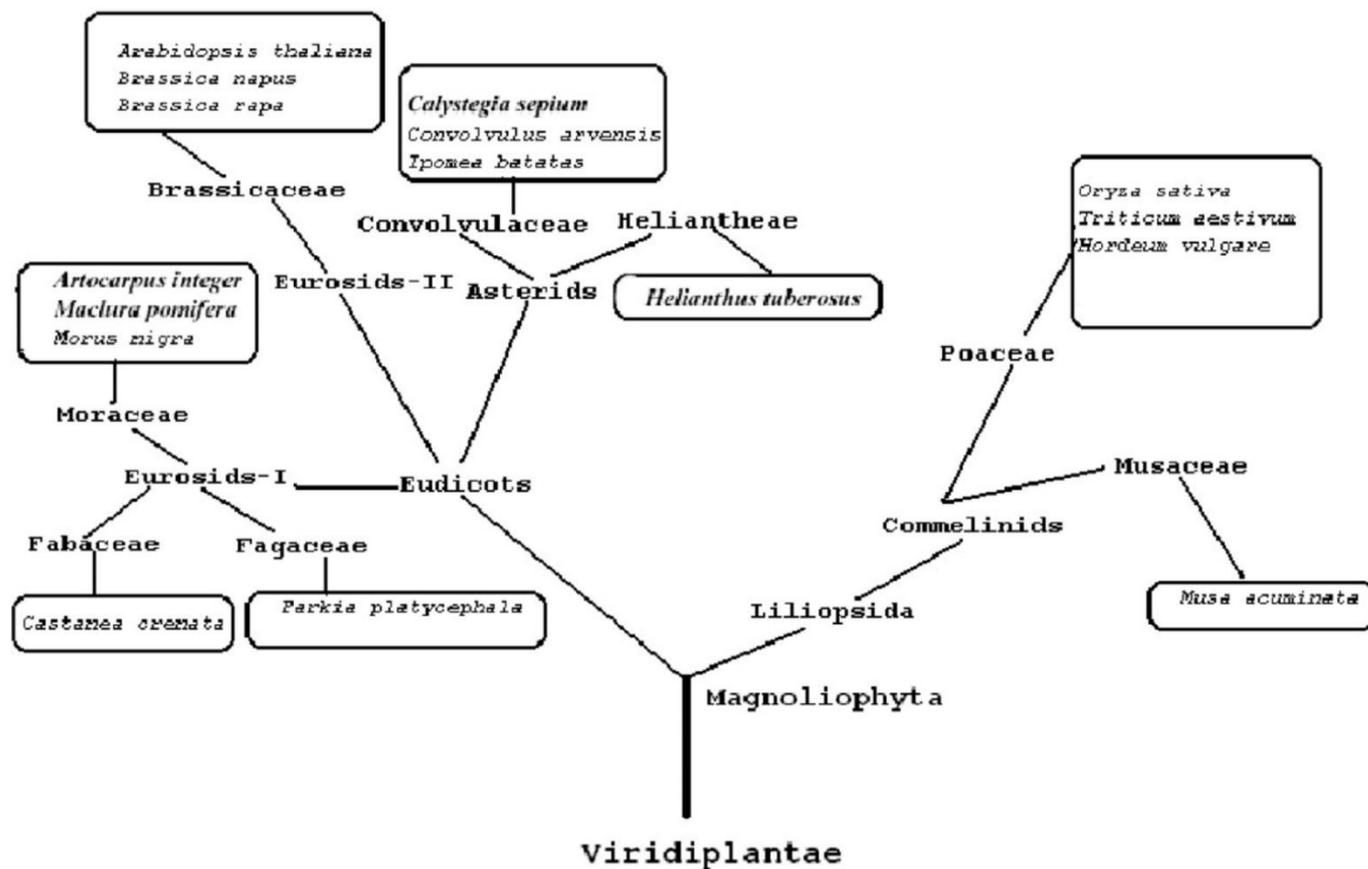
Espécie	Especificidade	Massa molecular (Da)	Bandas no gel SDS-PAGE	Dependência de íons metálicos	Glicoproteína	Estrutura primária	Estrutura terciária
<i>P. biglobosa</i>	Manose/glicose	47.562	1	Não	Não	Sim	Sim
<i>P. platycephala</i>	Manose/glicose	47.951	1			Sim	Sim
<i>P. javanica</i>	Manose	47.900	2	Ca ²⁺ Mn ²⁺ e Mg ²⁺		Não	Não
<i>P. pendula</i>	Manose/glicose	47.410	1		Não	Sim	Sim
<i>P. speciosa</i>	Manose/glicose	47.300	3	Não	Sim (1,5% de carboidrato)	Não	Não
<i>P. panurensis</i>	Manose/glicose	50.566	1	Ca ²⁺ e Mn ²⁺	Não	Parcial	Não
<i>P. discolor</i>	Manose/glicose	58.000	1			Não	Não
<i>P. biglandulosa</i>	Manose/glicose	49.500	4	Ca ²⁺ e Mn ²⁺	Sim (1,06% de carboidrato)	Não	Não
<i>P. roxburghii</i>	Manose/glicose	49.100	4	Ca ²⁺ e Mn ²⁺	Sim (0,60% de carboidrato)	Não	Não
<i>P. nitida</i>	Manose/glicose	48.760	3	Ca ²⁺ e Mn ²⁺	Não	Sim	Sim

Fonte. Elaborado pelo autor.

A jacalina é um nome trivial dado a lectina galNAc/gal específica isolada de sementes de fruta de jaca (*Artocarpus integrifolia*). Atualmente o termo JRL é usado como um nome coletivo para todas as lectinas que são estruturalmente e evolutivamente, relacionado à lectina de fruta de jaca. A família jacalina é subdividida em dois subgrupos de lectinas. O primeiro subgrupo são lectinas de sementes da família *Moraceae* específicos a GalNAc, quais são muito similares a lectina de fruta de jaca. O segundo subgrupo são lectinas da família *Convolvulaceae*, que compartilham similaridade da sequência com lectinas de *Moraceae*, mas, também exibem especificidade com manose/maltose (Damme et al. 1998). No entanto, a ocorrência de jacalinas não é restrita a essas duas famílias (Figura 2). Lectinas com sequências similares a lectina de fruta de jaca já foi relatada em lectina obtida de *Musa acuminatada* família *Musaceae* e nas sementes das espécies de *Parkia* da família leguminosa (Mann et al. 2001; Silva et al. 2013). As lectinas desta família exibem um repertório de funções, como ligação específica ao Antígeno-T, normalmente associado com tumores (Jeyaprakash et al. 2002), ligação à regiões específicas do HIV (Lakshmi Tamma et al. 1996), estimulação potente e seletiva de funções distintas das células T (Lafont et al. 1997) e uma capacidade única de reconhecer especificamente a imunoglobulina A1 do soro humano (Hashim, Shuib, and Chua 2001). As estruturas secundárias das JRLs são compostas predominantemente por folhas- β , enquanto que

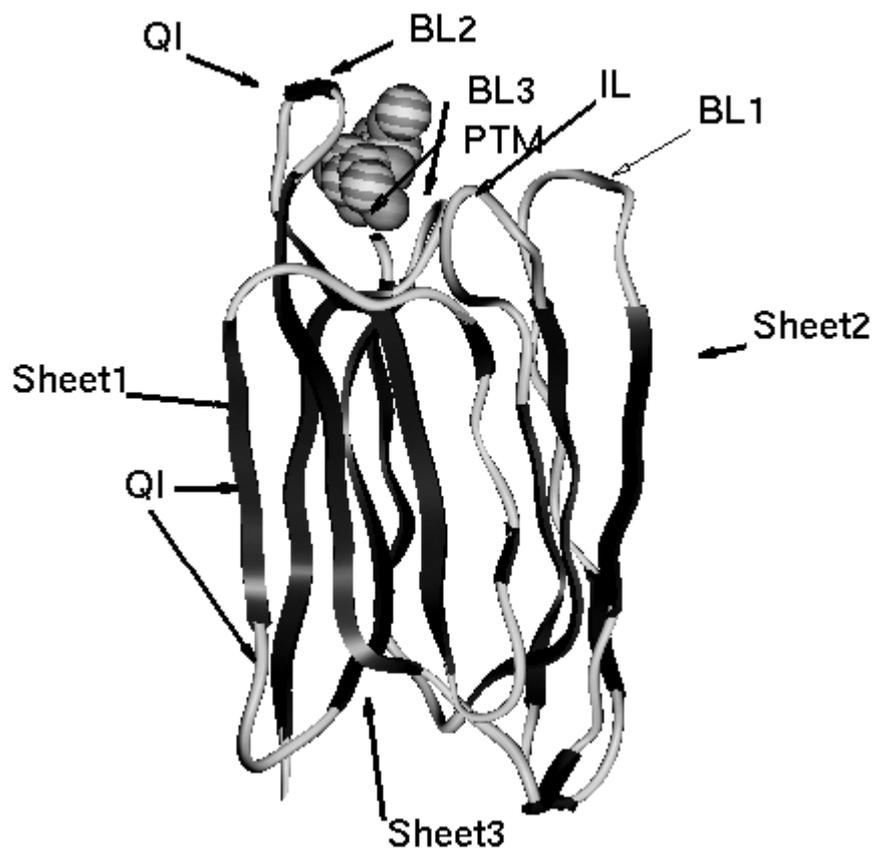
as estruturas terciárias são formadas por subunidades β -prismas composta de três folhas β dispostas em um prisma, com três pregas paralelas às folhas- β . O mapeamento das sequências e estruturas dos membros desta família indica que as regiões das fitas são altamente conservadas, especialmente na primeira e na terceira folhas. Por outro lado, os segmentos de *loop* que conectam as fitas são altamente variáveis em seus comprimentos e sequências, consistentes com seu papel na geração de diversidade funcional (Figura 3) (Raval et al. 2004). As lectinas desta família em solução podem formar três conformação oligoméricas diferentes (dímeros, tetrâmeros e octâmeros). Os três tipos de arranjos quaternários diferentes podem ser atribuídos a interações envolvendo três conjuntos de interface diferentes: (1) conjunto de interface A envolvendo os resíduos 102-109, 131-133 da cadeia A e 11-15 da cadeia B como visto nos tetrâmeros de jacalina, MPA e artocarpin (código PDB: 1JAC); (2) conjunto de interface B envolvendo os resíduos 19-25 e 51-60 como visto no dímero de calsepa (código PDB: 1OUW) e (3) conjunto de interface C envolvendo os resíduos 7-11, 119-124 e 20-26, como visto no octâmero de heltuba (código PDB: 1C3K) (Raval et al. 2004).

Figura 2. Arvore evolutiva de lectinas relacionadas a jacalina. Uma visão taxonômica da distribuição de JRLs em várias famílias de plantas. Os nomes das plantas a partir das quais as estruturas da lectina foram experimentalmente determinadas estão indicados em negrito.



Fonte. Raval *et al.*, 2004

Figura 3. Estrutura geral de uma subunidade tridimensional de jacalina e outros JRLs mostrando a prega β -prisma. BL1 a BL3 indicam os três loops de ligação a carboidratos, IL o loop de influência, QI a região envolvida na associação quaternária e PTM a região referente ao local de clivagem devido a uma modificação pós-tradução. As três folhas β (rotulados como sheet 1,2 e 3).



Fonte. Raval *et al.*, 2004

1.4 Aplicação biológica das lectinas do gênero *Parkia*

Há indícios de que a interação de lectina com os carboidratos está ligada com a função de defesa desempenhados contra patogênicos e predadores de planta. As lectinas através do domínio de reconhecimento a carboidratos podem se ligar aos vírus, bactérias, fungos e também nos tecidos conjuntivos dos animais que possuem carboidratos em abundância expostas nas superfícies celulares. A toxicidade da lectina em relação aos animais superiores está bem documentada nos estudos que avaliam o risco de saúde da lectina presente nas plantas utilizadas na produção de alimentos e rações para os animais (Peumans and Damme 1994). Outra técnica bastante utilizada para determinar a toxicidade da lectina é o ensaio de letalidade frente à *Artemia sp.* Esta técnica apesar de ser relativamente simples, tem a capacidade de gerar informações de grande utilidade de forma rápida, segura, econômica e com reprodutibilidade. E também gera poucos resíduos ao meio ambiente (Hirota et al. 2012). Apesar de lectinas de gênero *Parkia* possuírem algumas propriedades e características em comum como peso molecular, especificidade por carboidratos e estruturas primárias muito homologas, sabe-se que pequenas diferenças nas sequencias dos resíduos dos aminoácidos, da topologia de domínio de reconhecimento a carboidrato ou estado de oligomerização podem implicar em propriedades físico-químicos e/ou atividades biológicas diferentes. Algumas atividades biológicas das lectinas do gênero *Parkia* já foram relatadas dentre quais, PBL apresenta propriedades antinociceptiva reduzindo o número de contorções induzidas pelo ácido acético através do seu efeito analgésico periférico, provavelmente associado com inibição de processo inflamatório e também mostrou ser um potente anti-inflamatório reduzindo drasticamente a imigração dos leucócitos induzida pela carragenina (Silva et al. 2013). A lectina extraída de sementes da *P. pendula* apresentou atividade *in vitro* contra citomegalovirus humano, no qual reduziu aproximadamente 95% de inefetividade celular numa concentração de 150 µg/mL com a citotoxicidade mínima de 25% (Favacho et al. 2007). As lectinas de *P. biglandulosa* e *P. roxburghii* demonstraram efeitos anti-proliferativo em duas linhas celulares (P 388DI-50% e J774-70%) de câncer de macrófago em murino. Além disso, a lectina de *P. roxburghii* também inibiu 65,47% a proliferação de uma linha celular de hibridoma de células-B (HB98) (Kaur et al. 2005), a lectina de *Parkia panurensis* apresentou atividade toxica contra *Artemia sp* com o valor de CL50 igual a 20 µg/mL (Cavada, Bari, et al. 2020), a lectina de *P. platycephala* aumenta atividade antibiótica de gentamicina contra cepas bacterianas multirresistentes pelo dois possíveis mecanismo: 1- interagindo com gentamicina no dominio de ligação ao carboidrato facilitando assim, a entrada do antibiotico no citoplasma bacteriano. 2- Interagindo com os glicanos presentes nas bombas de fluxo e conseqüentemente bloqueando ou modificando a sua

estrutura conformacional (Silva et al. 2019) e a *Parkia pendula* inibiu o crescimento de promastigotas de *L. infantum* ($45,6 \pm 1,92\%$) em 48 h, confirmado o potencial leishmanicida da PpeL(Carneiro et al. 2021). Estes resultados demonstram claramente que as lectinas deste gênero possuem um grande potencial para desenvolvimento de novas drogas e biofármacos.

2 PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE UMA NOVA TECTINA DE SEMENTES DE *PARKIA PANURENSIS* EX H. C. HOPKINS E AVALIAÇÃO DOS SEUS EFEITOS BIOLÓGICOS

2.1 Objetivos

2.1.1 Objetivo geral

Purificar, determinar as características físico-químicas e estruturais, e avaliar atividade de toxicidade contra *Artemia sp* de uma nova lectina purificada de sementes de *Parkia panurensis* ex H. C. Hopkins.

2.1.2 Objetivos específicos

- Prospecção de lectinas no extrato de sementes e determinar a sua especificidade por carboidratos;
- Purificar uma lectina através dos métodos tradicionais de química de proteínas;
- Realizar os testes de estabilidade térmica, pH e dependência dos íons metálicos bivalentes;
- Determinar a massa molecular intacta da lectina por espectrometria de massas;
- Determinar a estrutura primária da lectina por espectrometria de massas;
- Realizar ensaio biológico de toxicidade contra *Artemia sp*.

2.2 Matérias e métodos

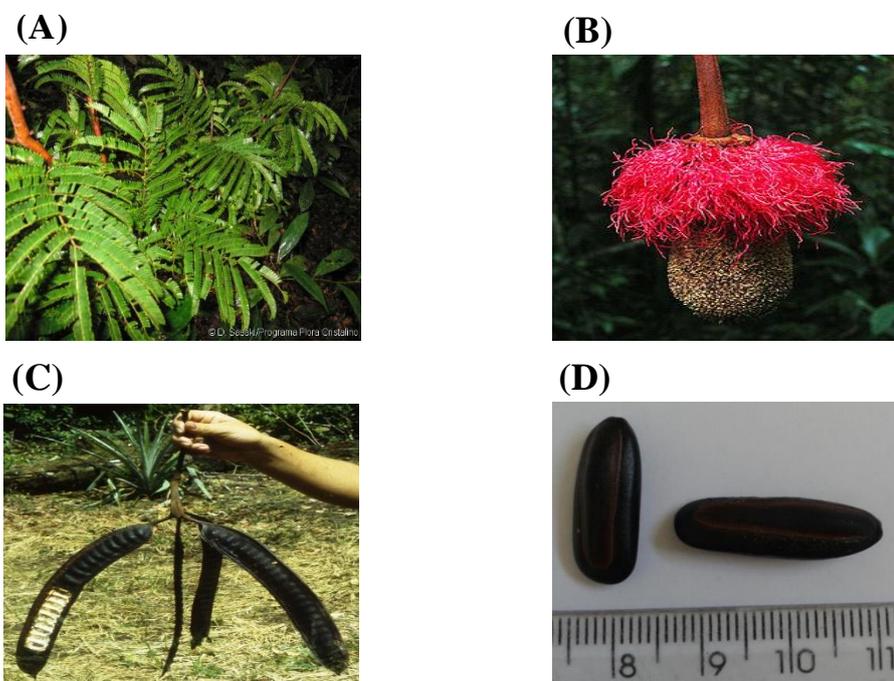
2.2.1 Animais

Os eritrócitos utilizados para os testes de atividade hemaglutinante (A.H.) e os efeitos dos carboidratos na inibição de A.H. foram coletados dos coelhos da raça Nova Zelândia com pesos corporais aproximados de 3 kg mantidos no biotério do departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará (UFC) campus do pici em grupos de um por gaiola, mantidas em condições de temperatura controlada com água e a comida a disposição. Os protocolos dos experimentos foram aprovados pelo comitê institucional de cuidado e uso dos animais de Universidade Federal do Ceará (CEUA n° 10130208-8/40).

2.2.2 Matérias vegetais

As sementes de *Parkia panurensis* ex H. C. Hopkins (família *leguminosae*, subfamília *Mimosoideae* e gênero *Parkia*) foram coletadas em Amazonas – Brasil. Após coleta as sementes foram limpadas, secadas na estufa a 37 °C. Detalhes de algumas partes da planta em figura 4.

Figura 4. (A) Folhas, (B) inflorescência, (C) vagens (D) semente de *Parkia panurensis*.



2.2.3 Ensaios de hemaglutinação e inibição de atividade hemaglutinante por carboidratos

Para os ensaios de hemaglutinação e inibição por carboidratos foram utilizados eritrócitos de coelho a 3% nativo e tratado com as enzimas proteolíticas tripsina e papaína. Para

realizar o teste primeiramente foi adicionado 50 μ L de tampão Tris-HCl 100 mM pH 7,6 contendo NaCl 150 mM em poços da placa de micro titulação (12 x 8 poços) em seguida foi acrescentado 50 μ L de amostra proteica e feita a diluição seriada e por fim foi adicionado 50 μ L de eritrócitos em todos os poços. Os poços considerados como controle negativo continham apenas tampão e eritrócitos. As leituras dos resultados foram feitas após 1 hora de incubação a 37 °C. O título de hemaglutinação foi definido como o inverso de maior diluição que exibiu a hemaglutinação equivalente a uma unidade de hemaglutinação (UH). A atividade hemaglutinante específica é expressa como número de unidades de hemaglutinação por mg de proteína (UH/mgP). A especificidade por ligantes de carboidratos foi determinada pela concentração mínima inibitória de açúcares que apresentam total inibição da hemaglutinação de acordo com a metodologia de Ramos (1996). Para tal, foram utilizados seguintes açúcares na concentração inicial de 100 mM: D-glicose, D-galactose, D-manose, α -lactose, L-fucose, α -metil-D-manosideo, Sucrose, D-rafinose, α -metil-D-galactosideo e Melibiose. A concentração mínima inibitória é expressa como o recíproco da diluição mais alta de açúcar que inibiu completamente uma unidade de hemaglutinação.

2.2.4 Extração, fracionamento, dosagem de proteínas e carboidratos

As sementes maduras de *Parkia panurensis* foram descascadas e trituradas no moedor de café até a obtenção de farinha fina e subsequentemente submetida a delipidação com hexano, onde o solvente foi adicionando em proporção de 1:5 (p/v), e deixado em contato durante 12 h, posteriormente o hexano foi removido e a farinha foi deixada para secar na capela em temperatura ambiente até todo o hexano evaporar. Em seguida a farinha delipidada foi submetida a extração proteica. Para tal, foi adicionado uma solução de tampão acetato de sódio 100 mM pH 4,0 contendo NaCl 150 mM na proporção 1/10 (p/v) e deixado em constante agitação mecânica durante 4h. Posteriormente esta amostra, denominada de extrato bruto, foi centrifugada a 9000 rpm por 20 minutos a 4 °C e depois filtrado. Após a filtração o precipitado foi descartado e sobrenadante obtido foi submetido a fracionamento proteico com sulfato de amônio (f 0-60%). A fração foi centrifugada a 9000 rpm por 20min a 4 °C e após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuscitado em água, dialisado exaustivamente contra água destilada e submetidos a teste de A.H. As concentrações proteicas foram determinadas pelo método de (Bradford 1976) usando Albumina Sérica Bovina (BSA) como padrão e monitorado por espectrofotômetro ((Amersham Biosciences; Ultrospec2100Pro)) no comprimento de onda de 595 nm. A percentagem de açúcares neutro na

lectina pura foi estimada usando o método de Dubois et al (1956) utilizando glicose como açúcar padrão e monitorado por espectrofotômetro ((Amersham Biosciences; Ultrospec2100Pro)) no comprimento de onda de 490 nm.

2.2.5 Purificação de lectina de sementes de *Parkia panurensis*

Para purificação de proteínas foram utilizadas técnicas de cromatografia líquida de afinidade e troca iônica sequencialmente. Primeiramente, o pH da fração 0-60% foi ajustada para 7,6 através de adição de tampão estoque Tris-HCl 1M pH 7,6. Então as proteínas insolúveis foram removidas por centrifugação a 9000xg por 5 minutos a 4 °C, e o sobrenadante resultante foi aplicado à matriz cromatográfica Sepharose 4B-manose (15 x 50 mm Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) previamente equilibrada com solução tampão Tris-HCl 100 mM pH 7,6 contendo NaCl 150 mM e mantido em contato durante 12 horas. As proteínas que não se ligaram na matriz, denominadas de PI, foram eluídas com a mesma solução de equilíbrio, e as proteínas que se ligaram na matriz, denominadas de PII, foram eluídas com solução tampão glicina 100 mM, pH 2,6 contendo NaCl 150 mM. Foram coletadas frações de 1 mL em fluxo de 0,7 mL/min e as proteínas coletadas nos tubos de ensaio foram monitoradas por espectrofotômetro (Amersham Biosciences; Ultrospec2100Pro) no comprimento de onda de 280 nm. A fração retida foi acumulada, dialisada contra água destilada, liofilizadas e posteriormente submetidas a teste de atividade hemaglutinante. A fração coletada que apresentou atividade hemaglutinante foi ressuspensa em tampão Tris-HCl 100 mM pH 7,6 na concentração de 4 mg/mL e submetida a cromatografia de troca iônica em matriz DEAE-Sephacel (7,5 mm × 75 cm, ACQUITY, UPLC Waters), as proteínas que não interagem com matriz foram eluídas com tampão Tris-HCl 100 mM pH 7,6, enquanto que, as proteínas que interagiram com matriz foram eluídas com mesmo tampão contendo gradiente salina de 0,1 a 1 M. Foram obtidos dois picos na cromatografia de troca iônica denominados de DI e DII. Para determinar a massa molecular aparente e o estado de oligomerização da proteína em solução na condição não-desnaturante, DI foi submetido à cromatografia de exclusão molecular em HPLC (7,8 mm × 30 cm, BioSuite, UPLC Waters). As concentrações proteicas nesta etapa, foram monitoradas por espectrofotometria no comprimento de onda de 280 nm.

2.2.6 Caracterização físico-química

2.2.6.1 Eletroforese em condição desnaturante (SDS-PAGE)

O experimento de eletroforese em gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) foi realizado de acordo com o protocolo descrito por (Laemmli 1970), onde 10 μ L de proteínas (1 mg/mL) na presença e ausência de β -mercaptoetanol (2 %) foram aplicados em gel poliacrilamida (sistema descontínuo: gel de empilhamento 4 %; e gel de separação 15 % acrilamida). Foi realizado também a eletroforese sob condições nativas, onde, 10 μ L de proteína (2 mg/mL) foram aplicados a PAGE (sistema descontínuo: 4% de gel de empilhamento e 9% gel de separação). Todos os géis foram preparados usando o aparato Mini-Protean II (Bio-Rad, Milan, Italy). A corrida foi conduzida a corrente constante de 25mA, tensão de 150V e potência de 10 W. As bandas das proteínas no gel foram coradas com Coomassie Brilliant Blue G-250 para visualização das bandas.

2.2.6.2 Efeito de temperatura, pH e íons metálicos sobre a atividade hemaglutinante de PpaL

Para determinar os efeitos de temperatura, pH e íons metálico sobre atividade hemaglutinante de PpaL utilizou-se a lectina pura na concentração de 1 mg/mL para cada experimento. A influência de temperatura foi determinada pela incubação da solução em diferentes temperaturas (10 a 100 °C) por 1 hora seguindo-se com testes de hemaglutinação. Para determinar a influência do pH, a solução de lectina foi dialisada durante 24 h contra diferentes soluções tampões (pHs de 4 – 10) a 100 mM contendo 150 mM de NaCl: citrato de sódio pH 4,0 e 6,0), acetato de sódio (pH 5,0), Fosfato de sódio (pH 7,0), Tris-HCl (pH 8,0) e glicina-NaOH (pH 9,0 e 10,0) e depois submetidas a teste de hemaglutinação. Para determinar a influência de cátion bivalentes a lectina foi dialisada contra EDTA 100 mM durante 24 horas seguindo-se com diálise contra NaCl 150 mM para remover o excesso de EDTA. A atividade hemaglutinante foi determinada antes e depois a adição de CaCl₂ e MnCl₂, ambos a 10 mM. Todas as amostras foram centrifugadas a 9000xg por 5 min a 4 °C antes dos ensaios da hemaglutinação.

2.2.7 Determinação de massa molecular intacta por espectrometria de massas (ESI-MS)

Para determinar a massa molecular média isotópica da proteína foi utilizado a técnica de ionização por eletrospray (ESI-MS), onde uma alíquota de 4,5 µl (ácido fórmico 0,1%) de lectina pura foi injetada em matriz cromatográfica C18 (100 µm x 100 mm) RP-UPLC (nanoAcquity UPLC, Waters) acoplada a espectrometria de massa nanoelectrospray em tandem num espectrômetro de massas Q-ToF Premier (MicroMass / Waters) a um caudal de 600 nl/min. O gradiente foi de 0-90% de acetonitrila em 0,1% de ácido fórmico durante 45 minutos. O instrumento foi operado no modo continuum MS e a aquisição de dados foi de m/z 100 - 2.000 a uma taxa de varredura de 1s e um atraso entre varreduras de 0,1s. A voltagem de nanoelectrospray foi ajustada para 3,5 kV, uma voltagem de cone de 30 V e a temperatura da fonte foi de 80 °C. Os espectros foram acumulados em cerca de 300 varreduras e os dados carregados múltiplos produzidos pelo espectrômetro de massa na escala m/z foram convertidos à escala de massa (peso molecular) usando o software baseado em Máxima Entropia (Ferrige et al. 1992) fornecido com o pacote de software Masslynx 4.1. Os parâmetros de processamento foram: faixa de massa de saída de 24.000-30.000 Da a uma “resolução” de 0,1 Da/canal; O modelo de padrão isotópico simulado foi usado com o parâmetro de largura de desfoque do espectro definido para 0,2 Da, e as razões de intensidade mínima entre os picos sucessivos foram de 20% (esquerda e direita). O espectro deconvoluído foi suavizado (2x 4 canais, Savitzky-Golay suave), e os valores do centróide de massa foram obtidos usando 80% do pico superior e um pico mínimo de largura a meia altura de quatro canais (Guimarães et al. 2011).

2.2.8 Determinação de estrutura primária por espectrometria de massa em tandem e predição de estrutura secundária

Para determinar a sequência linear dos aminoácidos (aa) da proteína, primeiramente foi realizada uma eletroforese, onde a lectina foi aplicada num gel de 15% de poliacrilamida (SDS-PAGE) e as bandas referentes às proteínas de interesse foram excisadas do gel. As bandas excisadas foram descoradas com 100 mM de bicarbonato de amônio em acetonitrila (1:1 v/v) e secas com acetonitrila pura. Para a clivagem proteolítica foram usadas as soluções das enzimas tripsina, pepsina e químiotripsina (Promega, Madison, WI, EUA) em bicarbonato de amônio 50 mM. Os peptídeos obtidos foram extraídos em 5% de ácido fórmico e 100% de acetonitrila (1:2 v/v) e secos em SpeedVac (Shevchenko et al. 2006). Os peptídeos secos foram ressuspendidos em 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) e separados em coluna BEH300 C18

(100 μ m \times 100mm) utilizando-se sistema nanoAcquity™ (Waters) e eluído com gradiente de acetonitrila (10-85%), contendo 0,1% de ácido fórmico a 600 μ l / min. O sistema de cromatografia líquida (LC) foi conectado a uma fonte de espectrômetro de massa de nanoelectrospray (SYNAPT HDMS System). O espectrômetro de massa foi operado em modo positivo, utilizando uma temperatura de fonte de 80 ° C e uma voltagem capilar de 3,5 kV. O instrumento foi calibrado com fragmentos de íon duplo protonado [Glu1]-fibrinopeptídeo B (Sigma-Aldrich) (m/z 785,84). O experimento LC-MS/MS foi realizado de acordo com o função de aquisição dependente de dados, selecionando o MS/MS de íons precursores de carga dupla ou tripla, que foram fragmentados pela técnica dissociação induzida por colisão (CID) usando argônio como gás de colisão e energia de colisão de rampa que varia de acordo com o estado de carga de íon precursor selecionado. Os dados foram processados e analisados em software Proteinlynx (Waters), usando o padrão de fragmentação dos peptídeos como parâmetro de busca. Os espectros CID foram interpretados manualmente usando a ferramenta Peptide Sequencing do software Mass Lynx 4.1 (Waters). Os dados da estrutura secundária de PpaL foram estimados através da bioinformática usando sistema automatizado do servidor PsiPro (Buchan and Jones 2019)(Jones 1999). A sequência parcial de PpaL foi carregada no servidor para análise, onde foi obtida a previsão de estrutura com alto grau de confiança.

2.2.9 Teste de toxicidade contra *Artemia sp*

2.2.9.1 Obtenção de náuplios de *Artemia sp*

Os cistos de *Artemia* foram incubados em água do mar esterelizada (coletado na praia de paracuro, Cerá, Brasil) a 28 °C sob iluminação constante e forte aeração. Os cistos foram incubadas em erlenmeyer na concentração de 1 g de cistos por 1 litro de água do mar. Depois de um período de 48 h, a aeração foi interrompida e para os ensaios biológicos foram recolhidos apenas os náuplios que apresentavam ótima mobilidade ao migrarem em direção a luz.

2.2.9.2 Teste de letalidade contra *Artemias sp*

A lectina pura foi dissolvida em água do mar na concentração de 1mg/ml. O ensaio foi realizado em placas de linbro (24 poços) para a cultura de células, onde cada poço continha um volume final de 2 mL de água do mar. As soluções lectínicas foram

adicionados aos poços de modo a obter concentrações finais de 12,5; 50; 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Em cada poço foi adicionado 10 náuplios de *Artemia*. O experimento foi realizado em triplicata e os poços de controle negativo continham apenas 2 mL de água do mar e 10 náuplios de *artemia*. O número de náuplios mortas em cada poço foi contado após 24 h e o resultado foi definido como LC50, ou seja, a concentração mínima da lectina capaz de causar a letalidade de 50% das *artemias*.

2.2.9.3 *Efeitos de manose e desnaturação térmica da lectina em toxicidade contra Artemia sp*

Para investigar o envolvimento do domínio de ligação a carboidratos na toxicidade induzida por lectina, uma solução de lectina pura na concentração de 1 mg/mL foi incubada com 100 mM de manose na proporção 1/1 (v/v) por 1h a 37 °C. Após o período da incubação esta solução foi adicionado em poços contendo 2mL água do mar de modo que a concentração final da solução lectinica ficasse em 200 $\mu\text{g/mL}$. O numero de *ArtemiaS sp* mortos foi contado após um periodo de 24h. Para verificar a importância de estrutura nativa da proteína sobre o efeito tóxico, uma solução de 1 mg/ml de lectina foi previamente aquecida a 100 °C por 1h. O teste de letalidade contra *Artemia sp* foi então realizado como descrito anteriormente.

2.2.9.4 *Analises estatísticas*

Os resultados foram expressos em viabilidade de porcentagem dos organismos vivos. As diferenças estatísticas foram analisados por teste de multipla comparação e análise de variança (One way ANOVA-Tukey), onde os niveis de confiança foram considerados significativos para valores de $p < 0,05$. Os valores de CL50 foram calculados por regressão não linear utilizando o programa graphPad – prism, versão 6.0.

2.3 Resultados

2.3.1 Extração proteica, ensaios de hemaglutinação e inibição de atividade hemaglutinante por carboidratos

O extrato proteico preparado a partir de sementes de *Parkia panurensis* em solução tampão de acetato de sódio 100 mM pH 4,0 contendo NaCl 150 mM apresentou melhor atividade hemaglutinante contra eritrócitos de coelho tratados com a enzima proteolítica tripsina. A atividade hemaglutinante presente na solução lectinica foi inibida pelos açúcares α -metil-D-manosídeo, D-manose e D-glicose. Sendo que a concentração mínima inibitória do α -metil-D-manosídeo foi menor, ou seja, foi o açúcar que apresentou maior afinidade a lectina. (Tabela 2).

Tabela 2. Inibição de atividade Hemaglutinante de lectina de semente de *Parkia panurensis* por diferentes carboidratos.

Carboidratos	CMI (mM)*
D-glicose	25
D-manose	12,5
α -metil-D-manosideo	3,125
D-galactose	NI**
α -lactose	NI
L-fucose	NI
Sucrose	NI
D-rafinose	NI
α -metil-D-galactosideo	NI
Melibiose	NI

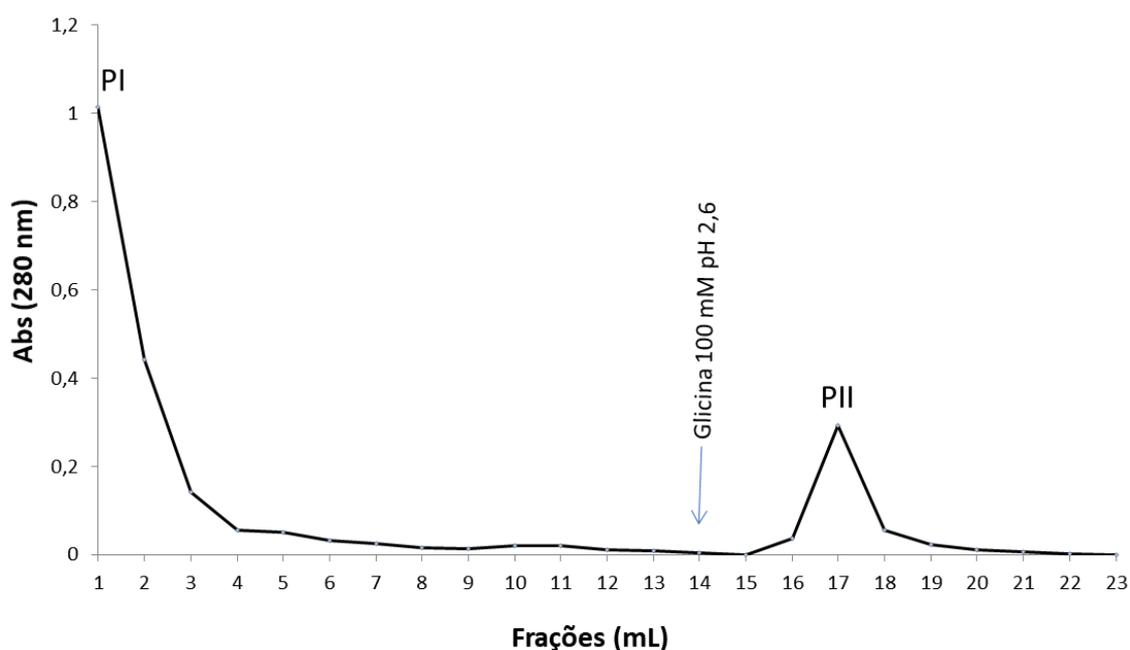
Fonte: Elaborado pelo autor.

*Concentração mínima inibitória

**NI - Açúcar não inibiu até concentração de 100 mM

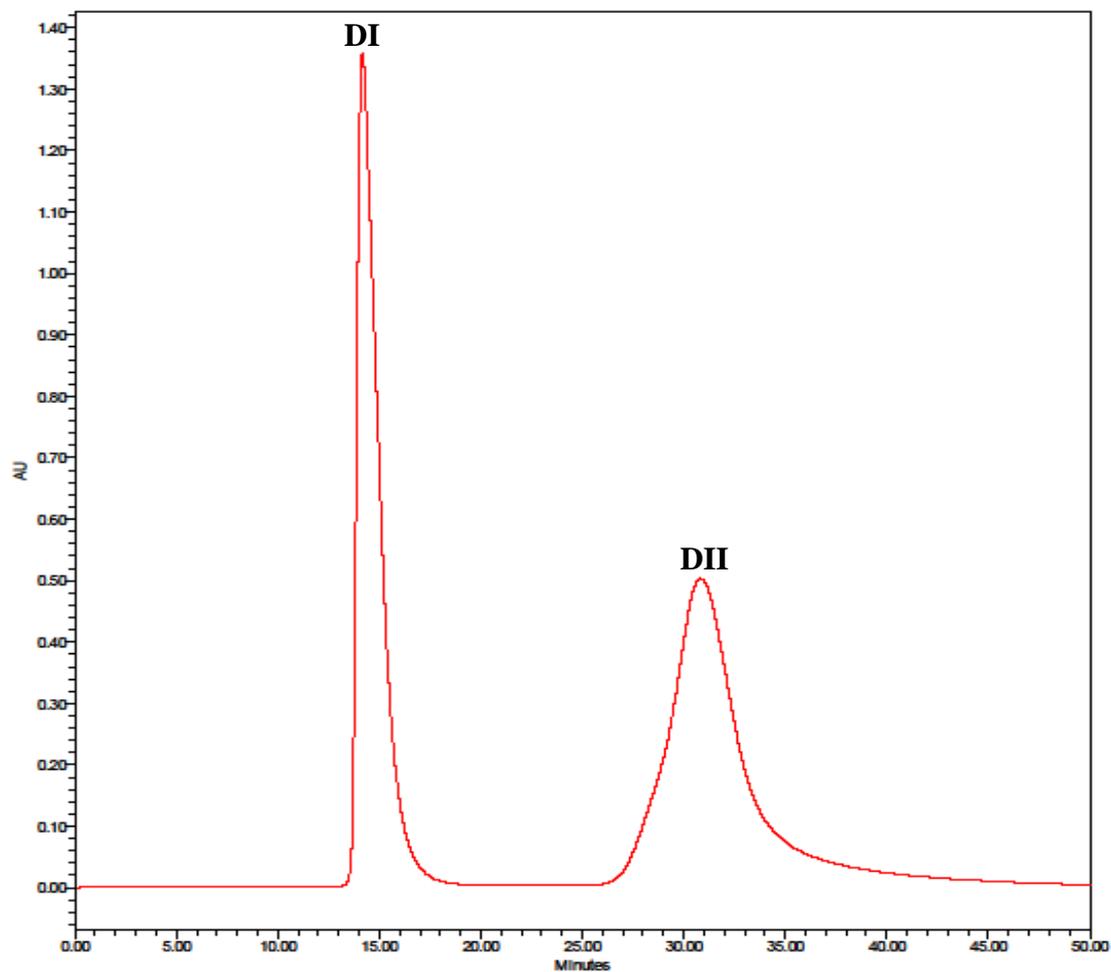
A lectina foi purificada pela combinação das técnicas de precipitação proteica com sulfato de amônio (f0-60%) seguida de cromatografias de afinidade e troca iônica em matrizes Sepharose 4B-manose e DEAE-Sephacel, respectivamente. Na primeira etapa cromatográfica em matriz Sepharose 4B-manose, foram obtidos dois picos distintos denominados de PI e PII, correspondentes as proteínas não retidas e as proteínas retida na matriz, respectivamente (Figura 5). Apenas o PII apresentou atividade hemaglutinante e foi submetido a cromatografia de troca iônica, onde dois picos distintos denominados DI e DII foram obtidos (Figura 6). Ambos os picos (DI e DII) apresentaram atividade hemaglutinante, sendo que o DI corresponde à lectina pura, que foi denominada PpaL (Tabela 3). A PpaL foi submetida a cromatografia de exclusão molecular com objetivo de determinar o seu estado de oligomerização e peso molecular aparente na condição nativa em solução e nesta etapa foi obtido apenas um pico *sharp* o que indica elevado grau de purificação da proteína (figura 7).

Figura 5. Cromatografia de afinidade em matriz Sepharose 4B-Manose (15 x 50 mm Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). 5 mg/mL de amostra (f0-60) aplicada. A amostra ficou em contato com a matriz por aproximadamente 12 horas. As proteínas não ligantes a matriz foram eluidas com tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,6 contendo NaCl 150mM (PI). As proteínas ligantes foram eluidas com Glicina 100 mM pH 2,6 contendo NaCl 150 mM (PII). As amostras foram coletadas em volume de 1 mL, a um fluxo de 0,7 mL/min e foram detectadas por espectrofotometria em 280 nm.



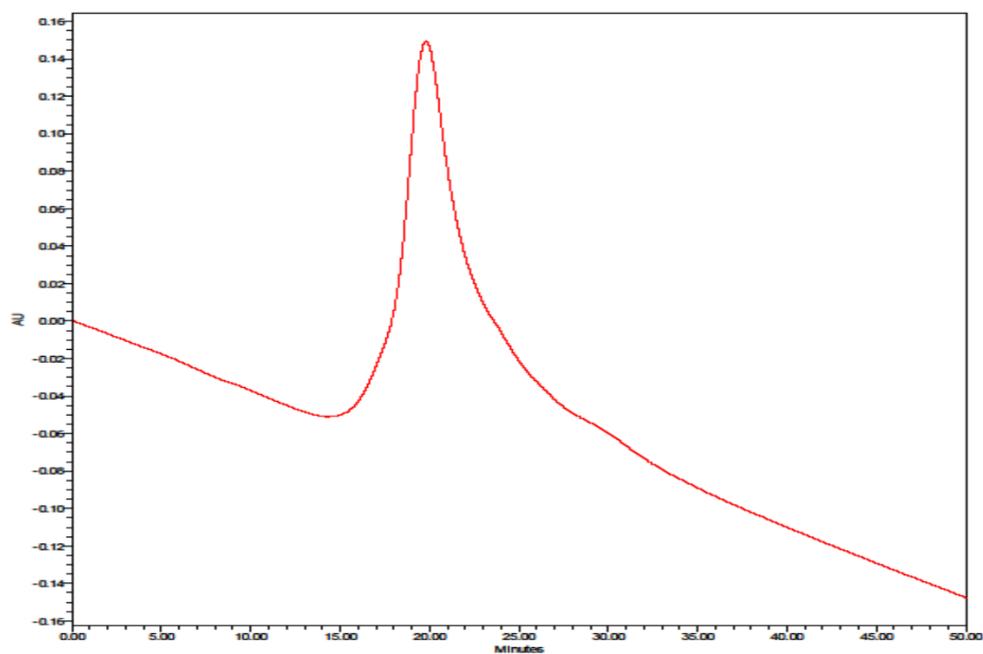
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 6. Cromatografia de troca iônica em matriz DEAE-Sephacel (7,5 mm × 75 cm; ACQUITY, UPLC Waters). Foi aplicada 4 mg/mL de amostra (PII). As proteínas foram eluídas com tampão Tris-HCl 100 mM pH 7,6, contendo gradiente salina de 0,0 a 1 M. As amostras foram coletadas em volume de 1 mL, a um fluxo de 0,5 mL/min e foram detectadas por espectrofotometria em 280 nm.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 7. cromatografia de exclusão molecular (7,8 mm x 30 cm, BioSuite, UPLC Waters). 2 mg/mL PpaL foi aplicada na coluna. Foi usado o tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,0, contendo NaCl 150 mM tanto para equilibrar a coluna como para eluir as proteínas em fluxo de 0,5 ml/min. As proteínas foram detectadas por espectrofotometria a absorvância de 280 nm.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 3. Tabela de purificação da lectina de sementes de *Parkia panurensis*.

Frações	C.P. * (mg/mL)	A.H.** (U.H./mL)	A.H.E.*** (U.H./mg)	Purificação
Extrato bruto	2,32	16	6,9	1
f 0 - 60%	1,58	32	20,2	2,93
Cromatografia de afinidade em Sepharose 4B-mannose				
PI	0,17	Sem atividade	X	X
PII	0,10	128	1.280	186
Cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephacel (HPLC)				
DI (PpaL)	0,06	2.048	34.133	4.946
DII	0,05	2.048	40.960	5.936

Fonte: Elaborado pelo autor.

* Concentração Proteica.

**Atividade Hemaglutinante testado com eritrócito de coelho tripsinizado.

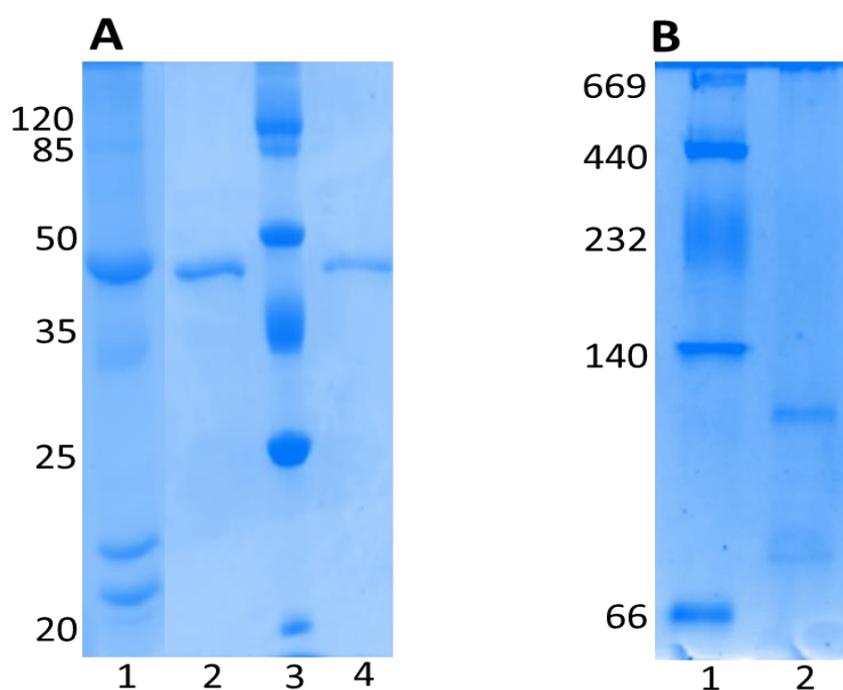
*** Atividade Hemaglutinante Especifica.

2.3.2 Análise eletroforética, efeitos da temperatura, pH e íons metálicos sobre atividade hemaglutinante da PpaL

O PII obtido na cromatografia de afinidade apresentou um perfil eletroforético de quatro bandas: A mais pesada na altura de peso molecular aparente de 50 kDa, uma na altura de 35 kDa e duas bandas leves que provavelmente são isoformas na altura de peso molecular aparente de 20 kDa. Já o DI obtido da cromatografia de troca iônica que é o pico correspondente a PpaL apresentou apenas uma banda proteica com peso molecular aparente de 45 kDa, tanto na presença como na ausência do agente redutor β -mercaptoetanol (Figura 8 A). Da mesma forma, o PpaL apresentou apenas uma banda no gel de eletroforese em condição nativa com peso molecular aparente de 100 kDa (Figura 8 B). PpaL manteve alta atividade hemaglutinante até a temperatura de 40 °C após incubação por 1 h. No entanto, ela perdeu metade de sua atividade a 50 °C e, perdeu por completo a sua atividade quando exposto a temperaturas iguais ou superiores a 70 °C (Figura 9 A). PpaL demonstrou ser uma proteína estável em amplas faixas de pH, o título de hemaglutinação atingiu o seu valor máximo nos pH 7,0 e 8,0. Os valores mais

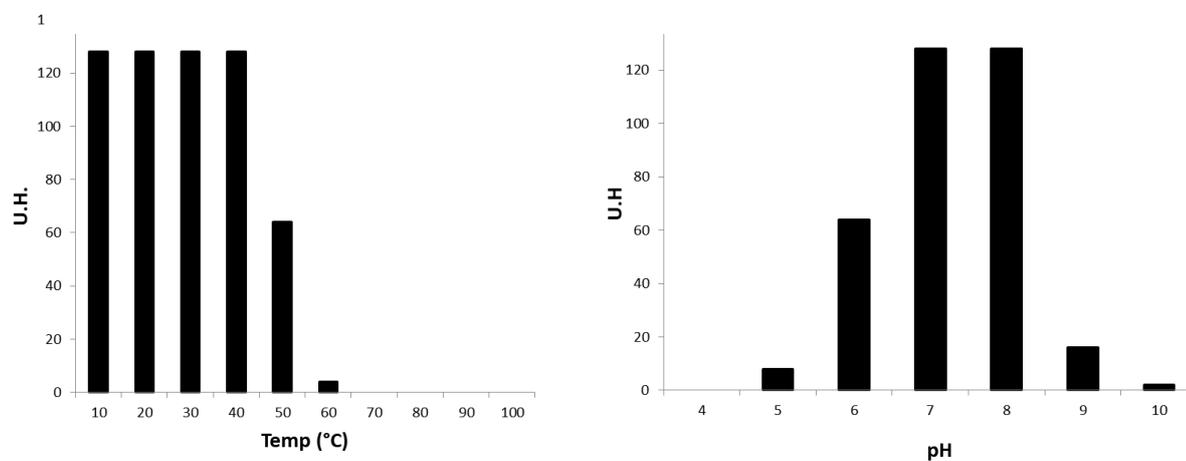
baixos foram alcançados nos pHs 5,0 e 10.; no entanto, em pH 4,0, PpaL não mostrou nenhuma atividade hemaglutinante (Figura 9 B). A atividade hemaglutinante de PpaL foi afetada após diálise exaustiva contra solução de EDTA 100 mM. Entretanto, a adição de íons metálicos CaCl_2 e/ou MnCl_2 proporcionaram a recuperação de uma parte de atividade hemaglutinante, sendo que foi observado maior eficiência em recuperar a atividade hemaglutinante quando se adiciona apenas MnCl_2 em comparação com a CaCl_2 (Figura 10).

Figura 8. Eletroforese (SDS – PAGE). Gel de 15% corado com Coomassie Brilliant Blue G-250. **(A)** 1- 10 μg de PII. 2- 10 μg de PpaL. 3- Marcadores moleculares (120 kDa- β -galactosidase, 85 kDa-Albumina s rım bovina, 50 kDa-Ovalbumina, 35 kDa-Anidrase carbonico, 25 kDa- β -lactobumina e 20 kDa-lisozima). 4- 10 μg de PpaL na condi o reduzida com β -mercaptoetanol. **(B) Proteinas em condi o nativa:** 1- Marcadores moleculares (669 kDa -tiroglobulina, 440 kDa-ba o equino, 232 kDa-f gado bovino, cora o bovino 140 kDa, 66 kDa-soro bovino). 2- PpaL em condi es nativas.



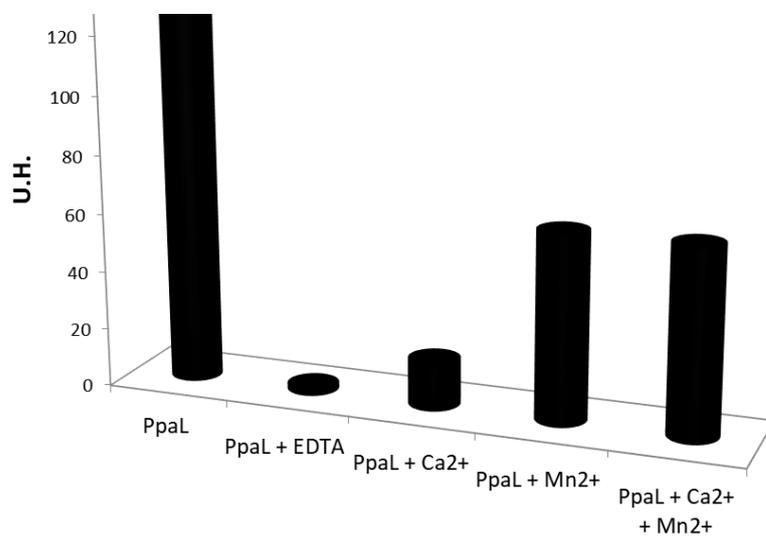
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 9. Estabilidade térmica (A) e Estabilidade em diferentes pH (B) de PpaL.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 10. Efeito dos íons metálico sobre a Atividade Hemaglutinante de PpaL.

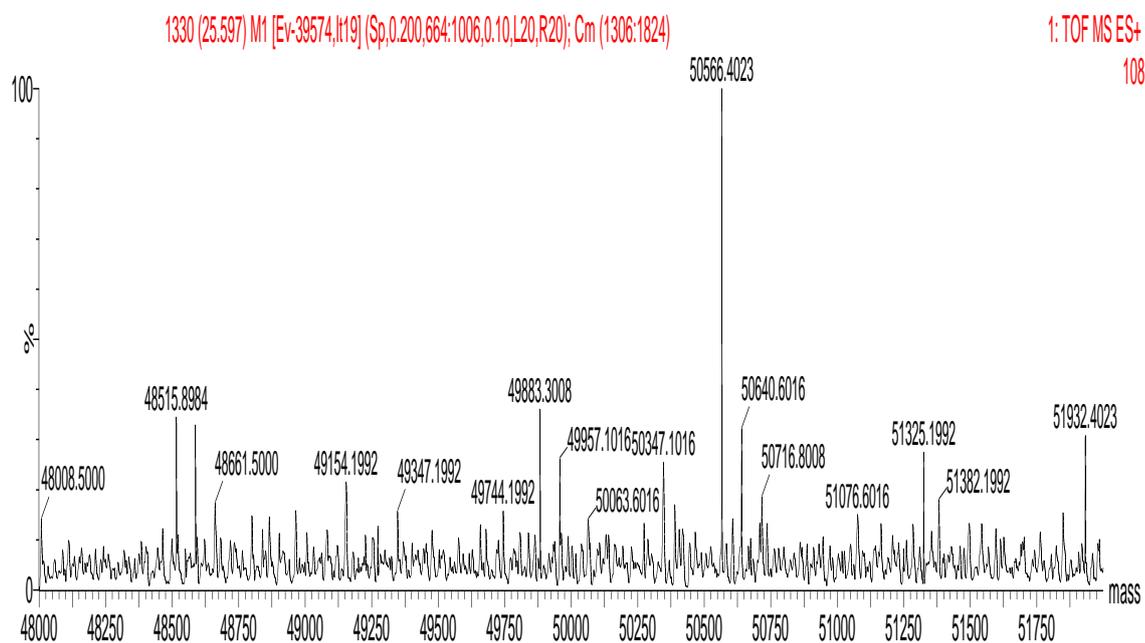


Fonte: Elaborado pelo autor.

2.3.3 Determinação de massa molecular intacta e predição das estruturas primária e secundária da proteína

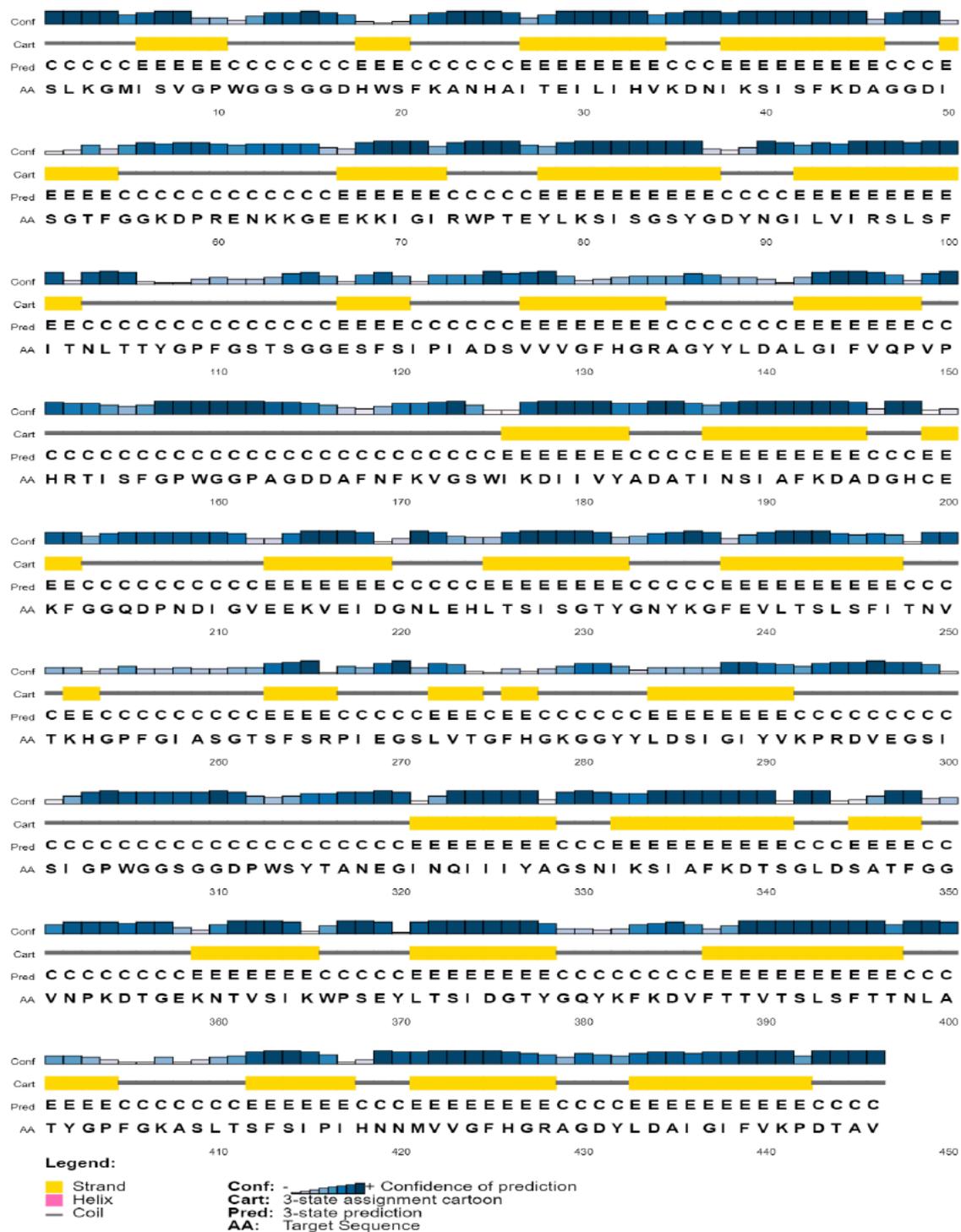
A análise de espectrometria de massa (ESI-MS) demonstrou a presença de um polipeptídeo com íon de maior intensidade correspondendo a um peso molecular de 50,566 Da e a mistura de polipeptídeos com pesos moleculares de 48,515; 49,883 e 51,325 Da (Figura 11). As poucas diferenças dos pesos moleculares entre os polipeptídeos sugerem que esta lectina consiste em múltiplas isoformas, devido a ocorrência de algumas substituições dos aminoácidos nas estruturas primária. A estrutura primária do PpaL foi resolvida através de sobreposição de conjuntos de peptídeos obtidos por digestão proteolítica. A sequência dos aminoácidos foi determinada por ESI-MS/MS, no qual 31 peptídeos de diferentes digestões enzimática (tripsina, quimiotripsina e pepsina) foram sequenciados (Tabela 4), resultando num total de 334 resíduos de aminoácidos. Estes aminoácidos foram alinhados com as estruturas primárias das lectinas de *Parkia biglobosa* (código de acesso PDB: 4MQO_A) e *Parkia platycephala* (código de acesso SwissProt: P83304) por meio do software ESPript 3.0 (Gouet et al. 1999), resultando em uma cobertura total de 75%, onde as lectinas apresentaram 97% de similaridade entre as suas sequências. A maior parte da estrutura secundária de PpaL é composta por folhas- β (Figura 12) este resultado corrobora com as estruturas secundárias das outras lectinas de *Parkia* (Bari et al. 2016)

Figura 11. Análise de espectrometria de massas de PpaL (ionização por electrospray). Espectro de massa deconvolvido mostra a massa média isotópica de PpaL obtido usando um espectrômetro de massa híbrido (SYNAPT HDMS System).



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 12. Predição da estrutura secundária de PpaL baseado na Sequência parcial.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 4. peptídeos usados para determinar a sequência de aminoácidos de lectina de sementes de *Parkia panurensis*. peptídeo identificado como T foi digerido com tripsina. Q foi digerido com quimiotripsina e P foi digerido com pepsina. A letra X na sequência representa resíduos de leucina ou isoleucina, quais não podem ser distinguidas pela massa.

Enzima	Massa molecular	Peptídeo
T1	1798.9750	XSVGPGWGGSGGNYWSFK
T2	1413.6824	VKXHWPTHEYXK
T3	1499.6433	SGSYGDYNGVXVXR
T4	1122.1565	SGDXDFTDPR
T5	1348.6049	YXDAXGXXFVQP
T6	965.0051	DADGHCYGK
T7	1503.6317	FGGQDPNDXGVEKK
T8	1266.4167	VEXDGNXEHHK
T9	1684.9500	FEVVTSSXFXTNVTK
T10	1688.9439	FSXPXEGSXTGFHGK
T11	1730.9812	SGYYXDSXGXVVKPR
T12	1798.9750	XSVGPGWGGSGGNYWSFK
T13	2240.4546	KSXAQDTSXGDSATFGGVNPK
T14	1609.7528	EYXTSXSGTYGQYK
T15	1616.8340	XSFTTNXATYGPFGK
T16	1958.2219	SATSFSXPXHNMMVVGPH
T17	1477.7069	PXHNMMVVGPHGR
T18	1865.1132	AGDYXDAXGXFVKPDYV
Q1	867.9976	XKSXSASY
Q2	1003.16320	PXADSVVVGPH
Q3	659.70248	HGRAGY
Q4	1952.2860	XGXFVQPVPHGTXSFGPW
Q5	575.6653	KVGSW
Q6	1882.0344	ADAAXNSXAFKDADGHCY
Q7	867.9977	XKSXSGTY
Q8	1658.7442	EGSXSXGPWGGSGGDPW
Q9	2179.3276	NPKDTGEKNTVSXNWPSEY
P1	674.7087	KDAGGDY
P2	1140.1718	SGDXSGTFFGGKD

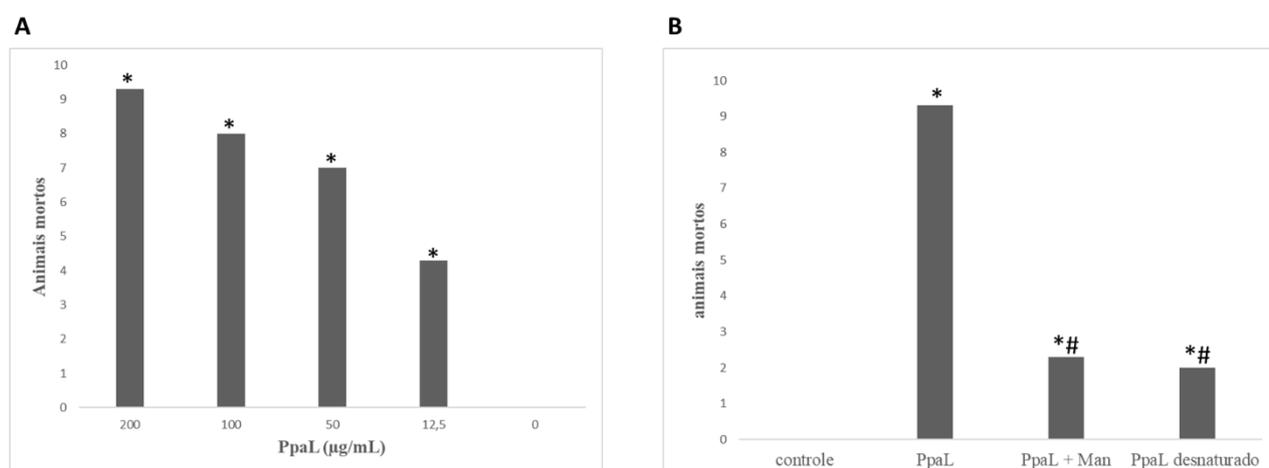
P3	952.2107	KKXXKXHW
P4	1587.6196	DPEGSXSXGPWGGSGGD

Fonte: Elaborado pelo autor.

2.3.4 Ensaio de citotoxicidade contra *Artemia sp*

Todas as concentrações de PpaL (200, 100, 50 e 12,5 µg/mL) testados foram tóxicas para *Artemia sp* no período de 24 horas, causando letalidade média de 9,3, 8,0, 7,0 e 4,3, respectivamente (Figura 13 A), sendo assim a toxicidade determinada de PpaL em CL₅₀ é igual a 20 µg/mL. O complexo PpaL-manose apresentou baixa toxicidade, tendo letalidade média de 2,3. A lectina desnaturada por aquecimento a 100 °C por 1 h. apresentou letalidade média de 2 *Artemia sp*. O controle, cujos poços continham apenas água do mar e 10 *Artemia sp* apresentou 100% de sobrevivência, indicando claramente que a mortalidade das Artemias está associada à proteína (Figura 13 B).

Figura 13. Ensaio de toxicidade contra *Artemia sp*. (A) Efeito tóxico de PpaL contra *Artemia sp* em diferentes concentrações (200, 100, 50 e 12,5 µg/ml); (B) O controle negativo: poços contendo apenas água do mar e *Artemia sp*. Controle positivo: 200 mg/ml da PpaL. Efeito tóxico da PpaL (200 µg/ml) previamente incubado com manose 100 mM e PpaL (200 µg/ml) desnaturado por aquecimento a 100 °C. EPM (n=5). *p <0,05 comparado com controle; #p <0,05 comparado com PpaL (200 µg/ml).



Fonte: Elaborado pelo autor.

*comparação com controle

comparação com PpaL 200 mg

2.4 Discussão

O processo de purificação de PpaL através da combinação das técnicas de fracionamento com sulfato de amônio e cromatografias de afinidade e de troca iônica resultou na lectina purificada com um grau de pureza de 4.946 vezes em relação ao extrato bruto (Tabela 3). Os estudos anteriores demonstram que as lectinas purificadas das espécies de *Parkia* geralmente têm preferência em aglutinar os eritrócitos de coelho principalmente tratados com a enzima proteolítica tripsina. A inibição de atividade hemaglutinante de PpaL é duas vezes maior por manose (12,5 mM) do que glicose (25 mM), indicando que as lectinas do gênero *Parkia* tem a preferência por grupo hidroxil de C2 que é axial na manose enquanto que na glicose é equatorial. Neste contexto a PpaL demonstra mesmo comportamento que as lectinas de *Parkia biglobosa* (PBL) (Silva et al. 2013) e *Parkia platycephala* (PPL) (Cavada et al. 1997), assim como outras lectinas do gênero *Parkia* citados na literatura, quase todas apresentam maior afinidade pela manose do que glicose. Outra explicação que pode reforçar a preferência de manose em relação a glicose entre as lectinas de *Parkia* é o envolvimento das moléculas de água na interação de alguns resíduos de aminoácidos que fazem parte do domínio de reconhecimento a carboidratos com o O2 axial da manose, sendo que isso não é possível no O2 equatorial de glicose (Gallego Del Sol et al. 2005). Além disso, PpaL tem uma maior afinidade para α -metil-D-manosídeo (3,125 mM) do que para D-manose. Essa especificidade a carboidratos, que são semelhantes a outras lectinas de *Parkia* indicam que um substituinte mais hidrofóbico em C-1 em α -metil-D-manosídeo pode favorecer o estabelecimento de interações adicionais com regiões hidrofóbicas do domínio de reconhecimento a carboidratos da lectina, aumentando assim a afinidade por esses carboidratos em relação à D-manose e D-glicose. No entanto, existem estudos que demonstram a existência de sítios de ligação específicos para moléculas hidrofóbicas nas lectinas e estes sítios podem ser independentes de domínio de reconhecimento a carboidratos, o que significa dizer que isso não nula a capacidade das lectinas reconhecerem e se ligarem aos carboidratos; pelo contrário, esta propriedade pode ser explorada para usar a lectina como um carreador de drogas para células específicas como no caso de complexo lectina porfirina (Komath, Kavitha, and Swamy 2006). Além disso, a análise das interações entre as lectinas PBL e PPL com carboidratos D-manose, D-glicose e α -metil-D-manosídeo através de *docking* molecular demonstraram que essas lectinas apresentam maior afinidade para α -metil-D-manosídeo. No entanto, a análise de *docking* molecular revelou também que PBL e PPL apresentam uma ligeira diferença na intensidade de ligação principalmente no domínio III, o que pode ser atribuído à diferença na topologia de aminoácidos

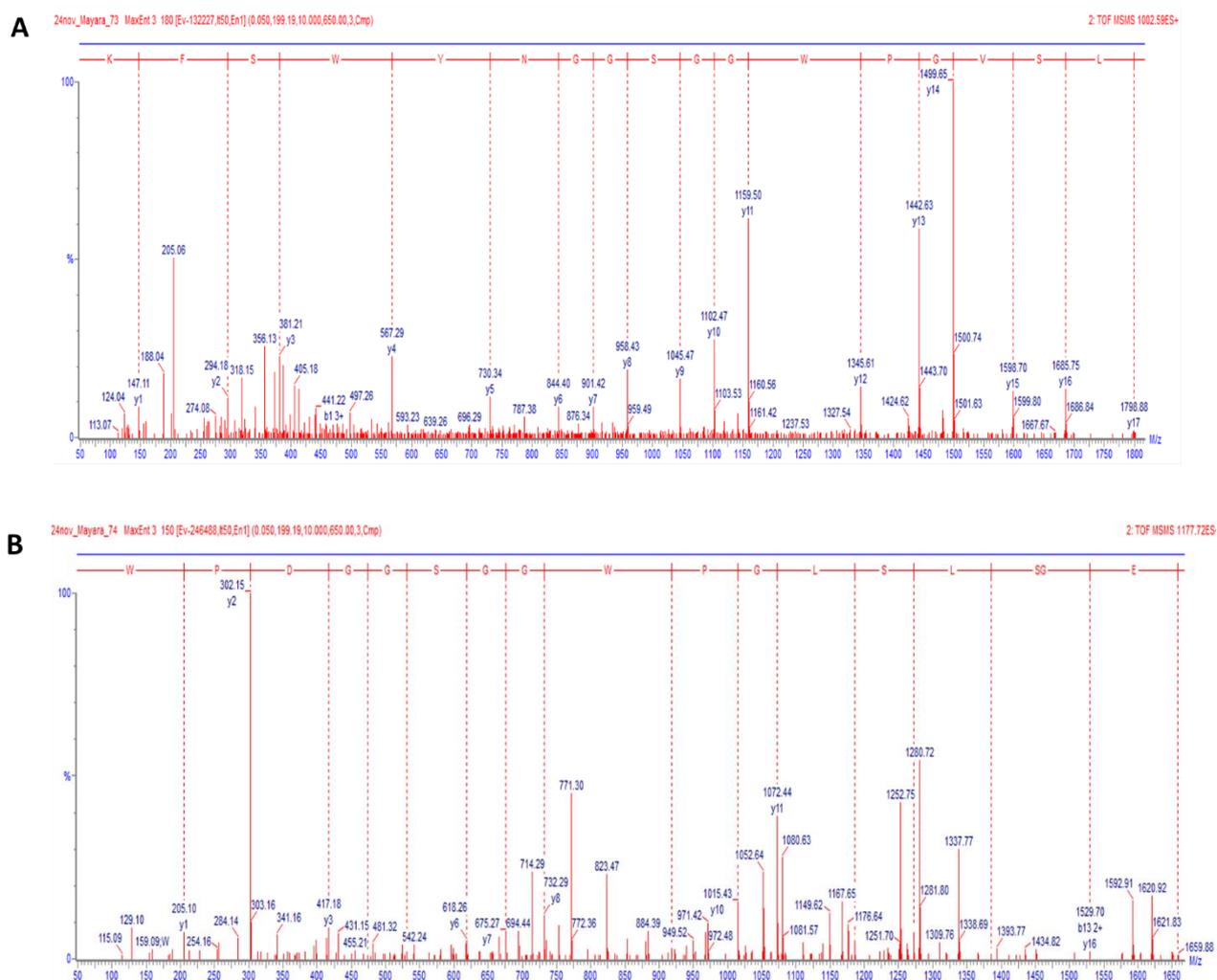
na região de domínio de reconhecimento a carboidratos entre os domínios I, II e III (Bari et al. 2016).

No gel de eletroforese, tanto na presença como na ausência do agente redutor (β -mercaptoetanol), PpaL apresentou apenas uma banda de proteína com peso molecular aparente de 45 kDa. O padrão de banda única no gel de eletroforese indica elevado nível de purificação e na presença de agente redutor indica que não há formação de ponte dissulfeto (S-S) na proteína. Outras lectinas do mesmo gênero apresentaram diferentes perfis eletroforéticos, como no caso de lectina de *Parkia javanica*, que apresentou duas bandas no SDS-PAGE. No entanto, foi relatado que as lectinas são polipeptídeos distintos com pesos moleculares aparentes de 46 e 58 kDa (Utarabhand and Akkayanont 1995). Em contraste, as lectinas de *Parkia biglandulosa* e *Parkia roxburghii* não apresentaram nenhum resíduos de cisteína em suas sequências de aminoácidos, no entanto os seus perfis no gel SDS-PAGE são compostos por quatro bandas cada (Kaur et al. 2005). A análise estrutural de PBL e PLL demonstrou a existência de apenas uma cisteína em suas sequências de aminoácidos, tornando assim impossível a formação de ponte de sulfeto. Algumas lectinas, como as ConA-like (Moreira and Gavada 1984), possuem pequenas cadeias que são produtos de processos pós-traducionais, portanto, mesmo quando purificadas, apresentam mais de uma banda no gel de eletroforese. PpaL apresentou massas moleculares aparente de 100 kDa e 89 kDa no gel de eletroforese em condições nativas e na cromatografia de exclusão molecular respectivamente, sugerindo que a PpaL em solução é uma proteína dimérica composto por duas subunidades idênticas. Esta propriedade foi relatada em outras lectinas de *Parkia*, como PBL (Silva et al. 2013) e PPL (Mann et al. 2001), utilizando as técnicas de cromatografia de exclusão molecular e ultracentrifugação analítica, respectivamente. A PpaL não é glicoproteína, pois não reagiu ao teste de fenol-ácido sulfúrico realizado segundo a metodologia de Dubois e colaboradores 1956. Esta característica é conservada em PBL e PPL, que, apesar de apresentarem sítios de glicosilação em suas sequências de aminoácidos, elas não são glicosiladas. Por outro lado, as lectinas de *Parkia biglandulosa* e *Parkia roxburghii* são glicoproteínas contendo baixa concentração de açúcares neutros em suas sequências correspondendo a 1,06% e 0,60% respectivamente (Kaur et al. 2005). A faixa de pH ótimo para as atividades de PpaL está entre pH 7,0 e 8,0. O tratamento térmico em diferentes temperaturas demonstrou que a PpaL é capaz de manter sua atividade hemaglutinante máxima até 40 °C, mas perde 50% de sua atividade a 50 °C, e acima desta temperatura a sua atividade continua diminuindo até que seja completamente perdida a uma temperatura de 70 °C. Já a PBL consegue manter a sua atividade máxima até 50 °C, mas também perde completamente sua atividade a 70 °C, enquanto que a lectina de *Parkia*

roxburghii perde completamente sua atividade em temperaturas acima de 55 °C. PpaL ao ser submetida a diálise com EDTA, perdeu cerca de 90% de sua atividade hemaglutinante, no entanto, foram recuperadas cerca de 12,5% e 50% de sua atividade quando adicionados íons Ca^{2+} e Mn^{2+} em soluções lectínicas respectivamente. Estes dados nos demonstram que a atividade hemaglutinante de PpaL é dependente de íons metálicos com maior preferência para Mn^{2+} em relação a Ca^{2+} . Apesar de a influência dos íons metálicos na atividade das lectinas não estar bem elucidada ainda, existem estudos que sugerem que as ligações metálicas estabelecidas entre os íons Ca^{2+} e Mn^{2+} com os resíduos de aminoácidos do sítio ativo pode alterar a conformação estrutural da lectina, de modo que favorece a interação proteína-carboidrato. Por outro lado, existem estudos que demonstraram que atividade hemaglutinante de algumas lectinas do gênero *Parkia* não são afetadas pela diálise prolongada com EDTA, como no caso da lectina da semente de *Parkia speciosa* (Suvachittanont and Peutpaiboon 1992), e corroborando com isso, a resolução das estruturas tridimensionais de PPL e PBL demonstraram ausência de íons metálicos.

A massa molecular de PpaL determinado pela espectrometria de massa ESI-MS foi 50.566,4023 Da. Este dado corrobora com a massa molecular aparente determinado pela eletroforese SDS-PAGE. A presença de outros polipeptídeos com poucas diferenças de massa molecular também foi observada, indicando que as preparações de PpaL contêm isolectinas altamente homólogas. A substituição de alguns resíduos de aminoácidos foi confirmada através de espectro de alguns peptídeos obtidos da sequência parcial de estrutura primária (Figura 14 A e B). Os resíduos de aminoácidos que constituem a estrutura parcial de PpaL foram sequenciados manualmente por meio da interpretação dos espectros obtidos de espectrometria de massa (ESI-MS/MS). Neste processo, foi obtido um total de 31 peptídeos provenientes de diferentes digestões enzimática (18 de tripsina, 9 de quimiotripsina e 4 de pepsina) resultando em uma sequência parcial correspondente a aproximadamente 75% da cobertura total da proteína. A sequência parcial foi alinhada contra duas outras lectinas de *Parkia*, sendo elas PBL (código de acesso PDB: 4MQO_A) e PPL (código de acesso SwissProt: P83304), utilizando o software ESPript 3.0, a onde foi determinada 97% de similaridade entre as sequências, indicando assim alta homologia entre lectinas deste gênero (Figura 15).

Figura 14. Isoformas de peptídeos da preparação de PpaL. Duas isoformas dos peptídeos T12 e C8 obtidas através da técnica de dissociação induzida por colisão. (A) íon de serie Y com m/Z 1798,9750 e sequencia especifica interpretada como LSVGPWGGSGGNYWSFK. (B) íon de serie Y com m/Z 1658,7442 e sequencia especifica interpretada como EGSLSLGPWGGSGGDPW.



Fonte: elaborado pelo autor

Figura 15. Alinhamento de sequências de aminoácidos das lectinas de *Parkia panurensis* (PpaL), *Parkia platycephala* (PPL) e *Parkia biglobosa* (PBL). Caixas vermelhas e branca representam aminoácidos idênticos e não idênticos respectivamente.



Fonte: elaborado pelo autor

As sequências heterogêneas foram encontradas nas posições 21 G/S, 35 V/X, 49 A /G, 71 X/R, 217 X/V, 226 D/N e 227 P/Y, indicando que PpaL é uma proteína composta por uma mistura de isolectinas homólogas, fato confirmado nos espectros de MS/MS dos peptídeos C8 e T12, que mostram a substituição dos resíduos dos aminoácidos X/V, D/N e P/Y nas posições 217, 226 e 227, respectivamente. Estudos das estruturas primárias e terciária de PBL (Silva et al. 2013) (Bari et al. 2016) e PPL (Mann et al. 2001, Gallego Del Sol et al. 2005) demonstraram que as lectinas maduras isoladas a partir das sementes das *Parkia* são constituídas por uma cadeia polipeptídica formada em tandem de três domínios β -prisma relacionados às lectinas de tipo jacalina, sendo que cada domínio β -prisma apresenta um sítio de ligação a carboidrato independente. Os resíduos dos aminoácidos que fazem parte dos sítios de ligação a carboidratos em PBL e PPL são: Gly16, Gly136, Tyr137, Tyr138 e Asp140 no sítio 1; Gly164, Asp165, Gln206, Tyr283, Tyr 284 e Asp 286 no sítio 2; Gly311, Asp132, Asp432 e Asp435 no sítio 3. Com a exceção dos resíduos Gly164 e Asp165, ambos pertencentes ao sítio 2, todos os outros resíduos de aminoácidos pertencentes aos sítios de ligação a carboidratos foram encontrados na sequência parcial da estrutura primária de PpaL. Foi encontrado um resíduo de cisteína na sequência parcial de PpaL. No entanto, a proteína pura no gel de eletroforese, tanto na presença como na ausência de um agente redutor (β -mercaptoetanol), apresenta o mesmo perfil de apenas uma banda proteica, sugerindo que não ocorre a formação de ponte de dissulfeto. De mesma forma, foi encontrado também apenas um resíduo de cisteína nas estruturas primárias de PBL e PPL confirmando a impossibilidade de formação de pontes de dissulfeto para estas lectinas.

O PpaL mostrou ser uma proteína tóxica contra *Artemia sp.* apresentando valor de CL_{50} igual a 20 $\mu\text{g/mL}$. Esse efeito é dose-dependente, apresentando a letalidade máxima na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 13 A). Uma redução significativa na letalidade foi alcançada quando PpaL foi incubada com manose ou quando desnaturada por aquecimento (Figura 13 B), sugerindo que a toxicidade de PpaL é mediada pelo domínio de reconhecimento a carboidrato e dependente da conformação nativa da proteína. Algumas atividades biológicas das lectinas de gênero *Parkia* foram relatadas na literatura, como por exemplo a *Parkia biglandulosa* e *Parkia roxburghii*, apresentaram atividades antiproliferativas e mitogênicas (Kaur et al. 2005), *Parkia biglobosa* apresentou atividades antinociceptiva e antiinflamatória (Bari et al. 2016), e *Parkia platycephala* potencializa atividade antibióticos contra cepas bacterianas multirresistentes e inibi o desenvolvimento de *Haemonchus contortus* (Silva et al. 2019). Pela primeira vez neste trabalho está sendo mostrado a toxicidade de uma lectina de gênero *Parkia* contra *Artemia sp.* Vale ressaltar que o mecanismo de ação das lectinas para causar letalidade nas *Artemia sp* ainda é desconhecido. A toxicidade de PpaL com o valor de

CL₅₀ igual a 20 µg/mL pode ser considerada substancial em comparação com as outras lectinas de leguminosas, como *Abrus pulchellus* que apresentou CL₅₀ igual a 3,5 µg/mL (Ramos et al. 1998), e *Dialium guineense*, que apresentou CL₅₀ igual a 29 µg/mL (Bari et al. 2013), enquanto *Canavalia villosa* apresentou CL₅₀ igual a 133 µg/mL (Lossio et al. 2017). Vários estudos na literatura sobre lectinas de várias espécies de plantas demonstram potencial biotecnológico promissor, tornando assim, essas lectinas ótimas candidatas à produção de medicamentos. No entanto, estudo adicionais sobre os efeitos toxicológicos dessas proteínas são necessários a fim de poder reduzir os possíveis danos colaterais que podem ser causados ao administras estas proteínas. O teste de letalidade com os micros crustáceos *Artemia sp.* já é um ensaio bem estabelecido e fácil de realizar afim de determinar a toxicidade de vários tipos de substâncias que vai desde moléculas químicas a moléculas bioativas

2.5 Conclusão

Neste trabalho, foi possível purificar e caracterizar parcialmente uma nova lectina de sementes de *Parkia panurensis* específica a manose/glicose denominada PpaL com peso molecular de 50 kDa. No entanto, em solução, ela se comporta como um dímero formado por dois monômeros iguais. PpaL é uma metaloproteína, termoestável e ativa em ampla faixa de pH, e se mostrou tóxica contra náuplios de *Artemia sp.* PpaL é homóloga às lectinas de sementes de *Parkia biglobosa* e *Parkia platycephala*. Estas duas lectinas exibem efeitos biológicos muito importantes, tais como, atividade antinociceptiva, anti-inflamatória e antibiótica, indicando que PpaL também pode exibir propriedades semelhantes, tornando-as, assim, promissoras candidatas para ferramentas biotecnológicas.

3 PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO DA ESTRUTURA PRIMARIA E AVALIAÇÃO DE EFEITOS BIOLÓGICOS DE UMA NOVA LECTINA DE SEMENTE DE *PARKIA NÍTIDA* MIQ.

3.1 Objetivos

3.1.1 Objetivo geral

Purificar, caracterizar físico-quimicamente, determinar a estrutura primaria e avaliar atividade citotóxica de uma nova lectina de sementes *Parkia nitida* Miq.

3.1.2 Objetivos específicos

- prospecção de lectina no extrato de sementes e determinar a sua especificidade por carboidratos;
- Purificar a lectina de *Parkia nitida* através dos métodos tradicionais de química de proteínas;
- Realizar os testes de estabilidade térmica, pH e dependência dos íons metálicos bivalentes;
- Determinar a massa molecular intacta da lectina por espectrometria de massas;
- Determinar a estrutura primária da lectina por espectrometria de massas;
- Realizar ensaio biológico de toxicidade contra *Artemia* sp.

3.2 Materiais e métodos

3.2.1 Animais

Os eritrócitos utilizados para os testes de atividade hemaglutinante (A.H.) e os efeitos dos carboidratos na inibição de A.H. foram coletados dos coelhos da raça Nova Zelândia com pesos corporais aproximados de 3 kg mantidos no biotério do departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará (UFC) campus do píci em grupos de um por gaiola, mantidas em condições de temperatura controlada com água e a comida a disposição. Os protocolos dos experimentos foram aprovados pelo comitê institucional de cuidado e uso dos animais de Universidade Federal do Ceará (CEUA nº 10130208-8/40).

3.2.2 Materiais vegetais

As sementes de *Parkia nitida* Miq. C. Hopkins (família *leguminosae*, subfamília *Mimosoideae* e gênero *Parkia*) foram coletadas em Amazonas – Brasil. Após coleta as sementes foram limpadas, secadas na estufa a 37 °C. Detalhes de algumas partes de planta em figura 16.

Figura 16. (A) Tronco, (B) folhas e vagens, (C) inflorescência e (D) sementes de *Parkia nítida*.

(A)



(B)



(C)



(D)



3.2.3 Extração e fracionamento proteico

Antes da extração proteica as sementes maduras de *Parkia nitida* foram descascadas e trituradas no moedor de café (cadence di grano) até a obtenção de farinha fina, posteriormente foi feita a delipidação da farinha, adicionando hexano na proporção de 1/5 (p/v), e deixado em contato durante 6h sob breves agitação em intervalos de 1h. Após este tempo o hexano foi removido e a farinha foi deixada para secar na capela em temperatura ambiente até todo o hexano evaporar. Com intuito de determinar o pH mais eficiente em extrair a proteína de interesse, a farinha delipidada foi submetida a uma triagem de extração com diferentes soluções tampões (Glicina 100 mM pH 2,6; Acetato de sódio 100 mM pH 4,0; Tris-HCl 100 mM pH 7,0 e Glicina 100 mM pH 9,0. Todos contendo NaCl 150 mM) na proporção de 1:10 (p/v), onde as amostras foram deixadas em agitação mecânica por 4 horas em temperatura ambiente. Após este período as amostras foram centrifugadas a 9000xg por 20 min a 4 °C e os sobrenadantes obtidos, denominados de extrato bruto, foram filtrados com papel de filtro e submetido a fracionamento proteico com sulfato de amônio (f 0-60% e f 60-100% respectivamente). Cada fração foi centrifugado a 9000 rpm por 20min a 4 °C e os sobrenadantes das frações foram descartados e os precipitados foram ressuspensos, dialisados exaustivamente contra água destilada e guardadas para testes posteriores.

3.2.4 Purificação de lectina de sementes da *Parkia nitida*

A amostra obtido de fracionamento com sulfato de amônio (f 0-60%) foi dialisado contra tampão Tris-HCl 100 mM pH 7,6 contendo NaCl 150 mM, este mesmo tampão foi utilizado para equilibrar o matriz cromatografico Sepharose 4B-manose (8 x 1,5cm; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). As moléculas insolúveis de f0-60% foram removidas pela centrifugação a 9000xg por 5 min a 4 °C e o sobrenadante resultante foi aplicado em matriz cromatográfica e mantida em contato por 14 h. As proteínas que não se ligaram na matriz, denominadas de PI foram eluidas com o mesmo tampão de equilíbrio, já as proteínas que se ligaram na matriz, denominadas de PII foram eluidas com tampão Glicina 100 mM pH 2,6 contendo NaCl 150 mM. Foram coletadas frações de 1 mL em fluxo de 0,7 mL/min e as proteínas coletados nos tubos de ensaio foram monitoradas por espectrofotômetro (Amersham Biosciences; Ultrospec2100Pro) no comprimento de onda de 280 nm. A fração retida foi acumulada, dialisada contra água destilada, liofilizada e posteriormente submetidas a teste de atividade hemaglutinante. Para a segunda etapa cromatográfica, 3 mg de PII foi ressuspensado em 1 mL de solução NaCl 300 mM, centrifugada a 9000xg por 5 min a 4 °C e o sobrenadante

resultante foi submetida a cromatografia de exclusão molecular em HPLC (7.8 mm x 30 cm, BioSuite, UPLC Waters). A mesma solução de ressuspensão foi utilizando tanto para equilibrar a coluna como para eluir as proteínas em interação com matriz. Nesta etapa cromatográfica foram obtidos também dois picos denominados de AI e AII respectivamente. Foram coletadas frações de 1 mL em fluxo de 0,6 mL/min e as proteínas foram monitoradas por espectrofotômetro no comprimento de onda de 280 nm. A fração retida foi acumulada, dialisada contra água destilada, liofilizada e submetida a teste posteriores.

Os testes do ensaio de hemaglutinação, inibição de atividade hemaglutinante pelos carboidratos, quantificação de proteína e açúcares neutras presentes na sequência primária, assim como os ensaios de caracterização físico-químicas (testes de estabilidade térmica, pH e dependência metálica) e estruturais, tais como, determinação de massa molecular e estrutura primária pela espectrometria de massas, e também como ensaio de citotóxicidade contra *Artemia sp* foram realizados de acordo com as metodologias descritas no capítulo 2 deste trabalho.

3.3 Resultados

3.3.1 Extração proteica, ensaios de hemaglutinação e inibição de atividade hemaglutinante por carboidratos

Todas as soluções tampões utilizados para o preparo de extratos proteicos (extrato bruto) demonstraram eficiência em extrair proteínas, sendo que o tampão glicina pH 9,0 extraiu a maior quantidade de proteínas totais, e também todos os extratos brutos apresentaram atividades hemaglutinante contra eritrócitos de coelho tratado com a enzima proteolítica tripsina, sendo que o tampão acetato de sódio pH 4,0 apresentou tanto maior atividade hemaglutinante como maior atividade hemaglutinante específica. Dentre as frações obtidas em precipitação proteica com sulfato de amônio, a fração f 0-60 foi mais eficaz na obtenção da nossa proteína de interesse e por esta razão foi escolhida para dar continuidade aos experimentos (Tabela 5).

Tabela 5. Atividade Hemaglutinante nos extratos proteicos de sementes de *Parkia nitida*.

Extratos bruto	C.P.* (mg/mL)	A.H.** (UH/mL)	A.H.E.*** (UH/mg)
Glicina pH 2,6	7,83	32	4,09
Acetato de sódio pH 4,0	13,1	128	9,77
Tris-HCl pH 7,6	5,58	16	2,87
Glicina pH 9,0	13,7	32	2,34
fracionamento com sulfato de amônio#			
f 0-60%	3,03	512	169
f 60-100%	2,72	Sem atividade	X

Fonte:

Fonte. Elaborado pelo autor.

* Concentração de proteína determinado pelo método de Bradford (1976)

** Atividade hemaglutinante contra eritrócitos de coelho tratados com a enzima proteolítica tripsina expressas em termos de Unidade Hemaglutinante (UH).

*** Atividade Hemaglutinante Específica calculada como a relação entre a atividade hemaglutinante e a concentração de proteína total.

A atividade hemaglutinante existente no extrato bruto, como posteriormente na lectina pura foram inibidas por seguinte açucares: D-glicose, D-manose e α -metil-D-manosideo. Sendo que a concentração mínima inibitória (CMI) α -metil-D-manosideo é duas vezes menor em relação a D-manose e oito vezes menor em relação a D-glicose (Tabela 6), o que significa que α -metil-D-manosideo tem maior especificidade pela lectina purificada de sementes de *Parkia nitida*.

Tabela 6. Inibição de atividade Hemaglutinante de lectina de semente de *Parkia nitida* por diferentes carboidratos.

Carboidratos	CMI (mM)*
D-glicose	25
D-manose	6,25
α-metil-D-manosideo	3,125
D-galactose	NI**
α-lactose	NI
L-fucose	NI
Sucrose	NI
D-rafinose	NI
α-metil-D-galactosideo	NI
Melibiose	NI

Fonte: Elaborado pelo autor.

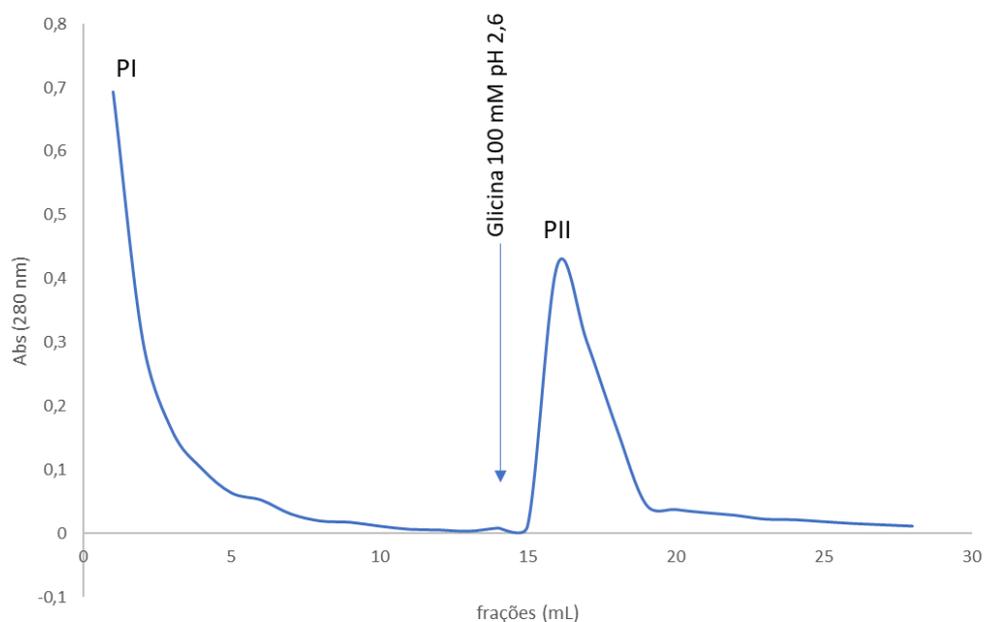
*Concentração mínima inibitória

**NI - Açúcar não inibiu até concentração de 100 mM

3.3.2 Purificação de lectina de sementes da *Parkia nitida*

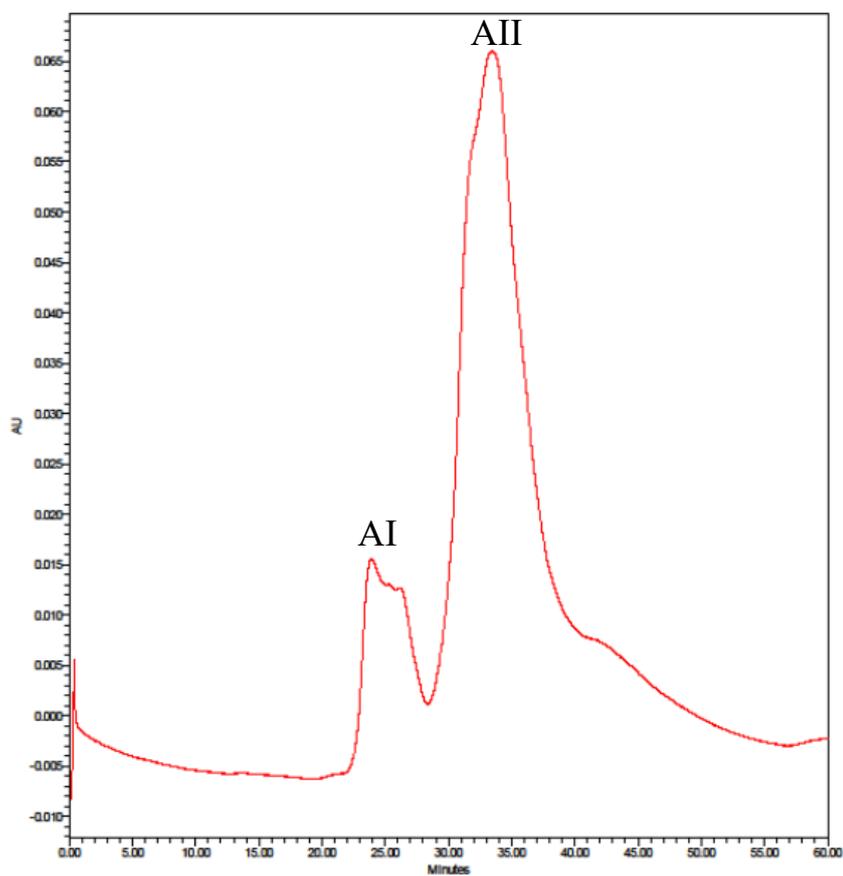
A etapa de purificação da lectina consistiu em uma sequência de combinação das técnicas de precipitação proteica com sulfato de amônio, cromatografias líquidas de afinidade e exclusão molecular respectivamente. Na cromatografia de afinidade em matriz Sepharose 4B-manose foi obtido dois picos cromatográficos denominados de PI e PII (Figura 17), sendo que apenas o PII apresentou atividade hemaglutinante, porém com nível de pureza que a princípio foi insatisfatória, por isso, foi submetida a segunda etapa de cromatografia, no caso, a de exclusão molecular utilizando a matriz BioSuite, UPLC Waters, onde também foram obtidas dois picos cromatográficos (AI e AII) (Figura 18) e ambos apresentaram atividade hemaglutinante, sendo que AII foi considerado um provável fragmento da lectina madura denominada de cadeia β e AI foi considerada lectina madura (cadeia α) e pura, a qual foi denominada de lectina de sementes de *Parkia nitida* sob a sigla de PNL (Tabela 7).

Figura 17. Cromatografia de afinidade em matriz Sepharose 4B-Manose. Volume do gel: 8 mL, 6 mg/mL de amostra (f0-60) aplicada. A amostra ficou em contato com a matriz por aproximadamente 14 horas. As proteínas não ligantes a matriz foram eluídas com tampão Tris-HC 50 mM pH 7,6 contendo NaCl 150mM (PI). A proteína ligante foram eluídas com Glicina 100 mM pH 2,6 contendo NaCl 150 mM (PII). As amostras foram coletadas em volume de 1 mL, a um fluxo de 0,7 mL/min e foram detectadas por espectrofotometria em 280 nm.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 18. Cromatografia de exclusão molecular em matriz BioSuite, UPLC Waters. Volume do gel: 14,3 mL, 3 mg/mL de amostra (PII) aplicada. As proteínas foram eluídas com solução NaCl 300 mM. As amostras foram coletadas em volume de 1 mL, Fluxo de 0,6 mL/min e foram detectadas por espectrofotometria em 280 nm.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 7. Tabela de purificação da lectina de sementes de *Parkia nitida*.

frações	C.P* (mg/mL)	A.H.** (UH/mL)	A.H.E. *** (UH/mL)	Purificação
Extrato bruto	13,1	128	9,77	1
f0-60%	3,03	512	169	17,30
Cromatografia de afinidade em Sepharose 4B-manose				
PI	0,036	Sem atividade	X	X
PII	0,013	16	1.231	126
cromatografia de exclusão molecular em BioSuite,UPLC				
AI	0,0019	32	16.842	1.723
AII (PNL)	0,0006	4	6.666	682,3

Fonte: Elaborado pelo autor.

* Concentração Proteica.

**Atividade Hemaglutinante testado com eritrócito de coelho tripsinizado.

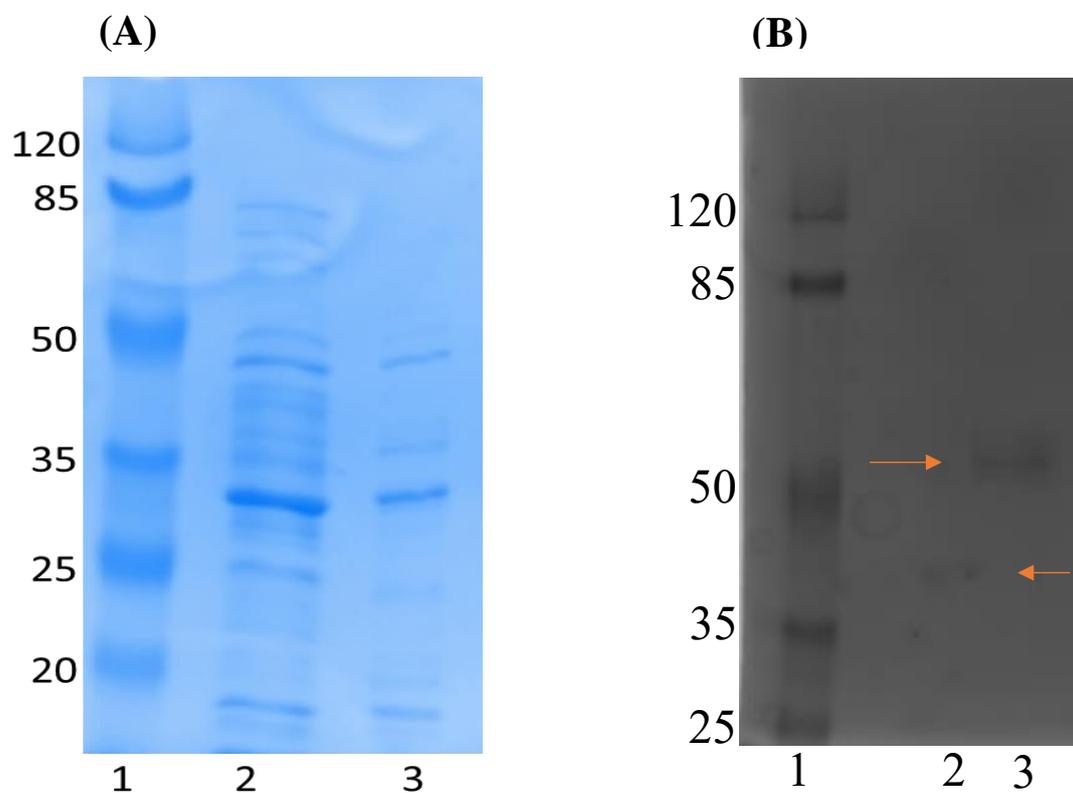
*** Atividade Hemaglutinante Especifica.

3.3.3 Caracterização físico-química

3.3.3.1 SDS – PAGE

Foram realizados análise de eletroforese das proteínas em gel de 15% na condição desnaturante com o intuito de determinar o peso molecular aparente e grau de purificação das proteínas. O PII obtido na cromatografia de afinidade em Sepharose 4B-manose que é correspondente as proteínas que se ligaram na matriz cromatográfico, apresentou um perfil de três bandas proteicas: a mais pesada na altura correspondente a peso molecular aparente de 50 kDa, uma na altura de 35 kDa, e a banda mais leve na altura correspondente a peso molecular aparente de 20 kDa (raia 3) (Figura 19 A). Os picos obtidos da cromatografia de exclusão molecular apresentaram perfil de proteínas puras, pois ambas são compostas por uma única banda de proteína em seus respectivos raias com pesos moleculares aparente de 35 KDa para AII (raia 2) e 50 kDa para AI (raia 3) (Figura 19 B). Não foi possível visualizar a banda menor (20 kDa), provavelmente por ser pouco concentrado na segunda etapa de cromatografia, ou talvez pelo fato de ser pequena pode ter saído do gel juntamente com a frente de corrida. Tanto AI como AII não reagiram com fenol-ácido sulfúrico no método de Dubois para determinar presença de carboidratos na estrutura primaria de proteína.

Figura 19. Eletroforese (SDS – PAGE). Gel de 15% corado com Coomassie Brilliant Blue G-250. **(A)** 1- Marcadores moleculares (120 kDa- β -galactosidase, 85 kDa-Albumina s rum bovina, 50 kDa-Ovalbumina, 35 kDa-Anidrase carbonico, 25 kDa- β -lactobumina e 20 kDa-lisozima). 2- 20 μ g de PI. 3- 20 μ g de PII **(B)**; 1- Marcadores moleculares (120 kDa, 85 kDa, 50 kDa, 35 kDa e 25 kDa). 2- 20 μ g de AII. 3- 20 μ g de AI (PNL).

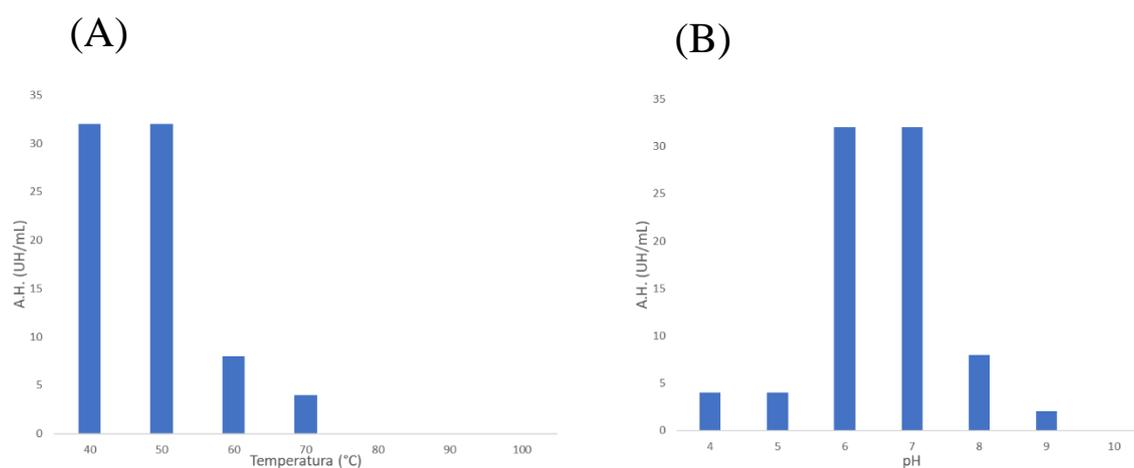


Fonte: Elaborado pelo autor.

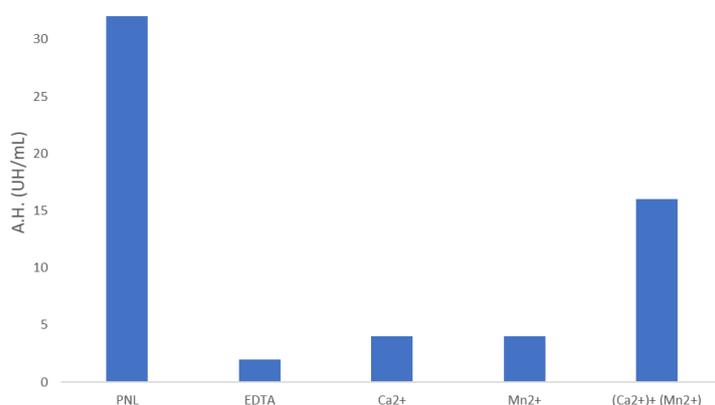
3.3.3.2 Efeito de temperatura, pH e EDTA sobre atividade hemaglutinante

Nos testes da estabilidade térmica a PNL manteve a sua atividade hemaglutinante máxima nas temperaturas de 40 e 50 °C, perdendo mais de metade da atividade em 60 °C e continua decrescendo na temperatura de 70 °C até perder por completo a sua atividade a partir de 80 °C (Figura 20 A). A PNL demonstrou ser resistente ampla faixa de pHs, sendo que alcançou maior valor de título de hemaglutinação em pHs 6,0 e 7,0 e valor mais baixo em pH 9,0 e não apresentou atividade hemaglutinante em pH 10 (Figura 20 B). Foi observado que o agente quelante EDTA afetou atividade hemaglutinante de PNL, pois a lectina perdeu significativamente a sua atividade após dialise com a solução de EDTA 100 mM, sendo que a metade da sua atividade foi recuperado com adição de íons metálicos cálcio e manganésio (Figura 21).

Figura 20. Estabilidade térmica (A) e Estabilidade a variação de pH (B) de PNL.



Fonte: Elaborada pelo autor.

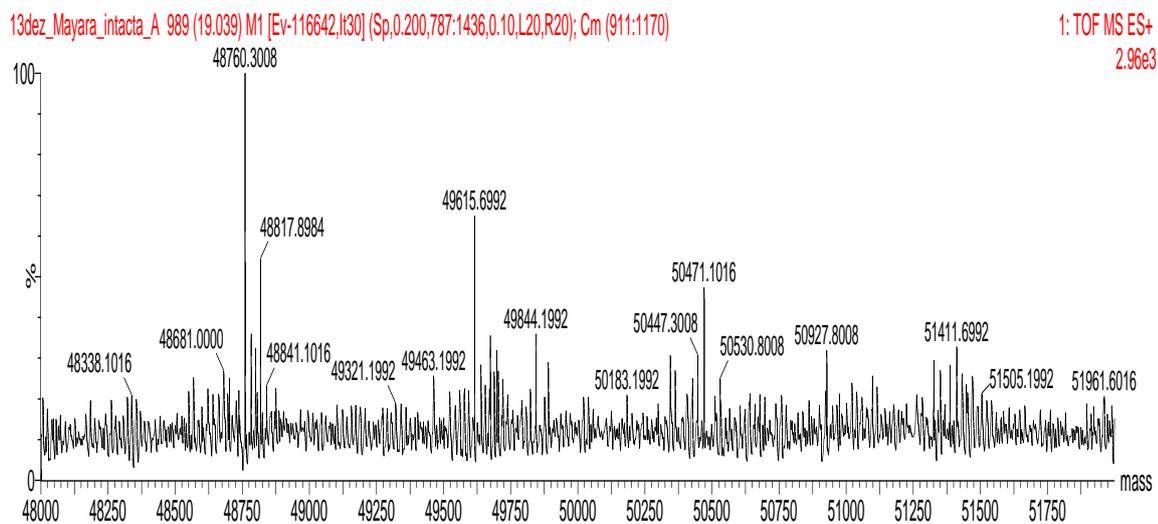
Figura 21. Efeito dos íons metálico sobre a Atividade Hemaglutinante de PNL

Fonte: Elaborada pelo autor.

3.3.4 Determinação de massa molecular intacta e a estrutura primaria de PNL

O espectro de massa intacta determinado pela espectrometria de massas ESI-MS demonstrou a presença de um polipeptídeo de íon predominante com intensidade corresponde a peso molecular de 48760,3008 Da e a mistura de polipeptídeos com os íons de menor intensidade, sugerindo que a lectina PNL é constituído de múltiplas isoformas (Figura 22). A sequência primaria de PNL foi resolvida pela sobreposição dos 51 peptídeos provenientes de diferentes digestões enzimática (17 tripsina, 24 quimiotripsina e 10 pepsina) obtidos através da dissociação por colisão induzida (CID-MS/MS), no qual resultou num total de 451 resíduos de aminoácidos que corresponde a 100% de cobertura total do peso molecular da proteína intacta (Figura 23 e Tabela 8). Estes aminoácidos foram alinhados com as estruturas primarias das lectinas de *Parkia biglobosa* (código de acesso no PDB: 4MQO_A) e *Parkia platycephala* (código de acesso no SwissProt: P83304) utilizando o software ESPript 3.0 (Gouet et al. 1999). As lectinas apresentam cerca de 90% de similaridade entre as suas sequências (Figura 24).

Figura 22. Análise de espectrometria de massas de PNL (ionização por electrospray). Espectro de massa deconvoluido mostra a massa média isotópica de PNL obtido usando um espectrômetro de massa híbrido (SYNAPT HDMS System).



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 23. Estrutura primária. Sobreposição dos peptídeos de lectina de *Parkia nitida* obtidos pela digestão enzimática. As enzimas utilizadas são diferenciadas pelas cores; verde para tripsina (T), azul para químiotripsina (C) e amarelo para pepsina (P).



Fonte: Elaborada pelo autor.

*A letra X na sequência representa resíduos de Leucina ou Isoleucina quais não são possíveis de distinguir pela massa.

Tabela 8. Peptídeos usados para determinar a sequência de aminoácidos de lectina de sementes de *Parkia nitida*. peptídeo identificado como T foi digerido com tripsina. Q foi digerido com quimiotripsina e P foi digerido com pepsina. A letra X na sequência representa resíduos de leucina ou isoleucina, quais não podem ser distinguidas pela massa (continua).

Enzima	Massa molecular	Peptídeo
T1	1135.50471	GGSGGTHWSYK
T2	1430.81147	ANHGVTEXXXHVK
T3	1706.82242	KDASGDXSSTFGGKDPR
T4	2046.00317	FGGKDPRENEKGYEKHR
T5	2528,2952	PTEYXKSXSGSPADYXGVVVTYR
T6	783.49672	NGXXVXR
T7	1043.56519	XFDQPVPTK
T8	1280.71291	YAXAAXNSXAFK
T9	863.43893	NDXFVEK
T10	2425.22781	KVEXDNXEHFKSXAGTYGNYK
T11	2249.17460	GFHKGSGWYLDGXGXVVKPR
T12	1202.58917	LNSATQGGVNDK
T13	933.45564	NPKDFGEK
T14	1327.67726	LTSXGGQYAQYK
T15	590.30646	FSQPX
T16	1730.91044	HGRAGDYXDAXGXFVK
T17	1562.88210	XGXFVKTPDTAVFR

Tabela 8. Peptídeos usados para determinar a sequência de aminoácidos de lectina de sementes de *Parkia nitida*. peptídeo identificado como T foi digerido com tripsina. Q foi digerido com quimiotripsina e P foi digerido com pepsina. A letra X na sequência representa resíduos de leucina ou isoleucina, quais não podem ser distinguidas pela massa (continuação).

Q1	734.39970	SLKGMXS
Q2	657.34865	XSVG PW
Q3	1274.70235	KXKXHFPT EY
Q4	824.42803	XTNX TTY
Q5	583.26426	TYGPF
Q6	1046.47095	FXSFGGGESF
Q7	899.49644	SXPXADSVV
Q8	806.41746	ADSVVGF
Q9	852.38789	HSRAGYY
Q10	910.48006	YLDAXGXF
Q11	1114.60230	QPVPEKT VAF
Q12	952.39270	PAGDDAFNF
Q13	1694.93962	NFKVGSW XKDXXXY
Q14	707.32390	GKFGGQD
Q15	684.32317	GNYKGF
Q16	1976.02553	EVVTSXSFXTDVTKHGPF
Q17	1020.46654	PFSHASGTAF
Q18	1555.82867	TAFSXPXFGSXVTGF

Tabela 8. Peptídeos usados para determinar a sequência de aminoácidos de lectina de sementes de *Parkia nitida*. peptídeo identificado como T foi digerido com tripsina. Q foi digerido com quimiotripsina e P foi digerido com pepsina. A letra X na sequência representa resíduos de leucina ou isoleucina, quais não podem ser distinguidas pela massa (continuação).

Q19	2099.00005	GGFPWSYEANEGXNAXVXY
Q20	990.51349	AGSNXKSPAF
Q21	647.32390	RDTSGL
Q22	686.33882	HPSSFL
Q23	1626.81414	DXFETVTGXGFTNL
Q24	638.30646	ATFGPF
P1	1309.65144	DNVKXSXFKDAS
P2	893.48588	SXSFXTNL
P3	874.39740	SFGPWGGPA
P4	1110.45532	DANGHCYGKF
P5	760.37560	PNDXGVF
P6	1870.96902	KLAGQGSXFXAPHGQSGGF
P7	773.46475	KNTVSXL
P8	1472.69766	YAQYKFKDYFT
P9	867.43384	DKXSATSF
P10	888.39127	HNNMVAGF

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 24. Alinhamento de sequências de aminoácidos das lectinas de *Parkia nitida* (PNL), *Parkia platycephala* (PPL) e *Parkia biglobosa* (PBL). Caixas vermelhas e branca representam aminoácidos idênticos e não idênticos respectivamente.

```

1      10      20      30      40      50      60
PNL   SLKGMISVGPWGGSGGTHWSYKANHGVTETILIHVKDNVKSISFKDASGDISGTFGGKDPR
PPL   SLKGMISVGPWGGSGGNYSWKANHAITEIVIHVKDNVKSISFKDASGDISGTFGGKDPR
PBL   SLKGMISVGPWGGSGGDHWSWKANHAITEIVIHVKDNVKSISFKDASGDISGTFGGKDPR
consensus>70 SLKGMISVGPWGGSGG..WS%KANH.!TEI.IHVKDN!KSISFKDA.GDISGTFGGKDPR

.

70     80     90     100    110    120
PNL   ENEKGYEKKIKHFPTEYLKSSISGSTADYNGVLVTVIRSLSFITNLTTYGPFLLSFGGGESF
PPL   ENEKGDYKIKIHWFPTEYLKSSISGSTADYNGVLVTVIRSLSFITNLTTYGPFLLSFGGGESF
PBL   ENKKGEEKKIGIRWFPTEYLKSSISGSTADYNGILVTVIRSLSFITNLTTYGPFLLSFGGGESF
consensus>70 EN.KG.EKKI.I...PTEYLKSSISGS..DYNG!LV.IRSLSFITNLTTYGPF.S..GGESF

130    140    150    160    170    180
PNL   SIPIADSVVVGFFHSRAGYYLDALGIFDQPVPEKTVTSFGPWGGPAGDDAFNFKVGSWIKDI
PPL   SIPIADSVVVGFFHGRAGYYLDALGIFVQPVPHGTVTSFGPWGGPAGDDAFNFKVGSWIKDI
PBL   SIPIADSVVVGFFHGRAGYYLDALGIFVQPVHRTVTSFGPWGGPAGDDAFNFKVGSWIKDI
consensus>70 SIPIADSVVVGFFH.RAGYYLDALGIF.QQVPE..T!SFGPWGGPAGDDAFNFKVGSWIKDI

190    200    210    220    230
PNL   IITYALAAINSIAFKDANGHCYGFKGGQDPNDIGVEKKVEID.NLEHFKSIA GTYGNKGF
PPL   IITYADAAINSIAFKDANGHCYGFKGGQDPNDIGVEKKVEIDGNLEHLKSSIS GTYGNKGF
PBL   IITYADATINSIAFKDADGHCYGFKGGQDPNDIGVEKKVEIDGNLEHLSIS GTYGNKGF
consensus>70 I!YA.A.INSIAFKDA#GHC..KGGQDPNDIGVE.KVEID.NLEH..SI.S GTYGNKGF

240    250    260    270    280    290
PNL   EVVTSLSFITDVTKHGPFSHASGTAFSIPPIFGSLVTGFHGKSGWYLDGIGIYVKPRAGQG
PPL   EVVTSLSFITNVTKHGPFGIASGTAFSIPPIFGSLVTGFHGKSGY YLDGIGIYVKPRDVEG
PBL   EVLTSLSFITNVTKHGPFGIASGTAFSIPPIFGSLVTGFHGKSGY YLDGIGIYVKPRDVEG
consensus>70 EV.VTSLSFIT#VTKHGPF..ASGT.FS.PI.FGSLVTGFHGK.G.YLD.GIGIYVKPR..#G

300    310    320    330    340    350
PNL   SIFIAFHGQSGGF PWSYANEGINAVIYAGSNIKSPAFRDTSGLD SATQGGVNPKDFGE
PPL   SISIGPWGSGGD PWSYANEGINQIIYAGSNIKSVAFKDTSGLD SATFGGVNPKDTIGE
PBL   SISIGPWGSGGD PWSYANEGINQIIYAGSNIKSAF KDTSGLD SATFGGVNPKDTIGE
consensus>70 SI.I.P.G.SGG.PWSY.ANEGIN.I!IYAGSNIKS.AF.DTSGL#SAT.GGVNPKD.GE

360    370    380    390    400    410
PNL   KKNTVSILHPSSEFLTSIGQYAOYKFKD!FTT!TVGLGFTTNLATYGPFGKISATSFSPPI
PPL   K.NTVSINWPSEYLTSGTYGOYKFKDVEFTTITSLSFTTNLATYGPFGKASATSFSPPI
PBL   K.NTVSIKWPSSEYLTSDTYGOYKFKDVEFTT!TVTSLSFTTNLATYGPFGKASLTSFSPPI
consensus>70 K.NTVSI..PS.%LTSI.G.Y.OYKFKD!FTT!T.L.FTTNLAT%GPF.K.S.TSFS.PI

420    430    440    450
PNL   HNNMVAGFHGRAGDYLD AIGIFVKTPDTAVFR
PPL   HNNMVVGFHGRAGDYLD AIGIFVK.PDTAV..
PBL   HNNMVVGFHGRAGDYLD AIGIFVK.PDTAV..
consensus>70 HNNMV.GFHGRAGDYLD AIGIFVK.PDTAV..

```

Fonte: Elaborada pelo autor.

3.3.5 Determinação de estrutura primária parcial de cadeia β de PNL

Para determinar a sequência linear dos aminoácidos de cadeia beta, a banda correspondente a peso molecular aparente de 35 kDa foi incisada do gel de eletroforese SDS-PAGE, submetida a digestão enzimática e posteriormente a análises de espectrometria de massas em tandem (ESI-MS/MS). Foram obtidos 18 peptídeos provenientes da digestão com tripsina e quimiotripsina através de CID-MS/MS (Tabela 9). Estes peptídeos foram utilizados para resolver a sequência de estrutura primária parcial de cadeia β através de sobreposição dos aminoácidos (Figura 25). A sequência parcial de cadeia β foi alinhado com a cadeia α de PNL utilizando o software ESPript 3.0 (Gouet et al. 1999), resultando em 97 % de similaridade entre as sequências (Figura 26).

Tabela 9. Peptídeos usados para determinar a sequência parcial de cadeia β de lectina de sementes de *Parkia nitida*. peptídeo identificado como T foi digerido com tripsina. Q foi digerido com quimiotripsina. A letra X na sequência representa resíduos de leucina ou isoleucina, quais não podem ser distinguidas pela massa.

Enzima	Massa molecular	peptídeos
T1	1078.48325	GSGGTHWSYK
T2	1429.80419	ANHGVTEXXXHVK
T3	701.40723	VKDNVK
T4	1445.67469	ASGDXSGETEGGKDPR
T5	787.33486	DPGENEK
T6	899.49778	VVVGFHSR
T7	1301.67686	FKGXAGTFGNYK
T8	863.47531	DGXGXVVK
Q1	1196.58665	LKYHFPTEY
Q2	750.35486	ADYNGVL
Q3	687.42797	VTXRSL
Q4	806.45385	XSFXTNL
Q5	797.39600	TTYGPFL
Q6	715.32898	SRAGYY
Q7	709.36470	EKTVSF
Q8	701.35961	VEXDNL
Q9	813.45966	SXPXQGSL
Q10	752.38577	KSGWYL

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 25. Estrutura primaria parcial de cadeia β . Sobreposição dos peptídeos obtidos pela digestão enzimática. As enzimas utilizadas são diferenciadas pelas cores; verde para tripsina (T) e azul para químiotripsina (Q).

```

SLKGMISVGP WGGSSGTHWS YKANHGVTEI LIHVKDNVKS ISFKDASGDI SGTFGGKDPR ENEKGYEKKI
      |---T1---| |-----T2-----|           |-----T4-----|           |
      |---T3---|           |---T5---|

KIHFPTEYLK SISGSTADYN GVLVTIRSL S FITNLTTYGP FLSFGGGESF SIPIADSVVV GFHSRAGYYL
--Q1---|           |---Q2---| |---Q3---|           |---Q5---|           |---T6---|
      |---Q4---|           |---Q6---|

DALGIFDQPV PEKTVSFGPW GGPAGDDAFN FKVGSWIKDI IİYALAAINS IAFKDANGHC YGKFGGQDPN
      |---Q7---|

DIGVEKKVEI DNLEHFKSIA GTYGNYKGFE VVTSLSFITD VTKHGPFSHA SGTAFSIPF GSLVTGFHGK
      |---Q8---| |---T7---|           |---Q9---|           |

SGWYLDGIGI YVKPRAGQGS IFIAPHGQSG GFPWSYEANE GINAIVİYAG SNIKSPAFRD TSGLNSATQG
Q10-| |---T8---|

GVNPKDFGEK KNTVSILHPS SFLTSTGGQY AQYKFKDIFT TVTGLGFTTN LATFGPFDKI SATSFSQPIH

NNMVAGFHGR AGDYLDAIGI FVKTPDTAVF R

```

Ativar o Windc
 AAAAA Confirmação

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 26. Alinhamento de sequências de aminoácidos da lectina de *Parkia nitida* (PNL) com a cadeia- β de PNL. Caixas vermelhas e branca representam aminoácidos idênticos e não idênticos respectivamente.

```

PNL      1  .SLKGMISVGPWG.GSGGTHWSYKANHGVT.EILIHVKDNVK.SISFKD.ASGDISGTF.GGKDPR.
C.beta   1  .....GSGGTHWSYKANHGVT.EILIHVKDNVK.....ASGDISGTF.GGKDPR.

PNL      61  .ENEGYEKK.IK.IHFPTEY.LKSISGST.ADYNGVLVTIRSL.SFITNLT.TTYGPF.LSFGGGESF.
C.beta   43  .ENEK.....IKY.HFPTEY.....ADYNGVLVTIRSL.SFITNLT.TTYGPF.L.....

PNL      121 .SIPIADS.VVVG.FHSRAGY.LDALGIFDQP.VPEKTVSF.GPWGGPAGDDAF.NFKVGSWIKDI.
C.beta   82  .....VVVG.FHSRAGY.....EKTVSF.....

PNL      181 .IIYALAAINS.IAFKDANGHCY.GKFGGQDP.NDIGVEKK.VEIDNLE.HFKS.IAGTYGNYK.GFE.
C.beta   100 .....VEIDNL..HFKS.IAGTYGNYK...

PNL      241 .VVTSLSFITD.VTKHGPF.SHASGTAF.SIPI.FGSL.VTGFHG.KSGWYLDGIGIYVK.PRAGQGS.
C.beta   118 .....SIPI.QGSL.....KSGWYLDGIGIYVK.....

PNL      301 .IFIAPHGQSGGFPWSY.EANEGINA.IVIYAGS.NIKSPA.FRDT.SGLNSAT.QGGV.NPKDFGEK.
C.beta   301 .....

PNL      361 .KNTVSILHP.SSFLTSIGG.QYAQYKFKD.IFTT.VTGLGFTT.NLAT.FGPFDK.ISAT.SFSQPIH.
C.beta   361 .....

PNL      421 .NNMVAG.FHG.RAGDY.LDAIG.IFVKTPD.TAVFR.
C.beta   421 .....

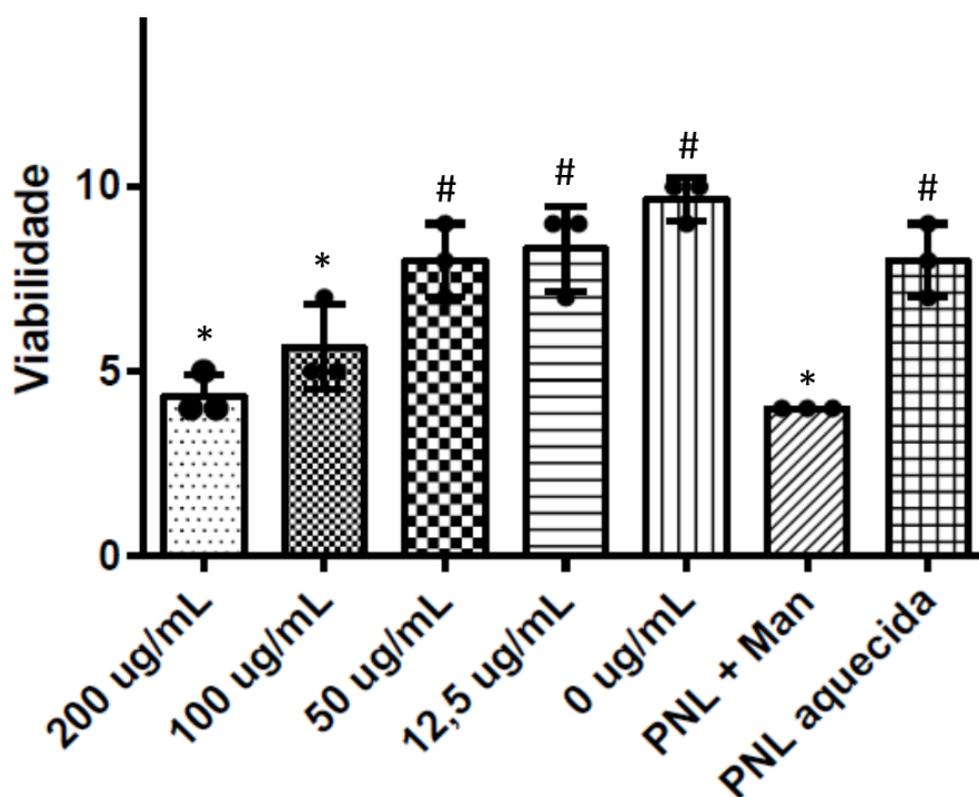
```

Fonte: Elaborada pelo autor.

3.3.6 Teste de toxicidade contra *Artemia sp*

As soluções lectínicas de PNL foram preparadas nas concentrações de 200, 100, 50 e 12,5 µg/ml. Todas as concentrações testadas demonstraram ser tóxicas contra *Artemia sp* causando a letalidade média de 5,7; 4,3; 2 e 1,7 respectivamente. A lectina com CRD bloqueado pelo açúcar manose causou a letalidade média de 6,0 enquanto que a lectina desnaturada por aquecimento a 100 °C por 1h causou a letalidade média de 2,0. Já os poços de controle negativo quais continham apenas água de mar e as *Artemia* apresentaram quase 100% de sobrevivência (Figura 27). O valor de CL₅₀ foi determinado por regressão linear utilizando o programa GraphPad, onde a PNL apresentou um valor de CL₅₀ igual 61,38 µg/mL.

Figura 27. Ensaio de toxicidade contra *Artemia sp*. (A) Efeito tóxico de PNL contra náuplios de *Artemia sp* em diferentes concentrações (200, 100, 50 e 12,5 µg/ml); (B) Controle negativo: poços contendo apenas água do mar e *Artemia sp*. Controle positivo: 200 µg/ml da PNL. Efeito tóxico da PNL (200 µg/ml) previamente incubado com manose 100 mM e PNL (200 µg/ml) desnaturado por aquecimento a 100 °C. *p <0,05 comparado com controle; #p <0,05 comparado com PNL (200 µg/ml).



Fonte: Elaborada pelo autor.

3.4 Discussão

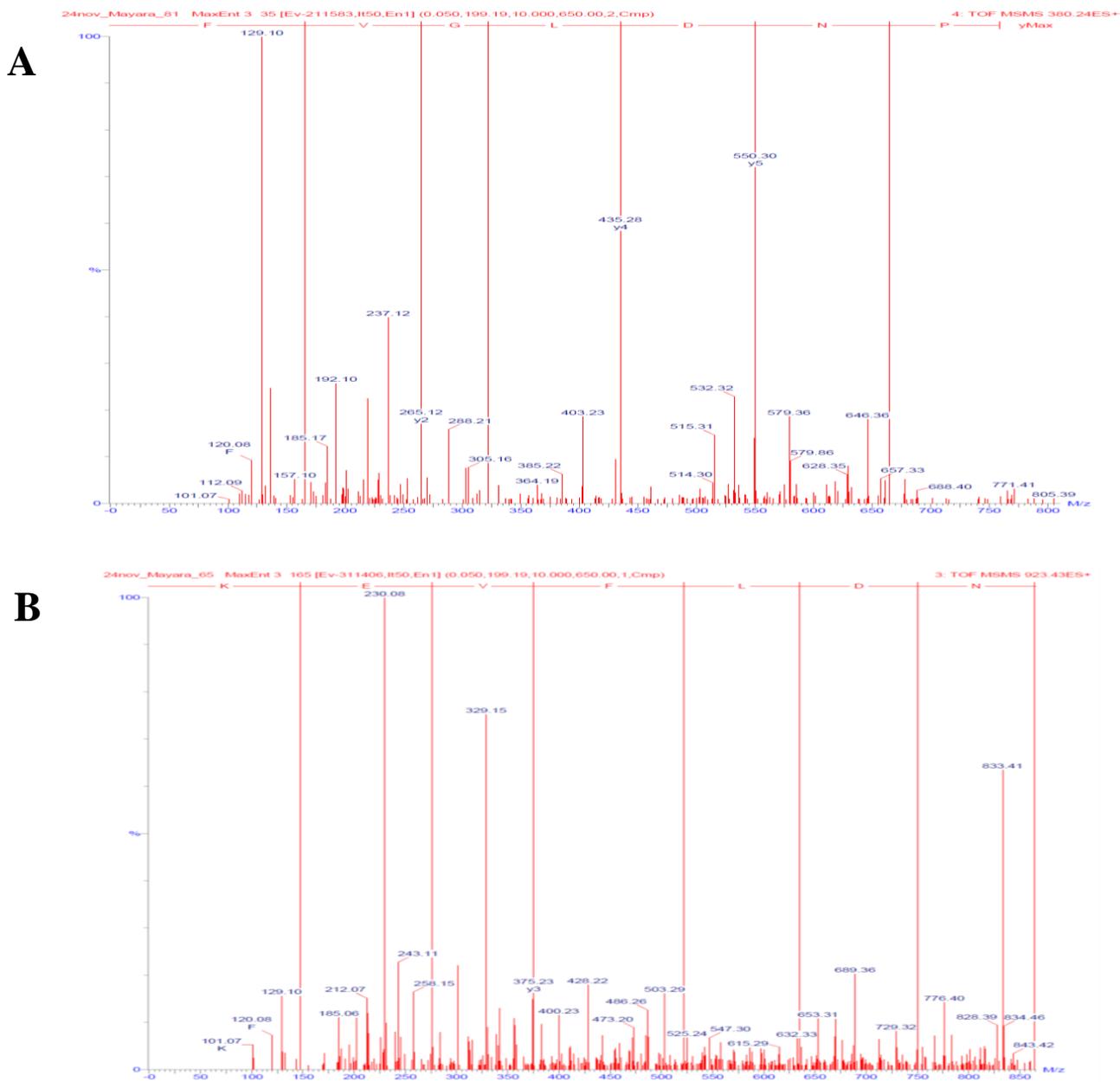
No processo de extração proteica foi observado que o extrato obtido do tampão glicina pH 9,0 extraiu um pouco mais quantidade de proteínas totais em relação a extrato obtido do tampão acetato de sódio pH 4,0, sendo que a atividade hemaglutinante específica foi significativamente maior em tampão acetato de sódio pH 4,0 o que significa dizer que este tampão extrai a nossa proteína de interesse em maior quantidade e por este motivo foi escolhido para realizar fracionamento com sulfato de amônio (Tabela 5), assim como para outras etapas de extração proteica durante todo o resto de processo de isolamento e purificação de lectina. A lectina foi purificada com sucesso em duas etapas de cromatografias, sendo elas de afinidade em (Sepharose 4B-Manose) e de exclusão molecular (BioSuite, UPLC Waters) sucessivamente, entretanto a etapa de exclusão molecular foi usada exclusivamente para separar a cadeia β da cadeia α correspondente a proteína madura denominado de PNL. A PNL apresenta elevada atividade hemaglutinante específica que corresponde a purificação de 1.723 vezes em relação ao extrato bruto. A PNL aglutina preferencialmente eritrócitos de coelho tratados com a enzima proteolítica tripsina, facto já conhecido na literatura que as lectinas do gênero *Parkia* geralmente tem maior preferência em aglutinar este tipo sanguíneo (Carneiro et al. 2021);(Silva et al. 2013); (Cavada, Bari, et al. 2020). A atividade hemaglutinante de PNL foi inibido pelos açúcares D-manose (6,25 mM), D-glicose (25 mM) e suas derivadas. Sendo que, α -metil-D-manosideo (3,125 mM) apresentou menor valor de concentração mínima inibitória o que significa maior potencial inibitório, ou seja, foi açúcar que apresentou maior especificidade com a lectina, sugerindo que um substituinte mais hidrofóbico em C1 deste açúcar permite estabelecer interações adicionais com os resíduos de aminoácidos polares de domínio de reconhecimento a carboidratos (CRD), aumentando assim a interação lectina carboidrato. Resultado semelhante foi obtido em análises de acoplamento (*docking*) molecular entre as lectinas de sementes de *Parkia biglobosa* e *Parkia platycephala* utilizando os mesmos carboidratos (D-manose, D-glicose e α -metil-D-manosideo) (Bari et al. 2016). A preferência de PNL pela manose e as suas derivadas em relação a glicose é um resultado já esperado porque é sugerido na literatura que as lectinas de *Parkia* têm uma preferência pelo grupo hidroxila de C2 que é axial na manose e equatorial na glicose, facto que também pode ser reforçado pelo envolvimento de moléculas de água na interação de alguns resíduos de aminoácidos do CRD da lectina com O2 que também é axial no manose, sendo que esta interação é impossível no O2 Glicose por ser equatorial (Cavada, Bari, et al. 2020) (Gallego Del Sol et al. 2005). A PNL é uma proteína termoestável de igual forma que outras lectinas do gênero *Parkia*, tais como, PBL, PpaL, PPL e PpeL. A PNL consegue manter a sua atividade hemaglutinante acima de

temperatura de 50 °C o ponto no qual foi registrado a atividade máxima, manteve cerca de 12,5% da sua atividade na temperatura de 70 °C e perde totalmente atividade na temperatura de 80°C. O teste do efeito do pH sobre atividade hemaglutinante demonstrou que o pH ótimo desta proteína é entre a faixa de 6,0 e 7,0. Foi observado no teste da influência de íons metálicos sobre atividade hemaglutinante que PNL é uma metaloproteína, pois quando submetida a dialise com agente quelante EDTA ela perdeu cerca de 93% da sua atividade hemaglutinante, sendo que cerca de 50% de atividade hemaglutinante foi recuperada quando os íons Ca^{2+} e Mn^{2+} foram adicionadas ao meio juntos, e quando os íons são adicionadas separadamente apenas 12,5 % de atividade é recuperada em cada, o que significa dizer que a PNL é o metaloproteína e para ser mais efetivo na sua atividade hemaglutinante ela necessita dos dois íons metálico. Já o PpaL diferentemente de PNL ela demonstrou ser mais dependente de Mn^{2+} do que Ca^{2+} ou os dois juntos (Cavada, Bari, et al. 2020). Por outro lado, a atividade hemaglutinante de PBL não é afetado pelo dialise com EDTA (Silva et al. 2013). Podemos perceber aqui, que as três proteínas do mesmo gênero com alta similaridade estrutural apresentam perfis diferentes no que diz respeito a dependência de íons metálicos para atividade hemaglutinante. Sabe-se que as atividades biológicas das lectinas normalmente são mediadas pela interação entre CDR e carboidratos, neste sentido são necessários mais estudos sobre a interação e a importância de íons metálicos nas atividades biológicas de lectinas da *Parkia*. No gel SDS-PAGE, o PII apresentou um perfil eletroforético de três bandas com pesos moleculares aparentes de 50, 35 e 20 kDa. As bandas de 35 e 20 kDa provavelmente correspondem aos fragmentos das cadeias beta (β) e gama (γ) gerados através do processamento pós traducional e que juntas constituem a cadeia alfa (α) correspondente a proteína madura, fato que pretendemos provar mais a frente pelos estudos da estrutura primária. Entretanto, foi possível separar a cadeia α dos fragmentos β e γ através da cromatografia de exclusão molecular, onde foi obtido dois picos; AI, AII. Sendo que AI e AII apresentaram um perfil eletroforético de uma única banda com pesos moleculares aparentes correspondente as cadeias α e β respectivamente. Pelo facto de concentração de cadeia- γ ser muito baixa não foi possível ser excisado do gel em quantidades suficientes para realizar digestão enzimática e análises da espectrometria de massas. As cadeias α e β apresentaram atividades hemaglutinante. Sabe-se que a estrutura tridimensional das lectinas do gênero *parkia* são constituídos por três domínio β -prisma, onde cada domínio possui um sítio de reconhecimento a carboidrato independente. Baseando nisso construímos a hipótese de que a cadeia- β de PNL é formada pela soma de dois domínios β -prisma, portanto possui dois sítios de reconhecimento a carboidrato independentes, ou seja, é um hololectina, sendo assim possível aglutinar eritrócitos sanguíneos. As lectinas puras do gênero *Parkia* em gel de eletroforese SDS-

PAGE geralmente apresentam perfis muito heterogêneo, que vai desde uma banda - *parkia biglobosa* (Silva et al. 2013), duas bandas - *Parkia javanica* (Utarabhand and Akkayanont 1995), três bandas - *Parkia speciosa* (Suvachittanont and Peutpaiboon 1992) e quatro bandas - *Parkia roxburghii* (Kaur et al. 2005). Sendo que as múltiplas bandas não são geradas pela quebra de pontes de dissulfeto através da redução dos enxofres do resíduo da cisteína. Esta afirmação é justificada pelo facto de que os perfis de múltiplas bandas existem tanto na presença como na ausência de agentes redutores como β -mercaptoetanol e corroboram com os dados de estudo da estrutura primaria das *P. biglobosa*, *P. platycephala*, *Parkia pendula* e *P. nítida* (neste trabalho), que demonstram a existência de apenas um único resíduo de cisteína nas estruturas primarias destas proteínas, fato que torna impossível a formação de ponte de dissulfeto. Entretanto, quando uma lectina pura apresenta múltiplas bandas no gel de eletroforese é um indicio de que ela sofre algum tipo de processamento pós traducional como no caso das lectinas do tipo ConA (Moreira and Gavada 1984) que por além de cadeia principal (α), elas possuem outras cadeias menores, denominadas de cadeia- β e cadeia- γ respectivamente. Pelas observações e justificativas colocados acima estamos propondo neste trabalho pela primeira vez a hipóteses de que as lectinas do gênero *Parkia* sofrem algum tipo de processamento pós traducional. A nossa hipótese é justificada pela elevada identidade encontradas no alinhamento das sequencias dos aminoácidos que compõem as estruturas primarias das cadeias α e β da PNL. A massa molecular aparente de PNL obtido no gel SDS-PAGE corrobora com o valor da massa molecular intacta determinada pela espectrometria de massas que foi igual a 48760,3008 Da. Este valor de massa de proteína intacta é próximo ao valor da massa calculada pela soma de todos os resíduos dos aminoácidos obtidos na sequencia primaria que é igual a 48176,2994 Da, restando uma diferença de 584,0014 Da. Esta diferença provavelmente pertence aos poucos resíduos de aminoácidos de N-terminal bloqueado que normalmente não são encontrados quando a sequênciã primaria das lectinas do gênero *Parkia* são determinadas pela espectrometria de massas. Segundo o Mann e colaboradores (2001) a PPL contem N-terminal bloqueado por acetilação de certos resíduos de aminoácidos e dependendo do tamanho de grupo de bloqueio este fragmento pode conter de 3 a 5 resíduos de aminoácidos. Entretanto este fragmento geralmente não é encontrado por ser muito hidrofóbico para ser eluido na coluna de fase reversa (Mann et al. 2001). A massa molecular média calculada de 443 resíduos de aminoácido de PBL é 47236 Da, o qual é 326 Da menor da massa molecular intacta determinada pela espectrometria de massas, a diferença de valor é corresponde aos resíduos dos aminoácidos Ser-Leu-Lys quais não foram encontrados na sequênciã de estrutura primaria (Silva et al. 2013).

A estrutura primária de PNL determinada pela sobreposição dos peptídeos obtidos através da digestão proteolítica, consiste em total de 451 resíduos de aminoácidos. Existe uma pequena diferença no comprimento das sequências de estrutura primária entre as lectinas do gênero *Parkia* (PPL: 447aa/47951 Da; PBL: 443aa/47562 Da; PpeL: 447aa/474100 Da e PNL: 451aa/48760 Da) o que reflete nas suas diferenças de massa molecular intacta e também provavelmente na quantidade dos aminoácidos que constituem N-terminal bloqueado. Estudos estruturais de PPL, PpaL, PBL e PpeL demonstraram que as lectinas deste gênero são constituídas de múltiplas isoformas. Desta forma, foram encontradas doze sequências heterogêneas na estrutura primária de PNL nas posições 69 (H/K), 70 (R/X), 92 (V/X), 96 (Y/X), 152 (T/E), 213 (G/F), 215 (F/E), 294 (K/P), 295 (L/R), 264 (P/D), 298 (Y/X) e 300 (T/E). O espectro de MS/MS de duas isoformas dos peptídeos P5 e T9 pertencentes ao íon Y mostra as substituições dos aminoácidos G/F e F/E nas posições 213 e 215 respectivamente (figura 28 A e B). Dentre todas as lectinas de *Parkia*, a PPL foi a que apresentou menos substituição dos aminoácidos, sendo encontradas sequências heterogêneas apenas em três posições e todas são substituições conservadas. As lectinas do gênero *Parkia* são relacionadas a lectinas do tipo jacalina ligantes a manose devido às semelhanças que apresentam na estrutura primária e terciária (Mann et al. 2001). Foi realizado alinhamento da estrutura primária de PNL com PBL e PPL, mostrando que existe alta similaridade de sequência dos aminoácidos entre elas. Um resíduo de cisteína foi encontrado na posição 199 de sequência primária de PNL, este resíduo está conservado em PBL, PpaL, PPL, PpeL e também nas outras lectinas relacionadas a jacalina, como por exemplo, a lectina isolada do tubérculo *Helianthus tuberosus* denominada de heltuba (Bourne et al. 1999). A PNL não é uma glicoproteína, pois não reagiu a teste de fenol-ácido sulfúrico, apesar de ser encontrado um sítio de N-glicosilação nas posições 104-106. Foram encontrados três sítios de glicosilação em PpeL e dois em PPL e PBL, sendo que nenhuma delas também é glicosilada. Por outro lado, as lectinas de *Parkia biglandulosa*, *Parkia roxburghii* (Kaur et al. 2005) e *Parkia javanica* (Utarabhand and Akkayanont 1995) são glicosiladas. Esta característica ainda precisa ser mais estudada a fim de entender porque nem todas as lectinas de *Parkia* são glicosiladas apesar de apresentarem sítios de glicosilação nas suas estruturas primárias, visto que a glicosilação possui importância funcional para as proteínas, podendo conferir estabilidade, heterogeneidade e maior solubilidade às moléculas glicosiladas, sendo também essenciais para adesão e sinalização celular.

Figura 28. Peptídeos da estrutura primária de PNL. Duas isoformas dos peptídeos P5 e T9 obtidas através da técnica de dissociação induzida por colisão. **(A)** íon de serie Y com m/Z 760.37560 e sequencia especifica interpretada como PNDLGVF. **(B)** íon de serie Y com m/Z 863.43893 e sequencia especifica interpretada como NDLFVEK.

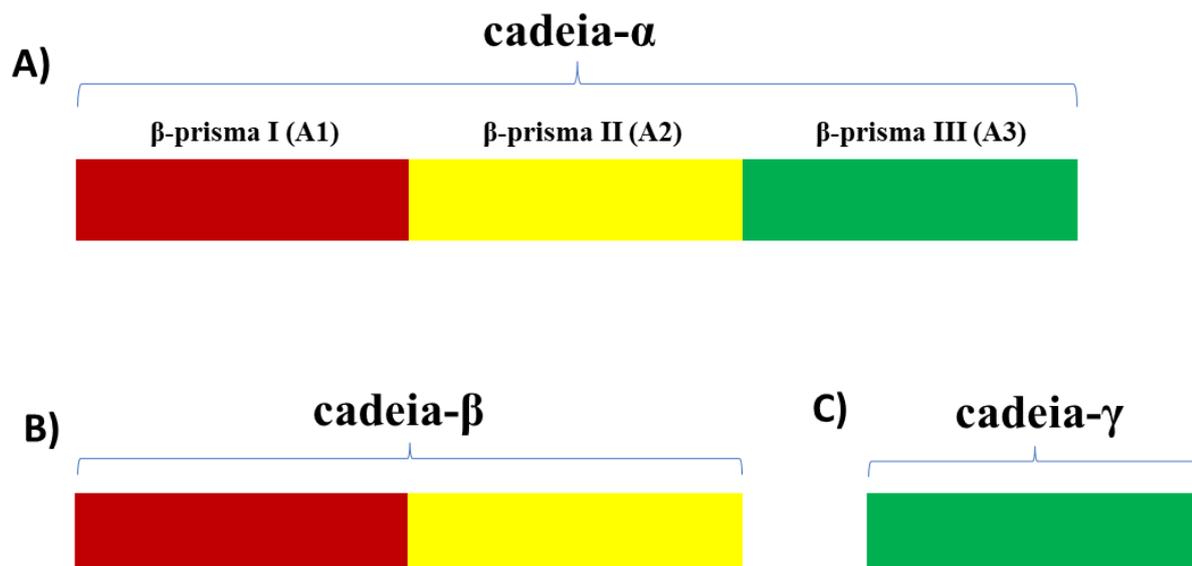


A estrutura primária parcial de cadeia- β foi resolvido manualmente através da interpretação dos espectros obtidos das análises de espectrometria de massas. Neste processo foram obtidos 18 peptídeos provenientes de diferentes digestões enzimática (8 de tripsina e 10 de quimiotripsina) resultando no total de 138 resíduos de aminoácidos. A soma de todos os aminoácidos que constituem a sequência parcial resultou em peso molecular de 15 kDa. Este valor equivale a cobertura de 43 % de peso molecular aparente determinado pela eletroforese SDS-PAGE que é igual a 35 kDa. As lectinas purificadas a partir de sementes de *Parkia* com a exceção de PPL-2 que é uma quimerolectina específico a quitina (*N*-acetil-glicosamina) purificada de sementes de *Parkia platycephala*, são constituídos estruturalmente por três domínios β -prisma, onde cada domínio é constituído por aproximadamente 150 resíduos de aminoácidos e cada domínio apresenta alta identidade com as lectinas relacionados a jacalina específicos a manose (Mann et al. 2001). No entanto, se somamos os pesos moleculares de dois domínios β -prisma baseado em quantidade estimado dos seus resíduos dos aminoácidos obteremos um valor que corrobora com o peso molecular aparente da cadeia β de PNL determinado por SDS-PAGE, o que nos leva a sugerir que a cadeia- β é formado pela soma de dois domínio β -prisma. Neste caso domínio 1 e 2 como podemos observar através da sobreposição dos peptídeos de cadeia β com a estrutura primária de PNL (Figura 25 e 29). A sequência parcial de cadeia- β foi alinhada com a estrutura primária de PNL utilizando o software ESPript 3.0. Onde foi observado 97 % de similaridade entre as sequências, indicando alta homologia entre os dois polipeptídeos (Figura 26). A alta homologia entre estes dois polipeptídeos confirma o fato de que a cadeia- β é um fragmento da proteína madura, possivelmente gerado juntamente com a cadeia- γ no processamento pós traducional, e pelo fato de cadeia- β possuir dois sítios de ligação a carboidratos, ela aglutina eritrócitos, já a cadeia- γ que possui apenas um sítio de ligação a carboidratos, por isso, ela não aglutina eritrócitos. Sequências heterogêneas foram encontrados nas posições 54 (F/E), 228 (S/G), 233 (Y/F) e 270 (F/Q), confirmando o fato de que a PNL é constituída de misturas de isoformas.

O processamento pós traducional é a modificação química de uma cadeia proteica depois de sua tradução. Este evento é frequente na biossíntese de proteínas, sendo processos com mecanismos distintos dependendo da proteína. Algumas dessas modificações podem aumentar o conjunto de possíveis funções ou direcionamento das proteínas, através de adição de novos grupos funcionais ou de cadeias de carboidratos e/ou lipídios. Análise de sequência do clone de cDNA (LECMornigaM1) que codifica MornigaM (lectina específica a manose relacionado a jacalina, purificada de caule de árvore *Black mulberry*) revelou que o processamento pós traducional desta lectina é baseado na remoção de um peptídeo curto com

apenas sete resíduos de aminoácidos em N-terminal de pró-proteína. E pelo fato de não ser encontrado nenhum peptídeo sinal na sequência de LECMornigaM, foi sugerido que a MornigaM é sintetizada em polissomos livres, da mesma forma que as outras lectinas relacionadas a jacalina (Van Damme et al. 2002). As lectinas pertencentes às espécies da subtribo *Diocleinae* sofrem um tipo de processamento pós-traducional denominado de permutação circular. Esta denominação é devido a transposição das cadeias β e γ que são religados em uma ordem inversa para formar cadeia α madura no final de processo de biossíntese. Acredita-se que o significado biológico deste processamento está relacionado à não interação da pré-proteína com carboidratos indesejados do reticulo endoplasmático, local de sua síntese (Damme et al. 1998). Baseando nos dados coletado a partir das caracterizações físico-química, sobre tudo gel de eletroforese e da estrutura primaria, criamos a hipóteses de possível ocorrência de processamento pós-traducional para a lectina de sementes de *Parkia nitida*, o qual resulta em uma cadeia α madura e fragmentos de cadeias β e γ , como foi observado nos perfis eletroforético do PII obtido na cromatografia de afinidade, do AI e AII obtidos na cromatografia de exclusão molecular. Ressaltamos que apesar de sugerirmos a existência de processamento pós-traducional para esta lectina, ainda não sabemos os mecanismos e nem as organelas que estão envolvidas no processo de biossíntese. Entretanto, pretendemos dar continuidade deste estudo fazendo uso de ferramentas de biologia molecular e bioinformática, afim de elucidar os mecanismos de processo, assim como realizar caracterização estrutural completa de cadeia- β juntamente com a sua caracterizações físico-químicas, tais como: efeitos de temperatura, pH, dependência de íons metálico na atividade hemaglutinante e entre outros testes.

Figura 29. Fragmentos de PNL. (A) Cadeia- α : composta por domínios β -prisma I, II e III. (B) Cadeia- β : composta por domínios β -prisma I e II. (C) Cadeia- γ : composta apenas por domínios β -prisma I.



Fonte: Elaborada pelo autor.

A PNL demonstrou ser uma proteína tóxica contra *Artemia sp*, apresentando valor de CL_{50} igual a 61,38 $\mu\text{g/mL}$. No entanto, se comparamos este valor com a CL_{50} de PpaL que é igual a 20 $\mu\text{g/mL}$, podemos concluir que a toxicidade de PNL é relativamente baixa, ou seja, PpaL é mais efetivo em causar letalidade nas *Artemia sp*. A PNL em doses de 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram diferenças estatísticas significantes em relação ao controle. Não houve diferença estatísticas na redução de letalidade das *Artemia sp* quando comparamos a dose máxima de PNL (200 $\mu\text{g/mL}$) com a PNL inibido com a manose, por outro lado, foi observado uma diferença significativa na letalidade quando a PNL desnaturada por aquecimento é comparada com a dose máxima de PNL, sugerindo que a toxicidade de PNL não está totalmente relacionada com CRD da lectina, porém, ela é dependente da conformação nativa da proteína. As doses menores (50 e 12,5 $\mu\text{g/mL}$) não apresentaram diferenças em relação ao controle, indicando que a toxicidade de PNL contra *Artemia sp* é dose dependente. Diferente de PNL a toxicidade de PpaL é mediada por CRD e também dependente da conformação nativa da proteína (Cavada, Bari, et al. 2020). Uma possível explicação para a diferença no grau de toxicidade entre PpaL e PNL pode estar relacionada com a diferença na topologia dos sítios de ligação destas lectinas que pode influenciar na capacidade de reconhecimento e interação com carboidratos mais

complexos que estão expostos nas superfícies celulares dos microrganismos. Em estudo feito por Santos e colaboradores 2009, onde avaliaram efeitos tóxicos de diferentes lectinas de leguminosas [*Canavalia brasiliensis* (ConBr), *Cratylia floribunda* (CFL), *Dioclea virgata* (Dvir), *Dioclea guianensis* (Dgui), *Dioclea grandiflora* (DGL)] específicos a glicose/manose contra *Biomphalaria glabrata* e *Artemia salina*, constataram que Apesar destas lectinas compartilharem especificidade de ligação a monossacarídeo comum e apresentarem semelhanças bioquímicas e estruturais, as suas atividades tóxicas são diferentes. Ainda, segundo o autor os estudos estruturais anteriores revelaram diferenças significativas nas atividades biológicas de Dgui e DGL, explicada pelo equilíbrio dímero-tetrâmero dependente do pH que ocorre devido a um resíduo de Histidina presente na estrutura primária de DGL (Santos et al. 2010). O mecanismo de ação da toxicidade das lectinas contra *Artemia sp* ainda não é elucidada. Outras atividades biológicas distintas das lectinas do gênero *Parkia* foram relatados na literatura, tais como: antiproliferativas e mitogênicas (Kaur et al. 2005), antinociceptiva e antiinflamatória (Bari et al. 2016) e potencialização de atividade dos antibióticos contra cepas bacterianas multirresistentes e inibição do desenvolvimento de *Haemonchus contortus* (Silva et al. 2019). Estas características fazem das lectinas uma boa alternativa como biofarmacos para tratamento de diversos tipos de doenças, e por serem proteínas, podem causar menos danos colaterais comparando com os medicamentos convencionais feitos a bases de compostos químicos que são muito mais agressivos aos organismos humanos.

3.5 Conclusões

Neste trabalho foi possível purificar e caracterizar uma nova lectina de sementes de *Parkia nitida* específica a manose/glicose denominada de PNL. A PNL é uma metaloproteína, termoestável não glicosilada com peso molecular de 48760,3008 Da e de forma semelhante a outras lectinas de *Parkia*, em solução comporta-se como um dímero composta por duas subunidades iguais. O pH ótimo de reação da PNL é entre faixa de 6,0 e 7,0. A PNL demonstrou se tóxica contra *Artemia sp*. A lectina purificada de sementes de *Parkia panurensis* também apresentou este efeito biológico. Os dados obtidos da estrutura primária da PNL juntamente com o gel de eletroforese (SDS-PAGE), sugerem que as lectinas de gênero *Parkia*, sofrem algum tipo de processamento pós-traducional. Entretanto, estudos adicionais ainda são necessários a fim de elucidar os mecanismos, as organelas que participam e sobretudo a importância e a função biológica deste processamento pós traducional.

REFERÊNCIAS

- BARI, A. U. *et al.* Lectins from *Parkia Biglobosa* and *Parkia Platycephala*: A Comparative Study of Structure and Biological Effects. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, 2016.
- BARI, A. U. *et al.* Purification and Partial Characterization of a New Mannose/Glucose-Specific Lectin from *Dialium Guineense* Willd Seeds That Exhibits Toxic Effect. **Journal of Molecular Recognition**, v. 26, n. 8, 2013.
- BOURNE, Yves. *Helianthus Tuberosus* Lectin Reveals a Widespread Scaffold for Mannose- Binding Lectins. **Structure**, v. 7, n. 12, p. 1473–82, 1999.
- BRADFORD, Marion 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. 248–54, 1976.
- BUCHAN, Daniel W. A.; JONES, David T. The PSIPRED Protein Analysis Workbench: 20 Years On. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. W1, p. W402–7, 2019.
- CARNEIRO, Romulo F. *et al.* Elucidation of the Primary Structure and Molecular Modeling of *Parkia Pendula* Lectin and in Vitro Evaluation of the Leishmanicidal Activity. **Process Biochemistry**, v. 101, p. 1–10, jun. 2020.
- CARRIZO, Maria E. *et al.* The Antineoplastic Lectin of the Common Edible Mushroom (*Agaricus Bisporus*) Has Two Binding Sites, Each Specific for a Different Configuration at a Single Epimeric Hydroxyl. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 11, p. 10614–23, 2005.
- CAVADA, B. S. *et al.* Isolation and Partial Characterization of a Lectin from *Parkia Platycephala* Benth Seeds. **Physiol. Mol. Biol. Plants**, v. 3, p. 109–15, 1997.
- CAVADA, Benildo S. *et al.* Crystallization and Preliminary X-Ray Diffraction Analysis of a New Chitin-Binding Protein from *Parkia Platycephala* Seeds. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications**, v. 61, n. 9, p. 841–43, 2005.
- CAVADA, Benildo S. *et al.* **Purification, Chemical, and Immunochemical Properties of a New Lectin from Mimosoideae (*Parkia Discolor*)**, 2020.
- CAVADA, Benildo Sousa *et al.* Purification and Partial Characterization of a New Lectin from *Parkia Panurensis* Benth. Ex H.C. Hopkins Seeds (Leguminosae Family; Mimosoideae Subfamily) and Evaluation of Its Biological Effects. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 145, p. 845–55, 2020.
- CAVADA, Benildo Sousa *et al.* Reviewing Mimosoideae Lectins: A Group of under Explored Legume Lectins. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 154, p. 159–65, 2020.
- DAMME, Els J. M. Van *et al.* Two Distinct Jacalin-Related Lectins with a Different

Specificity and Subcellular Location Are Major Vegetative Storage Proteins in the Bark of the Black Mulberry Tree, **Plant Physiology**, v. 130, n. 2, p. 757–69, 2002.

DAMME, Els J. M. Van *et al.* Plant Lectins: A Composite of Several Distinct Families of Structurally and Evolutionary Related Proteins with Diverse Biological Roles. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 17, n. 6, p. 575–692, 1998.

DEBRAY, Henri *et al.* Specificity of Twelve Lectins towards Oligosaccharides and Glycopeptides Related to N-glycosylproteins. **European Journal of Biochemistry**, v. 117, n. 1, p. 41–51, 1981.

DUBOIS, Michel *et al.* Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–56, 1956.

FAVACHO, Alexandra R. M. *et al.* In Vitro Activity Evaluation of Parkia Pendula Seed Lectin against Human Cytomegalovirus and Herpes Virus 6. **Biologicals**, v. 35, n. 3, p. 189–94, 2007.

FERRIGE, A. G. *et al.* Disentangling Electrospray Spectra with Maximum Entropy. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 6, n. 11, p. 707–11, 1992.

GALLEGO DEL SOL, Francisca *et al.* The First Crystal Structure of a Mimosoideae Lectin Reveals a Novel Quaternary Arrangement of a Widespread Domain. **Journal of Molecular Biology**, v. 353, n. 3, p. 574–83, 2005.

GOLDSTEIN, Irwin J. *et al.* What Should Be Called a Lectin?. **Nature**, v. 285, n. 5760, p. 66, 1980.

GORELİK, Elieser; GALILI, Uri; RAZ, Avraham Raz. On the Role of Cell Surface Carbohydrates and Their Binding Proteins (Lectins) in Tumor Metastasis. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 20, n. 3–4, p. 245–77, 2001.

GOUET, Patrice *et al.* ESPript: Analysis of Multiple Sequence Alignments in PostScript. **Bioinformatics**, v. 15, n. 4, p. 305–8, 1999.

GUIMARÃES, Beatriz G. *et al.* Plant Pathogenic Bacteria Utilize Biofilm Growth-Associated Repressor (BigR), a Novel Winged-Helix Redox Switch, to Control Hydrogen Sulfide Detoxification under Hypoxia. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 29, p. 26148–57, 2011.

HASHIM, Onn Haji; SHUIB, A. S.; CHUA, C. T. Chua. The Interaction of Selective Plant Lectins with Neuraminidase-Treated and Untreated IgA1 from the Sera of IgA Nephropathy Patients. **Immunological Investigations**, v. 30, n. 1, p. 21–31, 2001.

HIROTA, Beatriz Cristina Konopatzki *et al.* AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE IN VITRO: APLICABILIDADE DO ENSAIO DE LETALIDADE FRENTE À *Artemia Salina*. **Visão Acadêmica**, v. 13, n. 2, p. 42–48, 2012.

JEYAPRAKASH, A. Arockia *et al.* Crystal Structure of the Jacalin-T-Antigen Complex and a Comparative Study of Lectin-T-Antigen Complexes. **Journal of Molecular**

Biology, v. 321, n. 4, p. 637–45, 2002.

JONES, David T. Protein Secondary Structure Prediction Based on Position-Specific Scoring Matrices. **Journal of Molecular Biology**, v. 292, n. 2, p. 195–202, 1999.

KAUR, Navjot, *et al.* Two Novel Lectins from *Parkia Biglandulosa* and *Parkia Roxburghii*: Isolation, Physicochemical Characterization, Mitogenicity and Anti-Proliferative Activity. **Protein & Peptide Letters**, v. 12, n. 6, p. 589–95, 2005.

KOMATH, Sneha Sudha; KAVITHA, Mannem, and SWAMY, Musti J.. Beyond Carbohydrate Binding: New Directions in Plant Lectin Research. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 4, n. 6, p. 973–88, 2006.

LAEMMLI, U. K. © 1970 Nature Publishing Group. **Nature**, v. 228, p. 227–31, 17 out. 2017.

LAFONT, Virginie *et al.* The Lectin Jacalin Specifically Triggers Cell Signaling in CD4+ T Lymphocytes. **Cellular Immunology**, n. 181, v. 1, p. 23–29, 1997.

LAKSHMI TAMMA, Seetha M. *et al.* HIV-1 Gp120 Blocks Jacalin-Induced Proliferative Response in CD4+ T Cells: Jacalin as a Useful Surrogate Marker for Qualitative and Quantitative Deficiency of CD4+ T Cells in HIV-1 Infection. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v. 80, n. 3 II, p. 290–97, 1996.

LORIS, Remy *et al.* Structural Basis of Oligomannose Recognition by the *Pterocarpus Angolensis* Seed Lectin. **Journal of Molecular Biology**, v. 335, n. 5, p. 1227–40, 2004.

LOSSIO, Claudia F. *et al.* Lectin from *Canavalia Villosa* Seeds: A Glucose/Mannose-Specific Protein and a New Tool for Inflammation Studies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 105, p. 272–80, 2017.

MANN, Karlheinz *et al.* The Amino-Acid Sequence of the Glucose/Mannose-Specific Lectin Isolated from *Parkia Platycephala* Seeds Reveals Three Tandemly Arranged Jacalin-Related Domains. **European Journal of Biochemistry**, v. 268 n. 16, p. 4414–22, 2001.

MOREIRA, R. A. *et al.* Plant Lectins, Chemical and Biological Aspects. **Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, n. 2, p. 211–18, 1991.

MOREIRA, R. A.; GAVADA, B. S.. Lectin From *Canavalia Brasiliensis* (MART.). Isolation, Characterization and Behavior during Germination. **Biologia Plantarum**, v. 26, n. 2, p. 113, 1984.

VAN PARIJS, Jan *et al.* Hevein: An Antifungal Protein from Rubber-Tree (*Hevea Brasiliensis*) Latex. **Planta**, v. 183, n. 2, p. 258–64, 1991.

PEUMANS, Willy J.; VAN DAMME, E. I. S. J. M. Lectins as Plant Defense Proteins. **Archives of Microbiology**, n. 1995, p. 347–52, 1994.

RAMOS, Marcio V. *et al.* Further Characterization of the Glycan-Binding Specificity of

the Seed Lectin from *Vatairea Macrocarpa* and Its Dependence of PH. **Protein and Peptide Letters**, v. 7, n. 4, p. 241–48, 2000.

RAMOS, Márcio V. Isolation and Partial Characterisation of Highly Toxic Lectins from *Abrus Pulchellus* Seeds. **Toxicon**, v. 36, n. 3, p. 477–84, 1998.

RAMOS, Márcio Viana. Interaction of Lectins from the Sub Tribe Diocleinae with Specific Ligands. **R. Bras. Fisiol. Veg.** n. 8, p. 193–99, 1996.

RAVAL, Sujana. 2004. A Database Analysis of Jacalin-like Lectins: Sequence-Structure-Function Relationships. **Glycobiology**, v. 14, n. 12, p. 1247–63, 2004.

ROCHE, Philippe *et al.* 1991. Molecular Basis of Symbiotic Host Specificity in *Rhizobium Meliloti*: NodH and NodPQ Genes Encode the Sulfation of Lipo-Oligosaccharide Signals. **Cell**, v. 67, n. 6, p. 1131–43, 1991.

SANTOS, Aldenir Feitosa dos. Toxicity of Some Glucose/Mannose-Binding Lectins to *Biomphalaria Glabrata* and *Artemia Salina*. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 2, p. 794–98, 2010.

SHARON, Nathan; LIS, Halina. Legume Lectins--a Large Family of Homologous Proteins. **The FASEB Journal**, v. 4, n. 14, p. 3198–3208, 1990.

SHEVCHENKO, Andrej *et al.* 2006. In-Gel Digestion for Mass Spectrometric Characterization of Proteins and Proteomes. **Nature Protocols**, v. 1, n. 6, 2006..

SILVA, H. C. *et al.* Purification and Primary Structure of a Mannose/Glucose-Binding Lectin from *Parkia Biglobosa* Jacq. Seeds with Antinociceptive and Anti-Inflammatory Properties. **journal of molecular recognition**, v. 26, n. 10, 2013.

SILVA, Romerio R. S *et al.* 2019. *Parkia Platycephala* Lectin Enhances the Antibiotic Activity against Multi-Resistant Bacterial Strains and Inhibits the Development of *Haemonchus Contortus*. **Microbial Pathogenesis**, v. 135, jul. 2019.

SREEVIDYA, V. S. *et al.* Expression of the Legume Symbiotic Lectin Genes Psl and Gs52 Promotes Rhizobial Colonization of Roots in Rice. **Plant Science**, v. 169, n. 4, p. 726–36, 2005.

SRINIVAS, V. R. *et al.* Legume Lectin Family, the ‘Natural Mutants of the Quaternary State’, Provide Insights into the Relationship between Protein Stability and Oligomerization. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1527, n. 3, p. 102–11, 2001.

SUVACHITTANONT, Wallie; PEUTPAIBOON, Areeruk. Lectin from *Parkia Speciosa* Seeds. **Phytochemistry**, v. 31. n. 12, p. 4065–70, 1992.

UTARABHAND, Prapaporn; AKKAYANONT, Paitoon. Purification of a Lectin from *Parkia Javanica* Beans. **Phytochemistry**, v. 38, n. 2, p. 281–85, 1995.

WONG, Jack Ho; NG.; T. B. Isolation and Characterization of a Glucose/Mannose-

Specific Lectin with Stimulatory Effect on Nitric Oxide Production by Macrophages from the Emperor Banana. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 38, n. 2, p. 234–43, 2006.

YAN, Qiaojuan *et al.* A Novel Homodimeric Lectin from Astragalus Mongholicus with Antifungal Activity. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 442, n. 1, p. 72–81, 2005.