



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR

BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

FRANCISCO PATRICK FERREIRA DA SILVA

**OTIMIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA
FRUTALINA RECOMBINANTE (rFTL) ATIVA EM *Komagataella phaffii***

FORTALEZA

2026

FRANCISCO PATRICK FERREIRA DA SILVA

OTIMIZAÇÃO DO PROTOCOLO EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA
FRUTALINA RECOMBINANTE (rFTL) ATIVA EM *Komagataella phaffii*

Trabalho de conclusão de curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Biotecnologia do Centro de Ciências da
Universidade Federal do Ceará, como
requisito parcial à obtenção do grau de
Bacharelado em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Anderson
Matias da Rocha

Coorientadora: Dra. Talita Abrante Leite

FORTALEZA

2026

FRANCISCO PATRICK FERREIRA DA SILVA

OTIMIZAÇÃO DO PROTOCOLO EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA
FRUTALINA RECOMBINANTE (rFTL) ATIVA EM *Komagataella phaffii*

Trabalho de conclusão de curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Biotecnologia do Centro de Ciências da
Universidade Federal do Ceará, como
requisito parcial à obtenção do grau de
Bacharelado em Biotecnologia.

Orientador Pedagógico: Prof. Dr. Bruno
Anderson Matias da Rocha

Orientadora Técnico-Científico: Dra. Talita
Abrante Leite

Aprovado em: 24/06/2026

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Talita Abrante Leite
Biomanguinhos (FIOCRUZ-CE)

Dra. Roberta Cristiane Cavalcante Costa
Bioclone Produção de Mudas Ltda.

A minha família,
Aos meus pais por sempre me apoiarem,
Aos amigos incríveis que conheci pelo
caminho,
Ao meu namorado maravilhoso,
A mim mesmo, por sempre acreditar no
poder da educação.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço aos meus pais, Lucineide e Damião, por sempre acreditarem que meu lugar era na universidade, o apoio de vocês foi fundamental para que eu nunca desistisse de buscar um futuro melhor. Agradeço, especialmente, a minha mãe, por ser meu maior exemplo de pessoa nessa vida. Sou o que sou hoje por você, mãe, e pra sempre serei grato.

Agradeço também a toda a minha família, minha irmã, Paloma, por ser sempre um exemplo a seguir, minha tia, Patricia, por ser como uma segunda mãe para mim e tão especial quanto.

Agradeço amorosamente meu companheiro de vida, Daniel, que me proporcionou os melhores momentos que já vivi. Ter você ao meu lado me ajudou muito a manter minha calma e paz de espírito, pois com você a vida é bem mais leve, calma, sorridente e engraçada. Eu te amo muito e desejo que o nosso futuro juntos seja imensamente feliz, meu amor.

Aos meus amigos queridos e especial de vida, Vinícius, André, Júlia, Sara e Ariane, por sempre vibrarem com minhas vitórias, por me acompanharem na minha jornada de vida desde o ensino fundamental. Considero vocês mais do que amigos, mas sim irmãos de coração. Espero acompanhar suas conquistas e ver vocês vencendo todos os dias.

A todos os meus amigos de curso, mas especialmente, Ellen, Matheus, Elayne, Joyce e Sara, por terem tornado essa jornada acadêmica mais divertida. Pra mim foi uma honra aprender com vocês todos os dias, compartilhar angústias, risadas, lágrimas e nervosismos. Espero continuar tendo vocês daqui em diante, e torço muito e tenho pleno conhecimento do potencial de vocês, sei que vão longe e conquistar tudo o que desejam. Eterna Turma do Balão.

Aos amigos que fiz no Biolab, Vini, Júlia, Charlie, Michel, Teresa, Ferbia, Lívia, Rita, Natália e Rebeca, por serem a melhor equipe de monitores de todos os tempos! Aprendi muito com cada um e guardarei nossos momentos pra sempre comigo. Também agradeço a professora Marina por ser uma excelente orientadora de projeto e pelos ensinamentos incríveis durante a monitoria.

Agradeço também a toda a equipe do Grupo de Biotecnologia Molecular e Estrutural (GBME), local onde eu me encontrei cientificamente e descobri o que amo fazer. Em especial, agradeço ao Gabriel e a Roberta, por serem os pais científicos mais incríveis que eu poderia ter e por me estimularem a sempre pensar grande e por conta própria, praticamente todo esse trabalho provavelmente não aconteceria sem a ajuda de vocês, serei eternamente grato fazerem parte do meu crescimento profissional. Agradeço também aos colegas do Laboratório de Biocristalografia (LABIC), Francisco, Bruno, Pedro, Paula, Micaelle, Léo, Bia, Cássia, Hector, Milena e Álife, por compartilharem comigo experiências boas no convívio no laboratório, esse trabalho também teve um pouquinho de vocês nele, e por isso agradeço muito.

Também agradeço aos amigos do Laboratório de Biotecnologia Molecular (LaBBMol), Wallady, Rayane, Vanessa, Letícia, Gabi, Gustavo, Kethlin, João Eudes, pelos ensinamentos, risadas e experiências boas no laboratório. Em especial, agradeço a Talita por toda a ajuda durante os experimentos para esse trabalho, aprendi muito com você e foi muito bom ter você como coorientadora, definitivamente não sei se conseguiria sem a sua ajuda.

Aos professores Dr. Bruno Rocha e Dr. André Coelho por todo apoio, atenção, ajuda e confiança durante a iniciação científica. Carregarei para sempre muita admiração e respeito pela figura de liderança de vocês. Agradeço também a todas as oportunidades oferecidas durante minha trajetória acadêmica.

Agradeço ao CNPq por todo o financiamento para realização desse projeto.

Agradeço a todos os professores pela experiência nesse curso de graduação incrível, pelas aulas, pelo suporte, pelas oportunidades e pelo conhecimento transmitido.

Por fim, agradeço a mim, que mesmo nos momentos mais difíceis e desafiadores durante todos esses anos, consegui me manter convicto ao meu objetivo final.

A todos, minha eterna gratidão!

“Ame você mesmo, seja quem você é, nunca deixe ninguém dizer o que você deveria ou não deveria ser, porque você nasceu assim, do jeito que Deus lhe fez, e Ele nunca erra.”

(Lady gaga)

RESUMO

A Frutalina (FTL) é uma lectina vegetal extraída das sementes de *Artocarpus incisa* pertencente à família das *Jacalin-related lectins*, apresentando afinidade por resíduos de α -D-galactose e diversas aplicações biológicas já descritas na literatura. Entretanto, a FTL ocorre de maneira natural como uma mistura complexa de múltiplas isoformas glicosiladas e as limitações quanto à obtenção da proteína a partir de fontes vegetais dificultam a sua aplicação em larga escala, tornando a expressão heteróloga uma alternativa promissora para obtenção de uniformidade no processo. Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo otimizar a expressão heteróloga da Frutalina em *Komagataella phaffii* visando à obtenção da proteína recombinante ativa, com elevado grau de pureza e atividade ligante a carboidratos preservada. As expressões foram conduzidas em combinações de temperatura (15°C e 30°C) e concentração de metanol indutor (0,5% e 1%), sendo acompanhadas por Bradford, SDS-PAGE, Dot Blot e Western Blot utilizando anticorpo anti-FTL. A condição considerada mais promissora foi submetida a purificação por cromatografia de afinidade a metal imobilizado (IMAC), seguida de diálise e concentração. Posteriormente, a proteína purificada foi caracterizada por espalhamento dinâmico de luz (DLS), tanto isoladamente quanto em associação com a imunoglobulina A1 secretória humana (slgA1). Os resultados demonstraram que a condição utilizando a combinação de condições de expressão de 30°C e 0,5% de metanol proporcionou maior recuperação proteica total, atingindo aproximadamente 654 μ g/mL na fração precipitada com sulfato de amônio. A presença da rFTL foi confirmada por SDS-PAGE e Western Blot, sendo observadas bandas imunorreativas entre 20 e 25 kDa. A proteína recombinante purificada foi analisada por DLS que revelou que a distribuição hidrodinâmica foi compatível com a formação de complexos supramoleculares rFTL:slgA1, observada pelo aumento do diâmetro hidrodinâmico médio e pela redução de índices de polidispersidade dos complexos em relação aos controles. Os resultados obtidos sugerem que a proteína recombinante produzida preservou sua capacidade lectínica, reforçando seu futuro uso potencial em aplicações biotecnológicas.

Palavras-chave: Lectinas; DLS; Biologia molecular; Proteínas vegetais.

ABSTRACT

Frutalin (FTL) is a plant lectin extracted from the seeds of *Artocarpus incisa* that belongs to the Jacalin-related lectin family, exhibiting affinity for α -D-galactose residues and several biological applications described in the literature. However, FTL naturally occurs as a complex mixture of multiple glycosylated isoforms, and limitations associated with protein extraction from plant sources hinder its large-scale application, making heterologous expression a promising alternative for obtaining a more uniform product. In this context, the present study aimed to optimize the heterologous expression of Frutalin in *Komagataella phaffii* to obtain an active recombinant protein with a high degree of purity and preserved carbohydrate-binding activity. Protein expression was carried out under different combinations of temperature (15°C and 30°C) and methanol inducer concentration (0.5% and 1.0%), and was monitored by Bradford assay, SDS-PAGE, Dot Blot, and Western Blot using anti-FTL antibodies. The most promising expression condition was selected for purification by immobilized metal affinity chromatography (IMAC), followed by dialysis and concentration. Subsequently, the purified protein was characterized by dynamic light scattering (DLS), both individually and in association with human secretory immunoglobulin A1 (sIgA1). The results demonstrated that the expression condition combining 30°C and 0.5% methanol provided the highest total protein recovery, reaching approximately 654 μ g/mL in the ammonium sulfate-precipitated fraction. The presence of recombinant Frutalin (rFTL) was confirmed by SDS-PAGE and Western Blot analyses, which revealed immunoreactive bands between 20 and 25 kDa. The purified recombinant protein was further analyzed by DLS, which revealed hydrodynamic size distributions consistent with the formation of supramolecular rFTL complexes, as evidenced by an increase in the average hydrodynamic diameter and a reduction in the polydispersity indices of the complexes compared with the individual controls. Overall, the obtained results suggest that the recombinant protein retained its lectin activity, reinforcing its potential for future biotechnological application.

Keywords: Lectins; DLS; Molecular biology; Vegetable proteins; Heterologous expression.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Linha do tempo da evolução histórica da lectinologia.....	20
Figura 2 – Classificação estrutural das lectinas com base em seu domínio ligante a carboidrato	22
Figura 3 – Estrutura cristalográfica da Frutalina nativa.....	31
Figura 4 – Mapa do vetor pPICZ α A contendo gene da rFTL.....	42
Figura 5 – Metodologia experimental para otimização da expressão heteróloga da frutalina recombinante (rFTL) em <i>Komagataella phaffii</i>	44
Figura 6 – Colônias de <i>K. phaffii</i> X-33 transformadas com gene da rFTL.....	45
Figura 7 – Gel de eletroforese da expressão a 15°C (sobrenadante).....	51
Figura 8 – Gel de eletroforese da expressão a 30°C (sobrenadante).....	53
Figura 9 – Gel de eletroforese da expressão a 15°C (lisado).....	54
Figura 10 – Gel de eletroforese da expressão a 30°C(lisado).....	55
Figura 11 – Detecção da rFTL nas amostras da expressão a 15°C – 0,5% de metanol.....	57
Figura 12 – Detecção da rFTL nas amostras da expressão a 15°C – 1% de metanol.....	58
Figura 13 – Detecção da rFTL nas amostras da expressão a 30°C – 1% de metanol.....	59
Figura 14 – Detecção da rFTL nas amostras da expressão a 30°C – 0,5% de metanol.....	60
Figura 15 – Detecção por Western Blot em amostras da fração intracelular.....	61
Figura 16 – Quantificação de proteínas totais da expressão a 15°C.....	63
Figura 17 – Quantificação de proteínas totais da expressão a 30°C.....	64

Figura 18 – Cromatograma da purificação da rFTL em IMAC.....	66
Figura 20 – Análise do perfil proteico da rFTL purificada por IMAC.....	67
Figura 19 – Ensaio de hemaglutinação rFTL purificada e expressa em <i>K. phaffii</i>	69
Figura 21 – Distribuição de diâmetro hidrodinâmico das amostras por intensidade.....	71
Figura 22 – Distribuição do diâmetro hidrodinâmico por volume para as amostras analisadas em DLS.....	73
Figura 23 – Comparação entre os valores de Z-average e PDI obtidos pelas amostras testadas.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α -MF	Fator α de acasalamento (<i>Alpha Mating Factor</i>)
AOX1	Álcool Oxidase 1
AOX2	Álcool Oxidase 2
BMGY	Buffered Glycerol-complex Medium
BMMY	Buffered Methanol-complex Medium
CC	Centro de Ciências
CIBio	Comissão Interna de Biossegurança
CQB	Certificado de Qualidade em Biossegurança
CRD	<i>Carbohydrate Recognition Domain</i> (Domínio de Reconhecimento a Carboidratos)
CTNBio	Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i> (Espalhamento Dinâmico de Luz)
FTL	Frutalina
GBME	Grupo de Pesquisa em Biologia Molecular e Estrutural
GRAS	<i>Generally Recognized As Safe</i>
His-tag	Cauda de Histidina
IMAC	<i>Immobilized Metal Affinity Chromatography</i> (Cromatografia de Afinidade a Metal Imobilizado)
JRL	<i>Jacalin-Related Lectin</i>
K. phaffii	<i>Komagataella phaffii</i>
LabBMol	Laboratório de Biotecnologia Molecular

OD600	Densidade Óptica a 600 nm
OGM	Organismo Geneticamente Modificado
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PBRECHA	Promotor BRECHA
PDI	Índice de Polidispersidade
RE	Retículo Endoplasmático
Rh	Raio Hidrodinâmico
rFTL	Frutalina Recombinante
SEC	<i>Size Exclusion Chromatography</i> (Cromatografia por Exclusão de Tamanho)
SDS-PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida na Presença de Dodecil Sulfato de Sódio
slgA1	Imunoglobulina A1 Secretória
UFC	Universidade Federal do Ceará
UPR	<i>Unfolded Protein Response</i>
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1 Lectinas vegetais: aspectos estruturais, biológicos e biotecnológicos.....	19
2.1.1 Histórico e descoberta das lectinas.....	19
2.1.2 Características estruturais e classificação das lectinas	20
2.1.3 Funções biológicas e aplicações biotecnológicas das lectinas	25
2.1.4 Lectinas relacionadas à Jacalina (JRLs).....	28
2.2 Frutalina: descrição, estrutura e aplicações biotecnológicas	30
2.2.1 Produção de Frutalina recombinante	33
2.3 <i>Komatagaella phaffii</i> como plataforma de expressão heteróloga	35
2.3.1 Desafios na expressão recombinante em <i>K. phaffii</i>	37
3 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE.....	39
4 OBJETIVOS	40
4.1 Objetivo geral	40
4.2 Objetivos específicos	40
5 MATERIAIS E MÉTODOS	41
5.1 Aspectos éticos e material biológico	41
5.2 Etapas experimentais previamente executadas	41
5.2.1 Construção gênica do vetor de expressão da rFTL.....	41
5.2.2 Subclonagem do vetor em <i>Escherichia coli</i> DH5 α	42
5.2.3 Transformação em <i>Komagataella phaffii</i> X-33 e seleção dos transformantes	43
5.2.4 Ensaios preliminares de expressão.....	43
5.3 Plaqueamento de colônias transformadas.....	45
5.4 Indução da expressão de rFTL em <i>K. phaffii</i> X-33.....	45
5.5 Precipitação do sobrenadante com sulfato de amônio a 90%	46
5.6 Lise celular.....	46
5.7 Eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% (SDS-PAGE)	47
5.8 Western Blot	48
5.9 Quantificação proteica por Bradford	48
5.10 Purificação em matriz de níquel (IMAC)	48

5.11 Ensaio de atividade hemaglutinante	49
5.12 Análise da rFTL por Dispersão Dinâmica da Luz (DLS).....	50
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
6.1 Avaliação das condições de expressão heteróloga da rFTL.....	51
6.1.1 Análise por SDS-PAGE das frações extracelulares.....	51
6.1.2 Análise por SDS-PAGE das frações intracelulares.....	53
6.2 Confirmação da identidade da Frutalina recombinante	57
6.2.1 Imunodeteção por Dot Blot e Western Blot da fração extracelular	57
6.2.3 Imunodeteção por Western Blot da fração intracelular	61
6.3 Comparação do rendimento proteico por Bradford	63
6.4 Purificação da rFTL por IMAC.....	66
6.5 Teste de atividade hemaglutinante.....	68
6.6 Análise da formação do complexo rFTL:slgA1 por DLS	70
7 CONCLUSÃO.....	76
8 REFERÊNCIAS.....	77

1 INTRODUÇÃO

As proteínas são biomoléculas essenciais para a manutenção dos sistemas biológicos. Elas possuem diversas atuações, podendo ser catalisadoras, componentes estruturais biológicos ou reguladores de mecanismos bioquímicos vitais para sobrevivência celular. Nesse sentido, avanços nas áreas da física, química e tecnologia, permitiram uma maior compreensão do funcionamento dessas biomoléculas nos sistemas biológicos, a partir da integração de conhecimentos e ferramentas de diversos campos da ciência (ZHANG, W.; WANG, T., 2023).

Dentre as áreas científicas que mais corroboraram para avanços na pesquisa acerca de proteínas, a biotecnologia tem se destacado por proporcionar múltiplas aplicabilidades para essas biomoléculas (KHOURY *et al.*, 2014). A biotecnologia é caracterizada por utilizar de células vivas e suas enzimas para produzir produtos de interesse industrial de maneira a requerer menos energia e gerar menos resíduos industriais, o que se constitui como sua maior vantagem. Processos biotecnológicos têm sido amplamente aplicados por indústrias produtivas em comparação com a síntese química devido seus benefícios ao meio ambiente, redução do custo produtivo e eliminação de produtos intermediários potencialmente perigosos (BARRAGÁN-OCAÑA *et al.*, 2020; KIEFER *et al.*, 2021; NESTL *et al.*, 2024).

Nesse sentido, a busca por compostos bioativos de interesse biotecnológico tem historicamente explorado fontes naturais, especialmente organismos vegetais, que são conhecidos por apresentar uma variedade de moléculas com propriedades terapêuticas, e dentre elas, as proteínas destacam-se devido à sua versatilidade funcional. Com avanço das tecnologias de DNA recombinante, tornou-se possível compreender a complexidade estrutural e funcional dessas biomoléculas, permitindo a produção controlada de proteínas e peptídeos de interesse em sistemas heterólogos. Essa nova estratégia de obtenção de proteínas terapêuticas possibilitou superar desafios voltados para a baixa biodisponibilidade natural e a variabilidade de isoformas encontradas em fontes biológicas, fatores limitantes para sua purificação e uso em larga escala (JAYAKRISHNAN *et al.*, 2024).

A engenharia de proteínas recombinantes permitiu obter características desejáveis em biomoléculas de interesse comercial, como facilidade de obtenção,

maior grau de pureza e controle sobre a funcionalidade e segurança do produto. Tais fatores contribuíram para o estabelecimento do uso biotecnológico dessas proteínas em diferentes setores industriais e diversas aplicações farmacêuticas. (LUO et al., 2025; JAYAKRISHNAN et al., 2024)

Dentre as proteínas vegetais que têm despertado crescente interesse científico, devido suas características biológicas diversificadas, destacam-se as lectinas. Esse grupo de proteínas é conhecido por apresentar capacidade de reconhecer e se ligar de maneira reversível e específica a carboidratos. Apesar da ligação ao carboidrato ser realizada com bastante especificidade, as lectinas não promovem mudanças estruturais e nem interferem do metabolismo dos açúcares ligados. Tal característica promove o uso das lectinas como eficazes marcadores celulares, devido sua alta atividade ligante específica a glicanos presentes nas membranas biológicas. (Tsaneva & Van Damme, 2020; Gachelin, 2001).

De maneira geral, as lectinas têm origem variada, podendo ser encontradas em organismos diversos como bactérias, fungos e animais. Entretanto, a classe das lectinas vegetais exibe elevada relevância devido sua versatilidade na aplicação em áreas de pesquisa médica e científica. Dentre as características que tornam as lectinas vegetais alvos de desenvolvimento tecnológico, destacam-se sua atividade anti-inflamatória, seus potenciais efeitos analgésicos e antinociceptivos e suas propriedades antineoplásicas e antiulcerosas (KONOZY, E.; OSMAN, M.; DIRAR, A., 2022).

A Frutalina (FTL), lectina extraída das sementes de *Artocarpus incisa*, com afinidade por cadeias de α -D-galactose, pertence à família das *Jacalin-related lectins* (JRLs) e destaca-se como uma forte candidata para o desenvolvimento de novas aplicações biotecnológicas. A Frutalina apresenta propriedades notáveis que a enfatizam seu uso em pesquisas científicas, como sua estabilidade conformacional elevada, seu potencial de produção recombinante e sua afinidade por glicoproteínas O-glicosiladas, como o sIgA1 (Costa et al., 2025; Leite, 2016).

Todavia, a Frutalina nativa é expressa naturalmente como uma mistura de isoformas proteicas glicosiladas, o que aumenta a sua variabilidade de afinidade por diferentes tipos de glicanos, sendo um entrave para seu uso escalonado (LEITE, Talita Abrante, 2016; MOREIRA, A. C. De O. M., 2002). Uma alternativa para essa barreira

é a expressão recombinante da Frutalina em plataformas de expressão bem estabelecidas e capazes de proporcionar o devido enovelamento proteico, como a *K. phaffii*. No entanto, em pesquisas prévias, já identificaram uma menor afinidade da Frutalina recombinante (rFTL) em comparação com sua estrutura nativa, bem como é recorrente observar a perda de sua atividade hemaglutinante (OLIVEIRA, C. *et al.*, 2008a).

Diante desse cenário, o objetivo desse trabalho é realizar a otimização do método de expressão recombinante da lectina Frutalina (rFTL) utilizando a levedura metilotrófica *Komagataella phaffii* como plataforma de expressão.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Lectinas vegetais: aspectos estruturais, biológicos e biotecnológicos

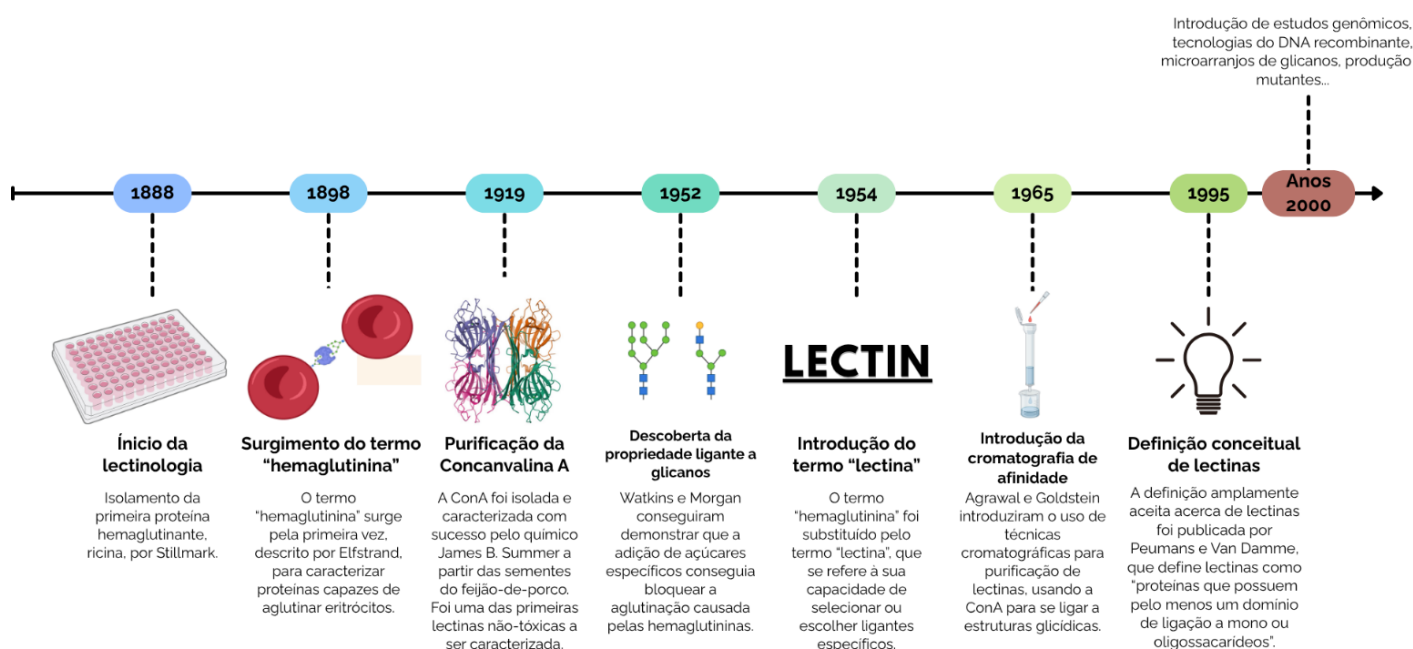
2.1.1 Histórico e descoberta das lectinas

A descoberta da primeira proteína atualmente caracterizada como “lectina”, ocorreu no ano de 1888, realizada por Peter H. Stilmark (1860 – 1923) que estudou extratos vegetais provenientes das sementes da planta *Ricinus communis* (*Euphorbiaceae*) conhecida por sua toxicidade. Durante seus estudos, Stilmark observou pela primeira vez o fenômeno de aglutinação de células sanguíneas pela interação entre lectinas e glicanos presentes nas membranas dos eritrócitos. Apesar de ainda desconhecida, essa biomolécula capaz de se ligar a hemácias foi denominada como “Ricina”, e foi classificada posteriormente por Elfstrand em 1898, na classe de proteínas conhecidas como hemaglutininas ou fitohemaglutininas, termos que precedem a definição atual de lectinas. (Stilmark, 1888; apud Tsaneva & Van Damme, 2020). Em 1891, Hélin também demonstrou a mesma atividade hemaglutinante presentes em extratos proteicos de *Abrus precatorius*, denominando o tal composto responsável por essa atividade como “Abrina” (SHARON & LIS, 2004; apud Rocha, 2007). Em 1952, Watkins & Morgan realizaram uma pesquisa que introduziu uma descoberta fundamental para o entendimento do conceito e das propriedades apresentadas pelas lectinas. Eles demonstraram que açúcares específicos conseguiam inibir a ocorrência de hemaglutinação causada por extratos proteicos contendo lectinas. Com isso, foi comprovado que o princípio de atuação dessas proteínas se baseava no reconhecimento e na ligação a açúcares presentes nas superfícies celulares. (WATKINS; MORGAN, 1952)

A palavra “lectina” é derivada do verbo latino ‘*legere*’, cujo significado remete a capacidade de ‘selecionar’ ou ‘escolher’, remetendo à atividade específica de ligação desse grupo de proteínas (BOYD; REGUERA, 1949). Com a introdução das tecnologias de DNA recombinante em meados da década de 1970 (DAMME, E. J. M. VAN, 2014), o campo de estudo da lectinologia se expandiu bastante, com muitas pesquisas e descobertas acerca da caracterização de mecanismos moleculares e resoluções de estruturas tridimensionais das lectinas. Isso permitiu um acúmulo de descobertas acerca de seu conceito e suas propriedades, dando seguimento a diferentes reformulações conceituais acerca do núcleo das lectinas. Em 1995,

Peumans e Van Damme propuseram uma nova atualização conceitual para as lectinas, definindo-as como: “todas as proteínas que possuem pelo menos um domínio não-catalítico, que se liga reversivelmente a um mono ou oligossacarídeo específico” (PEUMANS; DAMME, E. J. M. VAN, 1995). Embora definições mais recentes tenham refinado essa conceituação, incorporando avanços relacionados à diversidade estrutural e funcional dessas proteínas, a proposição de Peumans e Van Damme permanece amplamente aceita e é reiterada em revisões contemporâneas sobre lectinologia por representar de forma consistente princípios fundamentais que caracterizam esse grupo.

Figura 1 – Linha do tempo da evolução histórica da lectinologia



Fonte: Elaborada pelo autor com base em Tsaneva e Van Damme (2020)

Legenda: Linha do tempo destacando os principais marcos históricos da lectinologia. A figura apresenta eventos relevantes para o desenvolvimento da área desde o isolamento da ricina em 1888 até a consolidação do conceito moderno de lectinas e o advento de tecnologias aplicadas ao estudo de interações lectina-carboidrato.

2.1.2 Características estruturais e classificação das lectinas

As lectinas constituem um heterogêneo grupo de proteínas que compartilham de uma mesma característica principal: realizar ligações reversíveis com açúcares específicos. Entretanto, as lectinas divergem em questão de estrutura tridimensional, propriedades biofísicas e bioquímicas, além de possuírem funções biológicas variadas. Tais proteínas são descritas como ubíquas na natureza, o que significa que

diferentes espécies animais e vegetais podem apresentar lectinas estruturalmente diferentes entre si, mas com a possibilidade de compartilharem a mesma estrutura ligante a carboidrato (TSANEVA; DAMME, E. J. M. VAN, 2020). Como exemplo, as galectinas constituem uma família de lectinas que possuem a capacidade de se ligar a β -galactosídeos e que podem ser encontradas em organismos eucarióticos diversos, desde fungos, mamíferos, anfíbios e organismos marinhos, mantendo conservação estrutural do domínio de reconhecimento a carboidratos (CUMMINGS *et al.*, 2022; MANSOUR *et al.*, 2022; MARIANO *et al.*, 2019; MOAR; TANDON, 2021).

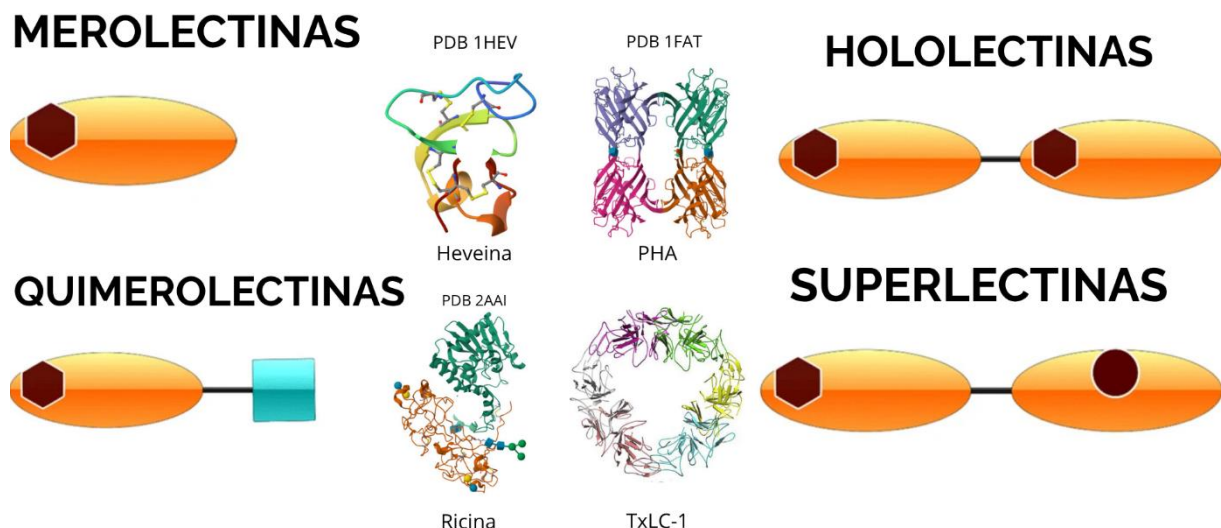
Considerando a diversidade de ocorrência das lectinas na natureza, diversas classificações foram propostas ao longo dos anos para agrupar essas proteínas em um mesmo grupo. A classificação das lectinas baseada em sua estrutura molecular tem sido a mais utilizada, devido ao seu potencial de análise funcional e comparativo (TSANEVA; DAMME, E. J. M. VAN, 2020). Nessa classificação, as lectinas são subdivididas em quatro grupos principais baseados na quantidade e na natureza dos CRDs e na presença de demais domínios ativos, sendo eles:

- a) Merolectinas: Tratam-se de proteínas que apresentam em sua estrutura molecular apenas um domínio de reconhecimento a carboidrato. Por esse motivo, não são capazes de induzir a aglutinação de eritrócitos ou a precipitação de glicoconjugados. A heveína, uma merolectina extraída de *Hevea brasiliensis*, é tradicionalmente estudada por seu potencial antifúngico devido sua capacidade de ligação à quitina (LOO *et al.*, 2021).
- b) Hololectinas: Apresentam dois ou mais domínios de ligação a carboidrato que possuem estrutura homóloga entre si. Essa característica permite que esse grupo de proteínas consiga se ligar a diferentes alvos ao mesmo tempo. São capazes de induzir a aglutinação de hemácias e também podem ser empregados na precipitação de glicoconjugados. Como representante desse grupo de proteínas, a PHA (*Phytohaemagglutinin*) extraída do feijão vermelho (*Phaseolus vulgaris*) também atua como agente mitogênico de linfócitos T e apresenta efeitos antitumorais e imunomoduladores (WANG, P. *et al.*, 2023).
- c) Quimerolectinas: Diferenciam-se das duas classes anteriores pela presença de um domínio catalítico paralelamente ao CRD. Apesar de sua distinção, o sítio catalítico não interfere na ligação do carboidrato ao sítio de ligação, entretanto, confere a proteína um maior espectro de ação em aplicações biológicas. Um

exemplo clássico dessa classe de lectinas, são as proteínas inativadoras de ribossomo do tipo II (RIP 2), como a ricina, que alternativamente ao seu domínio ligante a galactose, apresenta um domínio enzimático com atividade glicosidásica envolvido em mecanismos de apoptose (FRANKE; SCHOLL; AIGNER, 2019).

- d) Superlectinas: As superlectinas enquadram-se em um subgrupo das quimerolectinas, que se distinguem pela presença de dois ou mais sítios de reconhecimento a carboidrato não-semelhantes estruturalmente. Isso caracteriza essas lectinas como capazes de reconhecer açúcares distintos, tendo especificidade múltipla e maior versatilidade. A lectina TxLCI-1, extraída do bulbo de tulipa, é uma representante desse grupo com afinidade por diferentes tipos de estruturas glicídicas (VALDICÉLIO *et al.*, 2021).

Figura 2 – Classificação estrutural das lectinas com base em seu domínio ligante a carboidrato



Fonte: Adaptada de Van Damme (2020)

Legenda: Classificação das lectinas com base em sua variedade estrutural do domínio ligante a carboidrato. As elipses em laranja representam o domínio ligante glicanos, enquanto os hexágonos e círculos marrons representam diferentes formas e conformações do sítio de ligação. O quadrado azul claro representa um domínio distinto, com atividade própria. Ao lado de cada denominação, segue um exemplo de lectina pertencente a respectiva classe estrutural: Heveína (PDB 1HEV), pertencente ao grupo das merolectinas; *Phytohaemagglutinin* (PDB 1FAT), pertencente ao grupo das hololectinas; Ricina (PDB 2AAI), pertencente ao grupo das quimerolectinas; TxCL-1, pertencente ao grupo das superlectinas.

Uma nova classificação também foi sugerida por Moreira (2002), denominando uma nova classe chamada multilectinas, que engloba lectinas constituídas de sítios de ligação a carboidratos homólogos, mas que são capazes de reconhecer estruturas de açúcares não relacionados, configurando-se como lectinas que apresentam capacidade de reconhecer diferentes estruturas glicídicas em distintos graus de afinidade. Dada proposição foi relatada na lectina Frutalina, extraída das sementes *Artocarpus incisa*, no qual apresenta afinidade primária por galactose, mas que também é capaz de se ligar a estruturas glicídicas contendo manose, em menor grau de atividade se comparado com seu ligante principal (Moreira, 2002).

Apesar da classificação mais utilizada se basear no CRD, as lectinas também são classificadas com base em sua localização subcelular, principalmente, no caso das lectinas vegetais. As lectinas podem estar localizadas em diferentes compartimentos celulares e tecidos vegetais. Comumente, as lectinas podem ser encontradas no vacúolo das células vegetais, cumprindo funções relacionadas ao armazenamento e transporte de açúcares para a planta. Lectinas também são muito associadas ao papel de defesa contra patógenos devido sua ampla disponibilidade em alguns tecidos vegetais, podendo chegar a 10% do teor de proteínas solúveis totais. Elas são capazes de interagir com alvos endógenos, quando localizadas em compartimentos internos da célula, ou exógenos, cumprindo função protetora contra a invasão de agressores (CONINCK, DE; DAMME, E. J. M. VAN, 2021; LANNOO; DAMME, E. J. M. VAN, 2010a).

Paralelamente a estrutura molecular, as lectinas podem ser divididas em 12 famílias, com base em sua sequência primária e sua estrutura tridimensional: lectinas de leguminosas, lectinas relacionadas à Jacalina, lectinas relacionadas à *Galanthus nivalis agglutinin* (GNA), lectinas tipo Heveína, lectinas tipo ricina-B, lectinas do tipo *Lysin Motif* (LysM), lectinas tipo Amarantina, lectinas do tipo *Nicotiana tabacum agglutinin* (Nictaba), lectinas do tipo *Euonymus europaeus lectin* (EUL), lectinas tipo *Agaricus bisporus agglutinin* (ABA), lectinas tipo *Calystegia sepium agglutinin* (CRA) e lectinas tipo Cyanovirin (TSANEVA; DAMME, E. J. M. VAN, 2020).

Quadro 1 – Famílias de lectinas e suas características

Família	Ligante glicídico	Estrutura do domínio lectínico	Atividade biológica
Lectinas do tipo Amarantina	GalNAc, antígeno T	B-trevo	Potencial antiproliferativo em células de adenocarcinoma esofágico (EAC) (AL-MAMUN <i>et al.</i> , 2016)
Lectinas do tipo Nictaba	O-GlcNAc	Jelly-roll β -sanduíche (BLOCH <i>et al.</i> , 2024)	Sinalizador molecular de sinais de estresse a plantas
Lectinas do tipo LysM	(GlcNAc) _n	LysM <i>fold</i> (β - α - α - β)	Potencial antifúngico
Lectinas do tipo Jacalina	Manose e/ou galactose	B-prisma	Potencial imunomodulador contra infecções bacterianas
Lectinas do tipo GNA	Manose	B-prisma	Respostas biológicas contra patógenos
Lectinas tipo EUL	N-glicanos ricos em manose e galactosídeos	B-trevo (FOUQUAERT; DAMME, E. J. M. VAN, 2012)	Respostas transcricionais a estresse abiótico (ATALAH, AL <i>et al.</i> , 2014)
Lectinas tipo heveina	(GlcNAc) _n	<i>Hevein fold</i> (29-45 aminoácidos ricos em cisteína)	Proteínas de defesa a patógenos fúngicos(LOO <i>et al.</i> , 2021)
Lectinas tipo Ricina B	Galactose/GalNAc	B-trevo	Mecanismos de resistência contra patógenos
Lectinas tipo CRA	N-glicanos ricos em manose	<i>TIM Barrel</i> ($((\beta/\alpha)_8)$)	ND
Lectinas tipo ABA	GlcNAc/GalNAc	B-sanduíche	Potencial antiproliferativo na cicatrização anômala de feridas oculares (KENT <i>et al.</i> , 2003)
Lectinas tipo cianovirina	Manose	<i>Cyanovirin fold</i> (β -folha rico em <i>hairpins</i>)	Potente atividade antiviral (CARPENTIERI <i>et al.</i> , 2010)
Lectinas de leguminosas	Manose/glicose, galactose/GalNAc	B-sanduíche	Potencial antinociceptivo (AMORIM <i>et al.</i> , 2016)

Fonte: Adaptado de Van Damme (2020)

Legenda: Principais famílias de lectinas vegetais, suas estruturas tridimensionais, especificidades por carboidratos e atividades biológicas. ND: Não determinado (poucos estudos relatando atividades empregadas pela lectina).

Alternativamente a grande variedade de distribuição e classificações das lectinas, sua estrutura tridimensional também é bastante variada e organizada de maneira distinta. A especificidade de uma lectina, isso é, sua ligação a carboidratos específicos, é determinada por uma sequência bem conservada de aminoácidos que compõem o domínio de ligação ao carboidrato. O CRD consiste em sítios de ligação compostos, em sua maioria, por resíduos hidrofóbicos de aminoácidos e de íons metálicos que atuam como cofatores de ligação, aumentando a estabilidade e especificidade no qual a interação acontece (CHETTRI *et al.*, 2021; LAKHTIN, V.; LAKHTIN, M.; ALYOSHKIN, 2011).

Algumas lectinas podem apresentar múltiplos sítios de interação dependendo de seu estado de oligomerização, que designa a organização dos monômeros de proteínas em oligômeros, que poderão originar estruturas em homo ou heterodímeros e tetrâmeros complexos, podendo ter mais de 12 sítios de ligação a carboidrato (CHETTRI *et al.*, 2021; SWAMY; MONDAL, 2023).

2.1.3 Funções biológicas e aplicações biotecnológicas das lectinas

As lectinas têm atuação multifacetada dentro o contexto dos organismos biológicos. Em organismos vegetais, as lectinas podem atuar de maneira versátil, estando ligadas a funções de armazenamento e transporte, sinalização molecular e participação em mecanismos da imunidade vegetal (CHETTRI *et al.*, 2021; KUMAR *et al.*, 2012). Lectinas tipo Nictaba são associadas a processos de sinalização molecular de estresse causado por patógenos, sendo fundamentais no desenvolvimento de respostas imunológicas das plantas. A expressão natural de lectinas desse grupo é aumentada após ataque de predadores, elevando seu nível citoplasmático e o transporte para o núcleo celular, onde ligações com porções glicídicas O-GlcNAc de proteínas histonas resulta em uma transcrição aumentada de genes que atuam na defesa vegetal (ESCH; SCHAFFRATH, 2017; LANNOO; DAMME, E. J. M. VAN, 2010b).

A mesma função também pode ser encontrada em lectinas tipo Jacalina, que realizam a sinalização para respostas intermoleculares estimuladas por fatores estressores abióticos (CHETTRI *et al.*, 2021; ESCH; SCHAFFRATH, 2017). Como exemplo, a lectina Oryzata, pertencente ao grupo das lectinas relacionadas à Jacalina e encontrada no arroz, demonstrou ter pico de expressão durante tratamentos com condições estressantes, como estresse salino, seca, frio e calor, sinalizando para respostas de adaptabilidade para a planta (ESCH; SCHAFFRATH, 2017). Já na família das lectinas tipo Ricina B, a síntese de proteínas com domínio correspondente ao grupo, como a SNA-I e SNA-V, aparenta estar associada ao aumento da resistência ao vírus do mosaico do tabaco em plantas do gênero *Sambucus* (VANDENBUSSCHE *et al.*, 2004).

Na família das lectinas tipo LysM, as RLKs (*Receptor-like Kinases*) do tipo LysM estão associadas ao reconhecimento de oligômeros de quitina, desenvolvendo respostas imunes intracelulares ao ataque de patógenos fúngicos. Esses receptores também são responsáveis pelo estabelecimento de simbioses micorrízicas arbusculares e radiculares, a partir do reconhecimento de fatores de nodulação (Nod) e fatores micorrízicos (Myc) secretados por microrganismos. De maneira similar, LecRLKs com domínios do tipo GNA, como a CaGLP1 e CAMBL1, encontrados em pimenta, participam de respostas biológicas contra patógenos e induzem morte celular contra infecções bacterianas (HOLLE, VAN; DAMME, J. M. VAN, 2018).

No campo da biotecnologia, as lectinas vegetais apresentam grande aplicabilidade em decorrência de suas propriedades antimicrobianas vastas. Lectinas extraídas das sementes de *Eugenia uniflora*, como a EuniSL, mostrou-se capaz de inibir amplamente o crescimento de cepas bacterianas diversas, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus sp.*, *Corynebacterium bovis* e *Klebsiella sp* (KONOZY, E. H. E. *et al.*, 2022; OLIVEIRA, M. D. L. *et al.*, 2008). Essa ampla atividade antibacteriana surge como uma nova abordagem para o tratamento de microrganismos causadores de infecções agudas e recorrentes. Muitas lectinas também apresentam a capacidade de se ligar a glicoconjugados capsulares bacterianos, contribuindo para o desenvolvimento de respostas imunes contra patógenos (ALBANYAN; EDWARDS, 2000).

Além de inibir o crescimento bacteriano e induzir respostas imunomoduladoras, as lectinas também podem atuar como adjuvantes, no qual o uso combinado de terapias com antibióticos e lectinas maximizam o efeito bactericida ou bacteriostático. A lectina extraída de *Parkia platycephala* (PPL) em estudos prévios demonstrou efeito antibiótico significativo quando misturada a um coquetel de gentamicina, sendo eficaz contra cepas multirresistentes de *S. aureus* (MIC de 25,4 µg/mL) e *E. coli* (MIC de 20,2 µg/mL), ao contrário do efeito da lectina isolada, que não demonstrou efeito antiproliferativo significativo das mesmas cepas bacterianas (SILVA, R. R. S. *et al.*, 2019). Da mesma forma, a lectina DVL (obtida de *Dioclea violacea*) é capaz de interagir com aminoglicosídeos por meio de ligações de hidrogênio e interações apolares fracas com resíduos de aminoácidos do seu CRD, provocando uma interação sinérgica entre lectina-fármaco que potencializa sua ação (BARBOSA, F. E. V. *et al.*, 2025).

Embora infecções fúngicas sejam menos recorrentes, elas ainda oferecem riscos para indivíduos com baixa imunidade ou histórico de recorrentes infecções fúngicas. O uso das lectinas como agentes antifúngicos se baseia na capacidade de formar ligações cruzadas com glicoconjugados externos da célula hospedeira, levando a redução no crescimento, alteração na permeabilidade da parede e membrana celular e danos diretos a estrutura da célula (KONOZY, E. H. E. *et al.*, 2022). A aglutinina do gérmen de trigo (WGA) é capaz de inibir o crescimento de *Trichoderma viride*, inibindo formação de hifas e a produção de esporos (MIRELMAN *et al.*, 1975).

De maneira similar, a lectina VML (*Vatairea macrocarpa*) demonstrou atividade antiparasitária contra formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, devido sua interação com estruturas glicídicas de glicoinositolfosfolipídios (GILPs) presentes na membrana plasmática do parasito, que exercem funções quanto a adesão celular, infectividade e evasão imunológica (SANTOS, F. A., 2023). A lectina DVL também apresenta atividade inibitória de formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania infantum* e efeito sinérgico com fármacos antileishmania, sugerindo potencial uso como agente adjuvante em terapias mistas (BARBOSA, F. E. V. *et al.*, 2025).

Além das atividades antimicrobianas, as lectinas vegetais também apresentam importante potencial médico em pesquisas oncológicas, devido sua propriedade de se

ligar e reconhecer glicanos presentes em estruturas celulares sem ocasionar mudanças catalíticas no alvo, por isso são bastante empregadas na marcação e destruição de células tumorais (KONOZY, E. H. E.; OSMAN, M. E. Fadil M., 2022). A RCA-1 (de *Ricinus communis*) é capaz de se ligar a células tumorais em estágio metastático e causar a inibição de seu crescimento e migração, causando uma interrupção seletiva da proliferação dessas células (ZHOU, S. M. *et al.*, 2015). A jacalina, uma lectina ligante a galactose, consegue se ligar a antígenos T e Tn, característicos de células tumorais em fase de metástase, sendo classificada como uma boa ferramenta para detecção histoquímica de células neoplásicas (TACHIBANA, Kouichi *et al.*, 2006).

Outros usos comerciais e industriais das lectinas vegetais incluem seu uso como ferramenta cromatográfica para purificação de glicoproteínas de interesse biotecnológico. A imunoglobulina A (IgA), apresenta algumas subclasses como IgA1, IgA2, sendo a forma secretória (sIgA) predominante em secreções humanas como leite, colostro e lágrimas, como também é abundantemente encontrada em mucosas intestinais. O IgA1 e sua forma secretada, sIgA1, apresentam regiões de dobradiça em sua estrutura tridimensional bastante flexíveis e fortemente O-glicosiladas (DONALD *et al.*, 2022). Seu potencial terapêutico como ferramenta no tratamento de doenças imunológicas e infecções bacterianas tem ganhado bastante destaque (MONTEIRO, R. C.; WINKEL, VAN DE, 2003). Lectinas da família da Jacalina, capazes de reconhecer O-glicanos ricos em galactose, são empregadas na purificação seletiva de glicoproteínas séricas visando uso terapêutico e otimização de processos industriais (LEITE, 2016).

2.1.4 Lectinas relacionadas à Jacalina (JRLs)

As JRLs (*Jacalin-related lectins*) constituem uma família diversa de lectinas conhecidas por serem encontradas em diversos organismos. Elas compartilham uma característica comum entre si, um domínio estrutural do tipo “Jacalin”, que é formado por um motivo proteico em prisma- β com 3 folhas β antiparalelas com 4 fitas (SANKARANARAYANAN *et al.*, 1996). Essa região é caracterizada por criar o sítio de reconhecimento a carboidrato presente nessas lectinas, sendo bastante conservado entre os integrantes dessa família (WEIS; DRICKAMER, 1996).

O grupo das JRLs pode ser subdividido entre lectinas ligantes a manose (man-JRL) e lectinas ligantes a galactose (gal-JRL) (FERNANDEZ-DEL-CARMEN *et al.*, 2013). A Banlec, lectina vegetal isolada de *Musa acuminata*, é uma importante proteína man-JRL devido ao seu potencial inibidor o vírus HIV, impedindo a continuidade de seu ciclo replicativo em células humanas (SWANSON *et al.*, 2010).

As JRLs ligantes a manose costumam ter uma organização estrutural simplificada, sendo constituídas por um único protômero que adota enovelamento do tipo β -prisma. Nessa organização, o CRD localiza-se em regiões de alças (loops) formadas entre as folhas β que compõem o prisma, permitindo interações específicas com resíduos de manose. Já as gal-JRLs, possuem um processamento mais complexo, sendo sintetizadas inicialmente na forma de pré-prolectinas, no qual constituem-se de um peptídeo sinal, um pró-peptídeo e uma cadeia β que é sucedida por um tetrapeptídeo de ligação com a cadeia α . A estrutura madura das lectinas JRLs ligantes a galactose é formada por duas cadeias polipeptídicas α e β , geradas após processamento pós-traducional. A cadeia α compreende praticamente toda a estrutura proteica, incluindo 11 das 12 fitas β que formam o domínio β -prisma, enquanto a cadeia β contribui com a fita β remanescente necessária para completar seu enovelamento. (AROCKIA JEYAPRAKASH *et al.*, 2005; DAMME, E. J. M. VAN *et al.*, 2002). Foi proposto por Van Damme *et al.*, que as gal-JRLs teriam derivado evolutivamente das man-JRLs (DAMME, E. J. M. VAN *et al.*, 2002).

A jacalina é uma lectina vegetal do subgrupo das gal-JRLs extraída de sementes de jaca (*Artocarpus heterophyllus*), que possui capacidade de reconhecer imunoglobulinas séricas humanas, como o IgA, e por esse motivo, tem sido utilizada em estudos de investigação de padrões de O-glicosilação de IgA na síndrome da nefropatia por IgA1 (ANDRE; POGAMP, LE; CHEVET, 1990; LI, N. *et al.*, 2010; PACK, 2000). A lectina de ArtinM, uma man-JRL, se mostrou eficaz no estímulo de respostas imunes contra infecções de *Listeria monocytogenes* em modelos murinos, sugerindo uma potencialização de mecanismos de imunidade inata. Além disso, essa lectina já se mostrou eficaz na estimulação da migração de neutrófilos pela interação de seu sítio de reconhecimento a carboidrato com N-glicanos presentes nas suas membranas celulares (PEREIRA-DA-SILVA *et al.*, 2006; TOLEDO *et al.*, 2009).

2.2 Frutalina: descrição, estrutura e aplicações biotecnológicas

A Frutalina (FTL) é uma lectina pertencente à família das JRLs que é purificada partir das sementes de fruta-pão (*Artocarpus incisa*) pertencente à família das Moraceae. Essa lectina, isolada pela primeira vez por Moreira (1998), apresenta especificidade primária por cadeias de α -D-galactose, também sendo capaz de reconhecer em menor intensidade cadeias de manose, o que a classifica como uma lectina de múltipla especificidade por glicanos. A Frutalina é utilizada em ensaios imunobiológicos devido sua capacidade de reconhecer e se ligar a glicoproteínas associadas a marcadores tumorais. Também já se mostrou capaz de isolar glicoconjugados a partir de matrizes complexas (CAVADA, Benildo Sousa *et al.*, 2021; MOREIRA, R. A. *et al.*, 1998).

A estrutura da Frutalina é descrita como sendo tetramérica, com massa molecular de, aproximadamente, 60 kDa em condições nativas. Além disso, é uma lectina classificada estruturalmente como hololectina, apresentando dois sítios de reconhecimento a carboidratos homólogos, sendo capaz de induzir a aglutinação de hemácias a partir da ligação com seus glicanos celulares. O monômero da FTL é caracterizado por apresentar 153 aminoácidos em sua estrutura, apesar disso, sua massa pode apresentar variações decorrentes de diferentes padrões de glicosilação em sua estrutura nativa. Em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), comumente encontra-se a FTL em migrações de massa equivalentes a 12 – 15 kDa (NETO *et al.*, 2019; OLIVEIRA, C.; TEIXEIRA, José A.; DOMINGUES, 2014).

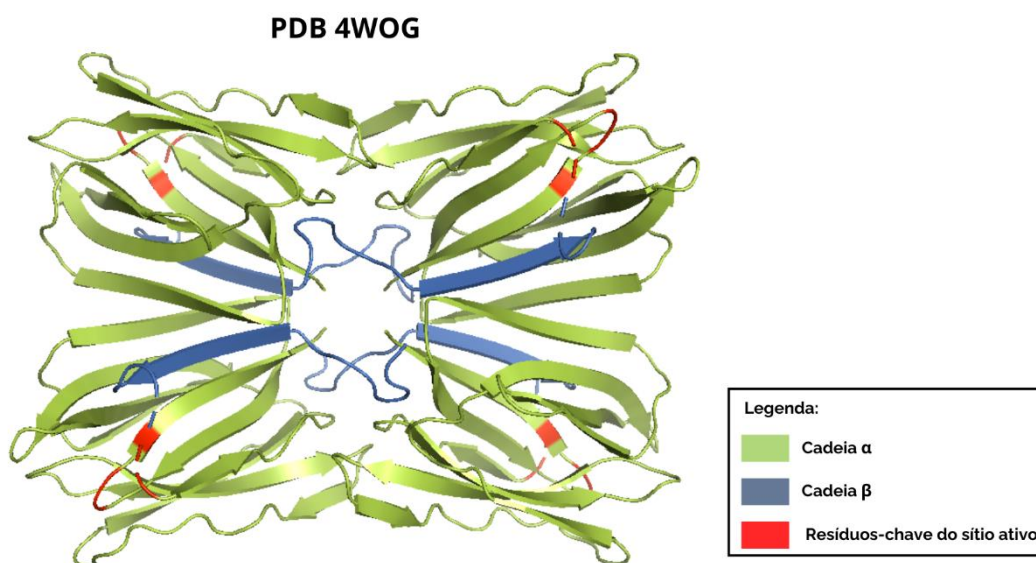
Neto e colaboradores (2019) realizaram pela primeira vez a determinação da estrutura tridimensional da Frutalina a partir de dados cristalográficos de difração em raios-X. A estrutura foi elucidada em uma resolução de 1.81 Å para Frutalina nativa em sua forma livre e em 1.65 Å para estrutura da Frutalina complexada com D-galactose. A Frutalina, por ser uma gal-JRL, apresenta um processamento proteolítico em sua estrutura que consiste em uma clivagem pós-traducional que dá origem a duas cadeias polipeptídicas, α com 133 aminoácidos e β com cerca de 20 aminoácidos. Sua organização em solução aquosa é um homotetrâmero em β -prisma, que é composto de 3 folhas- β de 4 fitas antiparalelas cada (*Greek-key*), um padrão amplamente observado em outras lectinas da família das Jacalinas. O seu CRD é

localizado na extremidade N-terminal da cadeia α , incluindo resíduos-chave com: Gly25, Tyr146, Trp147 e Asp149 (NETO *et al.*, 2019).

Em seu processamento proteolítico natural, o tetrapeptídeo *linker* TSSN (Thr-Ser-Ser-Asn) estaria associado a uma rigidez estrutural de seu sítio ligante a carboidrato. Com a sua excisão durante a maturação proteica, há a redução de sua rigidez e aumento flexibilidade de reconhecimento a carboidratos múltiplos livres em solução. A ligação com cadeias de α -D-galactose ocorre por meio de ligações de hidrogênio entre grupos hidroxila do açúcar com a cadeia peptídica que compõe o sítio ativo, especialmente seus resíduos-chave (NETO *et al.*, 2019; OLIVEIRA, C. *et al.*, 2008b; OLIVEIRA, C.; TEIXEIRA, José A.; DOMINGUES, 2014).

A FTL também apresenta uma boa estabilidade conformacional frente a processos de desnaturação térmica, resistindo a uma temperatura de 60°C e sendo capaz de manter sua atividade biológica após renaturação em ensaios de *refolding* (CAMPANA *et al.*, 2001). Sua estrutura é altamente semelhante com a de outras *Jacalin-related lectins*, como a Jacalina e a frutapina, chegando a obter valores de RMSD de 0,31-0,43 Å na sobreposição de átomos na cadeia α (NETO *et al.*, 2019).

Figura 3 – Estrutura cristalográfica da Frutalina nativa



Fonte: Elaborada pelo autor a partir da estrutura da Frutalina de *Artocarpus incisa* (PDB 4WOG).

Legenda: Estrutura tridimensional da Frutalina (FTL) em sua forma nativa representada pelo modelo de fitas. A proteína encontra-se em sua forma homotetramérica, apresentando as cadeias α (verde) e β (azul) resultantes do processamento pós-traducional característico das lectinas relacionadas à

jacalina do tipo gal-JRL. Os resíduos-chave envolvidos no reconhecimento de carboidratos (Gly25, Tyr146, Trp147 e Asp149) estão destacados em vermelho.

A lectina FTL demonstrou potencial de inibir nocicepção orofacial aguda e crônica em modelos murinos, tendo seu mecanismo de ação associado a interações específicas com os canais de potencial receptor transitório, como o TRPV1, envolvido em sensações nociceptivas, térmicas e mecânicas (DAMASCENO *et al.*, 2016). Além disso, a FTL apresentou ação gastroprotetora não-relacionada à dose em danos teciduais causados por lesões induzidas por etanol e indometacina em camundongos, caracterizando-se como um bom agente farmacêutico para o tratamento de úlceras gástricas (VASCONCELLOS ABDON, DE *et al.*, 2012).

A Frutalina também demonstra extensa capacidade imunomoduladora, sendo capaz de induzir a migração de neutrófilos quando injetada via pleural em camundongos. Também foi possível detectar a ativação de neutrófilos humanos *in vitro* pela FTL, associada a processos de quimiotaxia e a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) intracelularmente (BRANDO-LIMA *et al.*, 2005). Paralelamente, a Frutalina também é capaz de induzir a expressão e a síntese de genes associados a IL-2, importante citocina que atua como fator de crescimento e diferenciação celular. Essa estimulação resultou no aumento da proliferação de linfócitos humanos *in vitro*, mostrando-se ser uma atividade intrínseca da lectina FTL ao ser inibida por α -D-galactose (BRANDO-LIMA *et al.*, 2006).

Como ferramenta cromatográfica, uma matriz de Frutalina imobilizada em Sepharose foi empregada na purificação de biomarcadores proteicos a partir de amostras sorológicas de pacientes com leucemia linfoblástica aguda, permitindo a purificação seletiva de 96 proteínas distintas (CAVALCANTE *et al.*, 2016). A mesma matriz cromatográfica de Frutalina-Sepharose 4B também se mostrou eficiente na análise proteômica de proteínas plasmáticas presentes em amostras de sangue de pacientes com câncer de mama ductal em diferentes estágios (LOBO *et al.*, 2017).

Outras aplicações nanotecnológicas da Frutalina incluem sua capacidade funcionalização em nanopartículas magnéticas de óxido de ferro, produzidas a partir de técnicas de coprecipitação, permitindo a expansão de seu uso na identificação de células neoplásicas (RODRIGUES, 2022). Também está incluso seu uso associado a biocurativos construídos com celulose bacteriana oxidada (CBOXI), que são capazes

de adsorver a lectina em sua estrutura e manter sua atividade ligante a carboidrato ativa, possibilitando estudos aplicados a cicatrização diferencial de lesões de pele (SILVA, et al., 2024).

A interação entre glicoproteínas humanas, como o IgA1, e a Frutalina reforçam a eficiência da aplicabilidade da lectina na purificação de alta seletividade e rendimento desse anticorpo. A aplicação de matrizes contendo FTL imobilizada demonstraram sucesso comparável a formulações comerciais na purificação da imunoglobulina A1 secretória humana (sIgA1), a partir de fontes complexas como o colostro humano (LEITE, 2016). A interação entre o sIgA1 com a FTL também já foi descrita biofísica e bioquimicamente, comprovando que a ligação da lectina com o sIgA1 acontece de maneira cooperativa e com afinidade em escala nanomolar, sendo capaz de manter a estrutura tridimensional da FTL conservada (COSTA, et al., 2025).

2.2.1 Produção de Frutalina recombinante

Apesar da vasta aplicabilidade da Frutalina em sua forma nativa, a existência de múltiplas isoformas da proteína torna um desafio manter a reprodutibilidade experimental, diante do fato que isoformas diferentes podem ter maior ou menor afinidade por glicanos e glicoproteínas específicas, podendo resultar em resultados inconstantes. Nesse contexto, a produção recombinante da FTL tornou-se cada vez mais recorrente no contexto científico, como estratégia para minimizar a sua variabilidade natural e para permitir sua aplicação em escalas industriais e comerciais (OLIVEIRA; TEIXEIRA; DOMINGUES, 2014).

A produção recombinante de Frutalina em *Escherichia coli*, importante microrganismo amplamente estudado e otimizado para expressão de proteínas recombinantes, constantemente associa-se com a formação de corpos de inclusão e baixos rendimentos de proteínas solúveis (OLIVEIRA, C.; TEIXEIRA; DOMINGUES, 2014; ROCHA, 2008). Tal fenômeno indica que a *E. coli* não é capaz de realizar processamentos pós-traducionais requeridos pela estrutura da Frutalina, dando origem a isoformas proteicas mais instáveis em pH fisiológico e com afinidade reduzida por carboidratos. Entretanto, o uso de estratégias de biologia molecular, como a utilização de proteínas de fusão, como a Trx, consegue aumentar a solubilidade proteica em solução, melhorar a estabilidade da proteína e permitir a sua produção em escala ampliada (mg/L) (COSTA et al., 2012).

Apesar da maquinária de *E. coli* não ser capaz de clivar o peptídeo *linker* TSSN, associado a maior rigidez do CRD, foi possível observar a conservação de sua atividade hemaglutinante, mesmo que menor em intensidade com relação a proteína nativa. Isso indica que, apesar de importante para o funcionamento lectínico, a clivagem do peptídeo *linker* não é limitante para manutenção de sua atividade funcional (COSTA et al., 2012; OLIVEIRA.; COSTA; et al., 2009; OLIVEIRA.; TEIXEIRA; DOMINGUES, 2014).

Já em *Komagataella phaffii* (anteriormente classificada como *Pichia pastoris*) é possível obter uma isoforma proteica mais semelhante com a estrutura e funcionamento da proteína nativa, entretanto, processamentos incorretos, frequentemente associados a maquinária da levedura, ainda são encontrados. Isso sugere que o processamento proteolítico da Frutalina requer mecanismos moleculares presentes exclusivamente em organismos vegetais e/ou eucariotos mais complexos (OLIVEIRA et al., 2008b; OLIVEIRA; TEIXEIRA; DOMINGUES, 2014).

Um desafio para produção da lectina recombinante em *K. phaffii* é o seu padrão de glicosilação exacerbado, exibindo terminações de N-glicanos na estrutura proteica, que podem vir a alterar sua funcionalidade biológica (OLIVEIRA, C. et al., 2011). Somado a isso, a perda da atividade hemaglutinante de Frutalina recombinante produzida em *K. phaffii* sugere que suas modificações pós-traducionais alteradas possam tornar o domínio de reconhecimento a carboidrato menos flexível (OLIVEIRA et al., 2008b; OLIVEIRA; TEIXEIRA; DOMINGUES, 2014). No entanto, tais características não foram limitantes para produção da proteína recombinante em larga escala (WANDERLEY et al., 2013) e sua atividade, embora menor que a FTL nativa, se mostrou eficiente no reconhecimento de estruturas glícidas de células tumorais presentes em amostras de tecidos de próstata e contra células de câncer cervical (OLIVEIRA et al., 2011; OLIVEIRA; TEIXEIRA; et al., 2009).

Diante do exposto, verifica-se que a produção heteróloga da Frutalina recombinante ainda enfrenta limitações relacionadas ao seu processamento pós-traducional e às modificações estruturais introduzidas pelo hospedeiro de expressão, fatores que podem comprometer a sua atividade biológica. Apesar dessas limitações, sistemas heterólogos, como a *Komagataella phaffii*, constituem alternativas promissoras para a produção em maiores rendimentos. Dessa forma, a otimização

das condições de expressão se torna essencial para aumentar a disponibilidade de proteína solúvel, maximizar os rendimentos produtivos e preservar sua atividade de ligação a carboidratos.

2.3 *Komagataella phaffii* como plataforma de expressão heteróloga

A *Komagataella phaffii* foi isolada pela primeira vez na década de 1950 por Herman Paff e seus colaboradores a partir de cepas microbianas obtidas em carvalhos, na Califórnia (PHAFF; MILLER; SHIFRINE, 1956). Posteriormente, em 1985, Cregg e colaboradores estabeleceram o uso da *K. phaffii* como um sistema de transformação genética, lançando bases para seu emprego como plataforma de expressão heteróloga (CREGG *et al.*, 1985). Em 2009, a publicação dos primeiros genomas de linhagens de *Komagataella*, incluindo *K. phaffii* GS115 e *K. pastoris* DSMZ70382, seguida pelo sequenciamento da linhagem parental *K. pastoris* CBS7435 em 2011, representou um marco para o desenvolvimento da plataforma de expressão recombinante. A disponibilidade dessas informações genômicas permitiu aprofundar os estudos fisiológicos, metabólicos e bioquímicos da levedura, favorecendo o desenvolvimento de estratégias de engenharia metabólica e otimização de linhagens para produção de proteínas recombinantes. Além disso, a implementação de ferramentas de edição genômica, como sistemas baseados em CRISPR/Cas, permitiram a modificação racional do genoma de *K. phaffii*. (LIU, Q. *et al.*, 2019; LV *et al.*, 2026a; SCHUSTERBAUER *et al.*, 2022).

O crescimento exponencial dos campos das ciências ômicas, como a genômica e a proteômica, tornaram possível realizar a identificação e produção de proteínas e metabólitos potencialmente úteis para aplicações médicas e farmacêuticas. Somado a isso, um impulsionamento pelo estabelecimento de plataformas de expressão de proteínas heterólogas possibilitou o sequenciamento e desenvolvimento de microrganismos com alto rendimento industrial (KHASA; ADIVITIYA; DAGAR, 2017). Organismos procarióticos, como a *Escherichia coli*, foram amplamente estudados e utilizados devido a facilidade de crescimento celular em meios de cultura simples e genoma mais simplificado, permitindo rápida adaptação e uso de sua maquinária celular (UNVER *et al.*, 2024).

No entanto, proteínas mais complexas presentes em organismos eucarióticos demandam de modificações pós-traducionais especializadas que não são realizadas,

em geral, por organismos procarióticos. Com isso, as leveduras surgiram com o passar dos anos como microrganismos ótimos para produção recombinante de proteínas, por serem capazes de realizar modificações pós-traducionais, e oferecerem vantagens como rápido crescimento celular em meios com proteínas livres e capacidade de produção proteica com rendimentos elevados (TYO *et al.*, 2014). Outros organismos eucariotos também são utilizados como plataforma de expressão, como células de mamíferos e células de inseto, porém sua complexidade metabólica e o requerimento de constantes manutenções e técnicas de culturas complexas ainda oferecem obstáculos industriais quando comparados com as leveduras (KHASHA; ADIVITIYA; DAGAR, 2017; LV *et al.*, 2026b).

Quadro 2 – Leveduras utilizadas para produção heteróloga

Levedura	Vantagens	Limitações	Produto	Referência
<i>Komagataella phaffii</i>	Organismo GRAS; Produção elevada de proteínas recombinantes; <i>Cabtree</i> -negativa.	Adição de glicosilações não humanas; Uso de metanol	Indovac (vacina p/ COVID-19); Insugen®; Nanobody®; tripsina recombinante.	(GOMES, A. M. V. <i>et al.</i> , 2018; SINGHANIA; YEMULKAR; PATHAN, 2026)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Organismo GRAS; Adaptabilidade a condições industriais; Ferramentas genéticas consolidadas.	Hiper-glicosilação N-terminal	Albumina sérica humana; glucagon; antígeno de superfície da hepatite; precursor de insulina.	(GOMES, A. M. V. <i>et al.</i> , 2018; NIELSEN, 2013)
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Ótima taxa de secreção proteica	Escassez de ferramentas genéticas robustas	Eritritol; lacase recombinante	(KELLER <i>et al.</i> , 2026; SINGHANIA; YEMULKAR; PATHAN, 2026)
<i>Ogataea polymorpha</i>	Termotolerante; Menor taxa de hiper-glicosilação	Menos estudada	Ácido hialurônico	(MANFRÃO-NETTO <i>et al.</i> , 2021; SINGHANIA; YEMULKAR; PATHAN, 2026)
<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>Cabtree</i> -negativa; Metabolismo de hexoses pela via das pentoses fosfato	Vetores moleculares instáveis	B-galactosidase nativa (Maxilact); quimosina recombinante (Maxiren)	(GOMES, A. M. V. <i>et al.</i> , 2018; SPOHNER <i>et al.</i> , 2016)

Fonte: Elaborado pelo autor

Legenda: Principais leveduras utilizadas como plataforma de expressão heteróloga para produção de produtos recombinantes, destacando suas vantagens e limitações tecnológicas.

A *Komagataella phaffii* é uma levedura metilotrófica amplamente utilizada para produção de produtos recombinantes devido a vantagens em seu sistema de

expressão, como a produção de proteínas em processos fermentativos de alta densidade celular, maior eficiência em enovelamentos proteicos complexos, possui forte estabilidade genética, um promotor fortemente induzível e um sistema de secreção bem desenvolvido. Em questões econômicas, a *K. phaffii* é classificada como um sistema de expressão de baixo custo e com possibilidade de adaptação para o seu uso em biorreatores com grandes volumes de cultura. A levedura também consegue realizar uma série de modificações pós-traducionais, como metilação, acetilação, glicosilação, ajustes proteolíticos, dobramentos polipeptídicos e direcionamento específico de proteínas para compartimentos subcelulares (KHASHA; ADIVITIYA; DAGAR, 2017; LI, H. et al., 2025; LV et al., 2026b; UNVER et al., 2024).

Os promotores presentes no metabolismo de *K. phaffii* podem ser classificados como fortes ou fracos, e são adaptáveis para produção de proteínas de maneira induzível ou constitutiva. O promotor fortemente induzível AOX1 (Álcool-oxidase 1) é ativado por metanol e reprimido por glicerol ou glicose (VOGL; GLIEDER, 2013). Seu uso permite a utilização de metanol como fonte principal de carbono e produção energética, gerando uma separação da fase de expressão proteica para a fase de crescimento e proliferação celular. Já promotores constitutivos como *PBRECHA* (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase) é utilizado para produção de proteínas recombinantes em escala industrial, podendo atingir níveis proteicos em meio livre em g/L (GAO, J.; JIANG, L.; LIAN, 2021). Estudos crescentes têm explorado alternativas para a expressão em *K. phaffii* sem necessitar da utilização de metanol, que em larga escala, oferece riscos quanto sua toxicidade e sua inflamabilidade (SHEN et al., 2024; UNVER et al., 2024). O promotor *PFDH800* apresentou eficiência na produção de proteínas recombinantes sem o uso de metanol, se baseando apenas no estado de crescimento celular, sendo capaz de alcançar em até 69% a atividade do promotor *AOX1* (SHEN et al., 2024).

2.3.1 Desafios na expressão recombinante em *K. phaffii*

Embora expressão de proteínas em *K. phaffii* possua um rendimento proteico satisfatório, desafios pontuais quanto a sua via secretória e processos de modificação pós-traducionais ainda oferecem certas limitações em seu uso. A levedura apresenta boa capacidade de secreção de proteínas, mediada principalmente pela via secretória clássica do retículo endoplasmático-Golgi (LV et al., 2026b; LV; CAI, 2025). Entretanto,

em expressões de alta produtividade, o dobramento proteico e o controle de produtividade se tornam limitados devido a um acúmulo de proteínas não enoveladas corretamente no RE, reduzindo seu rendimento a partir da retenção intracelular e levando a repostas a proteínas mal dobradas (*Unfolded Protein Response*, UPR). A UPR aumenta o estresse do RE, causando uma redução na taxa de tradução de proteínas, e quando a quantidade de proteínas mal dobradas excede capacidade de processamento da célula, pode causar respostas fisiológicas como a apoptose (HETZ; ZHANG, K.; KAUFMAN, 2020; LV; CAI, 2025).

A superexpressão de chaperonas moleculares, como proteínas de choque térmico, vem sendo uma estratégia eficiente para minimizar a sobrecarga de proteínas não-enoveladas no RE, aliviando a via de transporte e secreção de proteínas e sendo capaz de aumentar o rendimento do processo. A Kar2 é uma chaperona que facilita o dobramento de cadeias polipeptídicas mal enoveladas, reduzindo a formação de agregados proteicos intracelulares (SALLADA; HARKINS; BERGER, 2019).

O padrão de glicosilação de *K. phaffii* é conhecido por ser superior ao de *Saccharomyces cerevisiae*, por se assemelhar com o padrão comumente encontrado em células de mamíferos. A levedura possui capacidade de realizar glicosilações em extremidades N-terminais, como também consegue realizar O-glicosilações específicas, conferindo vantagem sobre sistemas procarióticos. Porém, para proteínas biofarmacêuticas, o padrão de glicosilação de *K. phaffii* pode levar a elevada imunogenicidade e afetar diretamente a atividade proteica (THAK *et al.*, 2018). A produção de linhagens com padrões de glicosilação engenheiradas permite a produção de glicoproteínas complexas, como a eritropoietina recombinante (rEPO) e anticorpos monoclonais (HAMILTON *et al.*, 2006; LIU, C. P. *et al.*, 2018).

3 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

A Frutalina destaca-se como uma lectina vegetal de elevado interesse biotecnológico devido à sua capacidade de se ligar a glicoconjugados associados a processos tumorais, inflamatórios e imunológicos, além de apresentar potencial aplicação em sistemas cromatográficos para purificação de biomoléculas. Entretanto, a obtenção da proteína em sua forma natural depende da extração a partir de sementes de fruta-pão, um processo sujeito à variabilidade biológica, sazonalidade e à ocorrência de múltiplas isoformas proteicas, dificultando a padronização experimental e a produção em larga escala.

Nesse sentido, a produção recombinante da FTL surge como uma alternativa promissora para a obtenção de isoformas mais homogêneas e adequadas para aplicações científicas e industriais. Avanços significativos utilizando a *Komagataella phaffii* como plataforma de expressão para Frutalina já foram relatados, no entanto, ainda persistem desafios relacionados à eficiência produtiva, ao correto processamento proteolítico e à manutenção da atividade lectínica.

Dessa forma, a otimização das condições de expressão recombinante da rFTL possui relevância científica, uma vez que pode contribuir para incrementar a disponibilidade de proteína biologicamente ativa, favorecer futuras aplicações comerciais, aumentar o rendimento do bioprocessamento de purificação proteica e favorecer o desenvolvimento de produtos biotecnológicos. Além disso, esse estudo pode ampliar o conhecimento sobre fatores e condições que influenciam na produção de lectinas vegetais de maneira heteróloga.

Como hipótese deste estudo, acredita-se que a modificação de parâmetros de expressão da rFTL em *K. phaffii* X-33, incluindo a temperatura de cultivo e a concentração de metanol indutor, favorecem a obtenção de maiores quantidades de proteína solúvel e contribuem para a conservação de sua atividade de reconhecimento a carboidratos.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Otimizar a expressão heteróloga da Frutalina em *Komagataella phaffii* visando à obtenção da proteína recombinante ativa e a conservação da atividade ligante a carboidratos.

4.2 Objetivos específicos

- Avaliar a expressão da lectina recombinante em *Komagataella phaffii* X-33 sob diferentes condições de cultivo;
- Estabelecer o protocolo de extração e purificação da proteína recombinante;
- Determinar a concentração proteica e o grau de pureza da amostra purificada;
- Confirmar a expressão e purificação da rFrutalina por imunodeteção
- Investigar a formação de complexos rFTL:sIgA1 como indicativo da manutenção de sua atividade lectínica.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Aspectos éticos e material biológico

Todas as atividades utilizando organismos geneticamente modificados (OGM) foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia Molecular (LabBMol), pertencente ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências (CC) da Universidade Federal do Ceará (UFC), Campus do Pici. A UFC possui Certificado de Qualidade em Biossegurança (CQB) emitido pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), sob o número 0102/99 (processo 01200.004129/98-53), conforme registro no Comunicado nº 7WCTNBio publicado no Diário Oficial da União nº 52-E de 18/03/1999. Esse certificado inclui as instalações do LabBMol, autorizando a execução de pesquisas com OGMs em regime de contenção do Grupo T (Nível de Biossegurança 1). O laboratório integra a CIBio-UFC como unidade operativa R007-2016, sob responsabilidade técnica do Prof. Dr. André Luis Coelho da Silva, garantindo que todos os procedimentos experimentais realizados durante o estágio seguiram as diretrizes regulamentares de biossegurança. ([http://www.cibio .ufc.br/index.php/pt-br/unidades-operativas.](http://www.cibio.ufc.br/index.php/pt-br/unidades-operativas))

5.2 Etapas experimentais previamente executadas

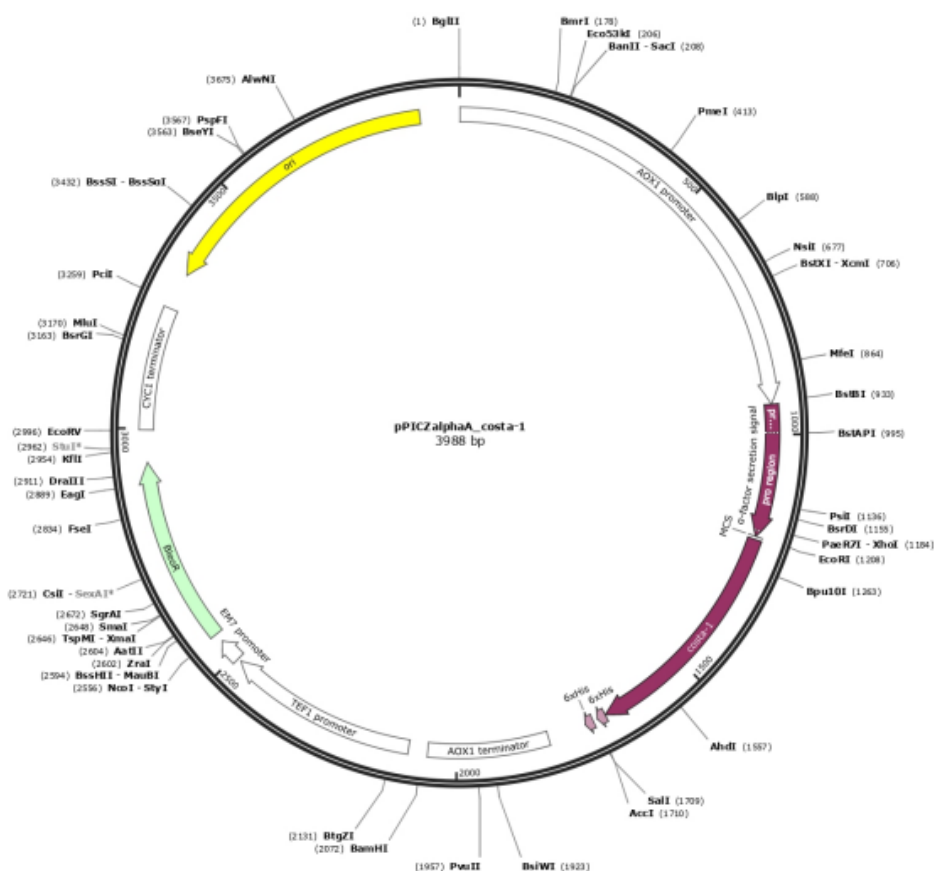
Antes do desenvolvimento das atividades descritas neste trabalho, o sistema de expressão heteróloga da rFTL em *Komagataella phaffii* já havia sido estabelecido no âmbito do Grupo de Biotecnologia Molecular e Estrutural (GBME). Essas etapas compreenderam a construção do vetor de expressão, obtenção da linhagem recombinante e ensaios preliminares de expressão, servindo como base para os experimentos de otimização realizados neste estudo.

5.2.1 Construção gênica do vetor de expressão da rFTL

A sequência codificante da rFTL foi construída com base na sequência madura da proteína nativa de *Artocarpus incisa* (UniProt acesso: A0A0R4I968), sendo inicialmente otimizada de acordo com a preferência de códons de *K. phaffii*. O gene sintético foi inserido em vetor de expressão pPICZαA, sob controle do promotor AOX1 e contendo a sequência de α-fator de *Saccharomyces cerevisiae* para direcionamento da secreção proteica.

Para possibilitar manutenção estrutural da rFTL, o peptídeo *linker* natural (TSSN), que não é clivado pela maquinária da levedura, foi substituído por um sítio de clivagem por trombina (GRG). Além disso, foi adicionada uma cauda de poli-histidina (*His-tag*) na região C-terminal da proteína, para permitir sua posterior purificação por cromatografia de afinidade. A construção final apresentou 768 pares de base, codificando uma proteína de 255 aminoácidos e massa molecular teórica de, aproximadamente, 27 kDa.

Figura 4 – Mapa do vetor pPICZ α A contendo gene da rFTL



Fonte: Dados obtidos do Grupo de Biotecnologia Molecular e Estrutural (GBME)

Legenda: Representação do vetor pPICZ α A inserido com gene da rFTL. A sequência gênica é destacada na imagem (costa-1) juntamente a outros componentes presentes no vetor recombinante.

5.2.2 Subclonagem do vetor em *Escherichia coli* DH5 α

Após a síntese do cassete gênico, o vetor recombinante foi introduzido em células quimiocompetentes de *Escherichia coli* DH5 α por transformação por choque térmico, com o objetivo de promover a amplificação e manutenção estável do plasmídeo. As bactérias transformadas foram selecionadas em meio LB

suplementado com Zeocina, marcador de resistência inserido no vetor recombinante, permitindo que o crescimento selecionado de colônias contendo o vetor recombinante.

Posteriormente, colônias positivas foram cultivadas para extração do DNA plasmidial, seguido de confirmação da presença do inserto por PCR, utilizando *primers* universais AOX1, obtendo-se um fragmento compatível com o tamanho esperado (~768 pares de base). Após a validação molecular, o plasmídeo foi linearizado com a enzima ScaI para posterior transformação em *Komagataella phaffii*.

5.2.3 Transformação em *Komagataella phaffii* X-33 e seleção dos transformantes

O plasmídeo linearizado foi introduzido na cepa *K. phaffii* X-33 por eletroporação, promovendo sua integração ao genoma da levedura. Após a recuperação celular, os transformantes foram selecionados em meio YPD-ágar contendo zeocina.

As colônias obtidas foram avaliadas quanto à presença do cassete de expressão e utilizadas para o estabelecimento da linhagem recombinante empregada no trabalho.

5.2.4 Ensaios preliminares de expressão

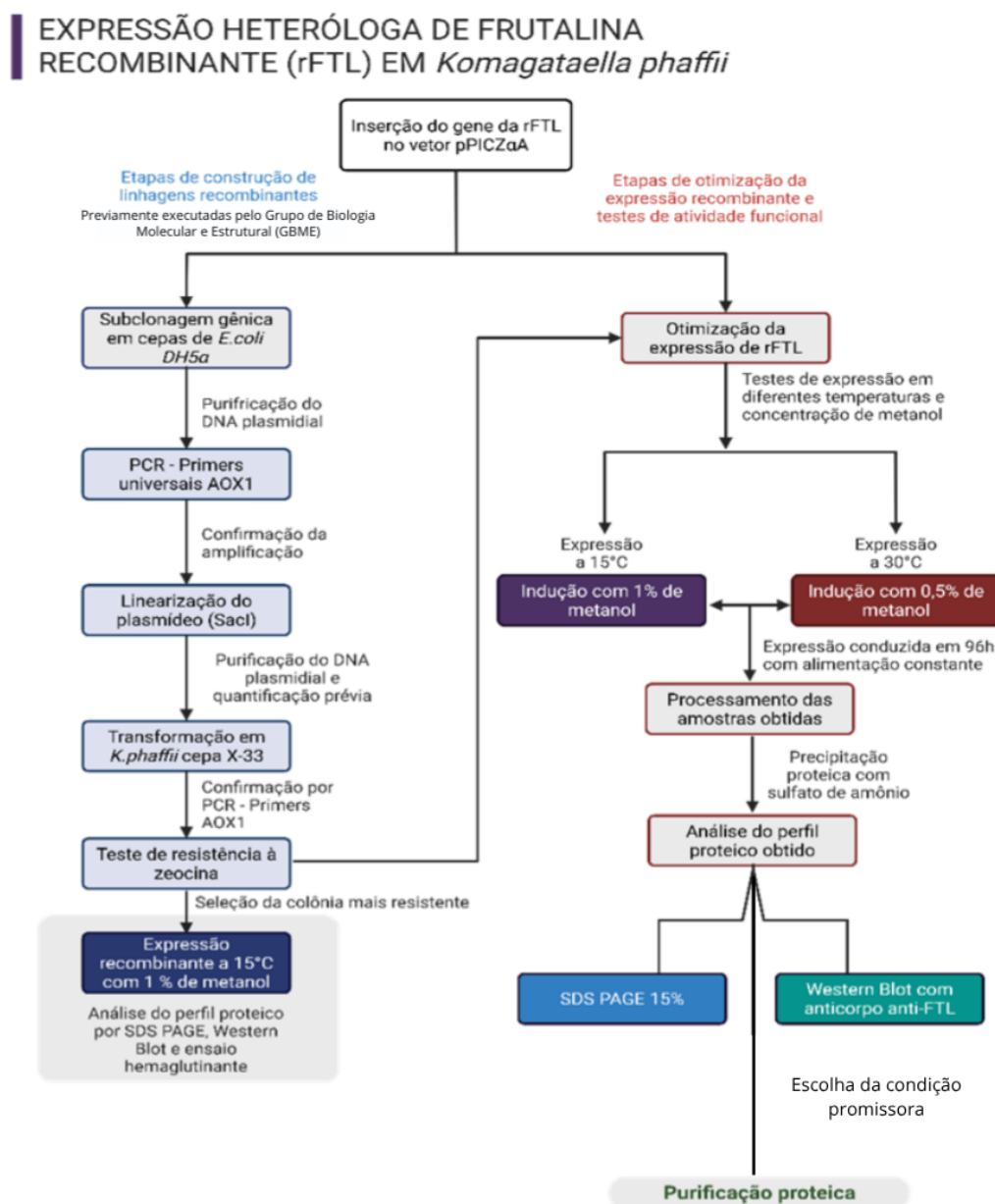
Antes do presente estudo, foram realizados ensaios preliminares de expressão da rFTL utilizando metanol como fonte de carbono indutora do promotor AOX1. Nessas avaliações iniciais, foi possível detectar a produção intracelular da proteína recombinante quando as culturas foram conduzidas a 15 °C com adição de 1% de metanol indutor.

Embora a proteína recombinante tenha sido detectada no lisado celular, não foi observada secreção eficiente para o sobrenadante de cultivo, mesmo com a presença da sequência sinal α -fator de *S. cerevisiae* no vetor de expressão. Esses resultados indicaram a necessidade de otimização das condições de expressão da rFTL, motivando o desenvolvimento do presente trabalho, cujo foco consistiu na avaliação de diferentes combinações de parâmetros de indução, visando aumentar a secreção e conservar a atividade funcional da proteína.

A Figura 5 apresenta um fluxograma que descreve todas as etapas metodológicas executadas previamente antes desse trabalho, bem como as etapas

subsequentes de otimização da expressão heteróloga em *Komagataella phaffii* e testes funcionais da atividade proteica.

Figura 5 – Metodologia experimental para otimização da expressão heteróloga da frutalina recombinante (rFTL) em *Komagataella phaffii*



Fonte: Elaborado pelo autor.

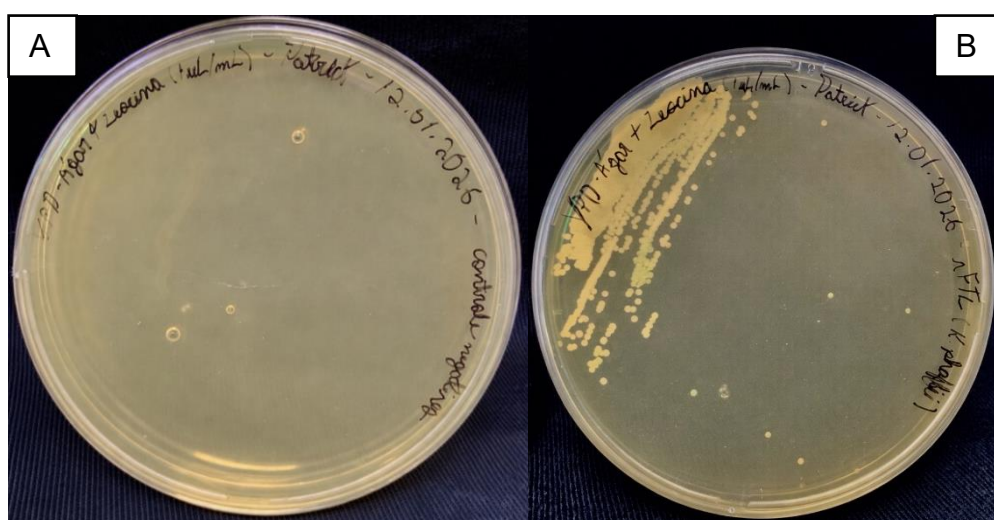
Legenda: O fluxograma ilustra todas as etapas prévias e subsequentes realizadas para a produção da rFTL. Os processos descritos a esquerda, em azul, representam todas as etapas realizadas para estabelecimento de linhagens recombinantes de *K. phaffii* cepa X-33 transformadas com o gene da frutalina recombinante. As etapas a direita constituem os processos realizados no presente trabalho, objetivando a otimização da produção proteica.

Após a obtenção da linhagem recombinante, foram realizados os experimentos que constituem o escopo deste trabalho, conforme descrito nas seções seguintes.

5.3 Plaqueamento de colônias transformadas

Para o crescimento de colônias de *Komagataella phaffii* transformadas com o vetor pPICZαA-rFTL foi feito o plaqueamento em meio YPD ágar (10 g/L de extrato de levedura; 20 g/L de peptona; 20 g/L de glicose; 2% de ágar) com acréscimo de Zeocina™ (100µg/mL) como marcador de seleção. A placa permaneceu a 30°C ao abrigo da luz por 2 dias, até o aparecimento de colônias isoladas.

Figura 6 – Placas com colônias de *K. phaffii* X-33 transformadas com gene da rFTL



Fonte: Elaborado pelo autor

Legenda: Placas de cultivo contendo células de *Komagataella phaffii* X-33 semeadas em meio YPD-ágar suplementado com Zeocina™. (A) Controle negativo correspondendo ao meio de cultura + marcador de seleção. (B) Colônias transformadas com vetor contendo o gene da rFTL, demonstrando crescimento seletivo e indicando a aquisição do marcador de resistência.

5.4 Indução da expressão de rFTL em *K. phaffii* X-33

Uma colônia isolada de *K. phaffii* transformada e resistente à Zeocina™ foi inoculada em 25 mL de meio BMGY (*Buffered Glycerol-Complex Medium*), com a seguinte composição: 10g/L de extrato de levedura; 20 g/L de peptona; 100 mM de tampão fosfato de potássio pH 6,0; 1,34 g/L de YNB (Yeast Nitrogen Bases); $4,0 \times 10^{-5}$ g/L de biotina; 10 g/L de glicerol. Em seguida, o cultivo foi incubado a 28°C, sob 180 rpm, até atingir a densidade óptica a 600 nanômetros (DO₆₀₀) entre 2,0 e 6,0 (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2010).

As células foram coletadas por centrifugação (3.000 rpm, 5 min), lavadas com água destilada autoclavada e ressuspensas em 5 mL de meio BMMY (*Buffered*

Methanol-Complex Medium), cuja composição é idêntica à do BMGY, exceto pela substituição do glicerol por metanol como fonte de carbono indutora.

Para os ensaios de expressão, 3 mL de pré-inóculo foram transferidos para erlenmeyers de 1 L contendo 143,5 mL de meio BMMY suplementado com 0,5% ou 1% de metanol, totalizando aproximadamente 150 mL de cultura. A DO₆₀₀ inicial foi ajustada para aproximadamente 1.0, e as culturas foram incubadas sob duas temperaturas de indução (15 °C e 30° C), ambas a 200 rpm.

A indução foi conduzida a 96 horas, com reposição diária de metanol a cada 24 horas para manutenção da concentração inicial. No mesmo intervalo, foram coletadas alíquotas de 1 mL para monitoramento da expressão proteica ao longo do cultivo. Após centrifugação (10.000, 5 min), as frações coletadas foram armazenadas a -80 °C para análises posteriores.

5.5 Precipitação do sobrenadante com sulfato de amônio a 90%

O cultivo final de *K. phaffii* obtido ao final do período total de expressão foi centrifugado a 12.000×g por 10 minutos, a 4°C, separando as frações solúvel e intracelular. A fração solúvel obtida foi submetida a precipitação fracionada com sulfato de amônio, em saturação crescente até atingir 90% de concentração final. O reagente foi adicionado ao sobrenadante de expressão gradualmente sob agitação contínua em banho de gelo, mantendo a temperatura em 4°C. O processo de precipitação proteica com sulfato de amônio foi conduzido *overnight*.

Em seguida, a amostra foi centrifugada a 16.000 ×g por 15 minutos a 4°C. O precipitado obtido foi então ressuspendido em água destilada previamente esterilizada por autoclavagem visando obter o menor volume possível. Então, a solução foi dialisada em membrana com poro de 12kDa, utilizando uma razão de volume de 1:2000, com trocas a cada 2 horas. Foram feitas 4 trocas contra 2 litros de água destilada e 1 troca contra tampão 2 litros de tampão PBS 20 mM, pH 7,4. Ao término da diálise, o volume obtido foi centrifugado em dispositivo de ultrafiltração para concentração do conteúdo proteico.

5.6 Lise celular

Para análise do conteúdo do pellet celular, obtido anteriormente após centrifugação, foi feita a lise mecânica utilizando microesferas de vidro. Após

descongelamento de cada um dos pellets, armazenados em freezer a -20°C, cada pellet foi ressuspensionado em 100 µL de tampão de lise, constituído de: 50 mM de fosfato de sódio, pH 7,4; 1 mM de PMSF; 1 mM de EDTA; glicerol 5%. Foi feita a homogeneização com o tampão descrito anteriormente e adicionado o mesmo volume de microesferas de vidro (0,5 mm de diâmetro). A lise celular foi conduzida em 8 ciclos de agitação vigorosa em vórtex por 30 segundos, seguidos de resfriamento em gelo por 30 segundos.

Após o rompimento celular, o conteúdo intracelular obtido foi coletado após centrifugação refrigerada a 4°C, conduzida a 10.000 ×g por 10 minutos. O sobrenadante, contendo proteínas solúveis, foi transferido para um novo recipiente e armazenado a -20°C para posterior análise.

5.7 Eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% (SDS-PAGE)

Para análise do perfil proteico de amostras do sobrenadante de expressão por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), as alíquotas de tempo de indução (0h a 96h) foram concentradas por precipitação com acetona gelada para concentração e remoção de contaminantes que pudessem atrapalhar a migração e observação de bandas compatíveis com a da Frutalina recombinante. Após etapa de precipitação, as amostras foram submetidas à eletroforese sob condições desnaturantes (com SDS) e redutoras (com agente redutor β-mercaptoetanol, conforme a metodologia descrita por Laemmli (1970)). As amostras foram preparadas em tampão Tris-HCl 500 mM pH 6,8 contendo SDS 1%, β-mercaptoetanol 0,1%, glicerol e azul de bromofenol 1%. Posteriormente, as amostras foram aquecidas a 100°C por 5 minutos e centrifugadas a 1000xg por 5 minutos em temperatura ambiente. Foi utilizado gel de empilhamento de 4% de acrilamida em tampão Tris-HCl 0,5M (pH 6,8) e gel de separação de 15% de poliacrilamida em tampão Tris-HCl 1,5M (pH 8,8). A corrida eletroforética foi conduzida à 70 mA e 120 V constantes. As bandas proteicas foram coradas com *Coomassie Brilliant Blue* R-250 a 0,05%, e posteriormente descoloridas com água quente até a visualização adequada das bandas e comparação do controle positivo (Frutalina nativa) com perfis obtidos nas amostras dos tempos de indução 0h, 24h, 48h, 72h, 96h.

5.8 Western Blot

Para realização da imunodeteção de rFTL pela técnica de Western Blot, as amostras contendo Frutalina recombinante e Frutalina nativa foram aplicadas em gel de poliacrilamida a 15%. Após a eletroforese, as proteínas presentes no gel foram transferidas para membrana de nitrocelulose utilizando o aparato de transferência TransBlot SemiDry (BioRad). Em seguida, a membrana foi incubada em solução de PBST 0,05% (tampão PBS 1X, pH 7,4 e Tween 20) e leite desnatado (Molico) a 5% para realização da etapa de bloqueio da membrana, *overnight* a 4°C. Posteriormente, a membrana foi incubada com anticorpo primário (policlonal anti-FTL) por 2 horas, e logo após, seguiu-se para incubação com anticorpo secundário *Anti-Rabbit IgG (Fc)*, *AP Conjugate* (Promega). Entre as incubações com os anticorpos, realizou-se 2 lavagens da membrana de nitrocelulose com tampão PBST 0,05% e 1 lavagem com tampão PBS 1X, pH 7,4. A reatividade foi detectada pela enzima fosfatase alcalina, conjugada ao anticorpo secundário, ao entrar em contato com a solução substrato *Western Blue Stabilized Substrate for Alkaline Phosphatase* (Promega).

5.9 Quantificação proteica por Bradford

A dosagem de proteínas solúveis foi realizada de acordo com a metodologia de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando como padrão de calibração do reagente a albumina bovina sérica (BSA) comercial. Foram feitas leituras em triplicatas em espectrofotômetro no comprimento de 595 nm para garantir a reprodutibilidade experimental, em temperatura ambiente a 25°C. Os dados obtidos a partir da quantificação foram tratados e analisados no software *GraphPad Prism 11* para melhor análise estatística dos resultados.

5.10 Purificação em matriz de níquel (IMAC)

A purificação da rFTL foi realizada por cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC), a partir de sua cauda de histidina. Utilizou-se a resina HisPur™ Ni-NTA Superflow Agarose adaptada para sistema de coluna de bancada. Inicialmente, 1 mL de coluna foi homogeneizado e transferido para coluna cromatográfica, o etanol de armazenamento foi removido e a resina foi equilibrada com 5 volumes de coluna (5 mL) de tampão de equilíbrio contendo 20 mM de fosfato de sódio, 300 mM de NaCl e 10 mM de imidazol, pH 7,4.

A amostra proteica foi previamente concentrada e ajustada com tampão de equilíbrio na proporção de 1:1, conforme recomendado pelo fabricante. Em seguida, a amostra foi aplicada lentamente na coluna e incubada a 4°C por 1 hora para permitir maior tempo de contato entre a proteína recombinante e a matriz. O eluato correspondente ao *flow-through* (FT) foi coletado para análise posterior. Após a etapa de adsorção, a coluna foi submetida a lavagem com 3 volumes de coluna contendo 20 mM de fosfato de sódio, 300 mM de NaCl e 20 mM de imidazol, pH 7,4, para remoção de proteínas fracamente ligadas à resina.

A eluição das proteínas ligadas foi realizada com tampão de eluição composto pela mesma concentração de fosfato de sódio e de NaCl, diferenciando apenas a concentração de 300 mM de imidazol, pH 7,4. Antes da coleta dos eluatos, a coluna foi incubada por 10 minutos a 4°C, para permitir máxima interação e remoção de proteínas ligadas. Todos os eluatos foram coletados separadamente e quantificados quanto ao seu teor de proteínas totais pela metodologia de Bradford e avaliados em SDS-PAGE.

Após a purificação, a resina foi regenerada com tampão de regeneração contendo 20 mM de MÊS e 100 mM de NaCl, pH 5,0. Posteriormente, a resina foi armazenada em solução de etanol 20% a 4°C.

5.11 Ensaio de atividade hemaglutinante

As amostras coletadas, e previamente concentradas, foram submetidas a ensaio de atividade hemaglutinante contra eritrócitos de coelho a 3%, segundo método descrito por Moreira & Perrone (1977). O ensaio foi conduzido em placas de 96 poços, com a seguinte composição em cada poço: 50 µL de solução tampão NaCl 0,15 M; 50 µL de amostras em diluições seriadas (1:2), com concentração inicial estabelecida (50 µg/mL); 50 µL de suspensão de eritrócitos de coelho a 3% (v/v). As análises foram realizadas em duplicatas.

Como controle positivo, foi utilizado a Frutalina nativa previamente purificada e com concentração igual a das amostras testadas. A solução tampão utilizada para realizar a diluição seriada da amostra foi utilizada como controle negativo. As placas foram montadas conforme a composição descrita anteriormente e incubadas a 37°C por 30 minutos, e posteriormente incubadas em temperatura ambiente ($\pm 25^\circ\text{C}$) por 30 minutos. A presença de hemaglutinação foi determinada visualmente pela

observação da formação de “tapete” homogêneo no fundo dos poços. Os títulos de hemaglutinação foram obtidos em termos de unidade hemaglutinante (H.U.) como sendo o inverso da maior diluição ainda capaz de apresentar hemaglutinação visível.

5.12 Análise da rFTL por Dispersão Dinâmica da Luz (DLS)

A interação entre a lectina rFTL e a imunoglobulina A1 secretória humana (slgA1) foi avaliada por meio de espalhamento dinâmico de luz (*Dynamic Light Scattering*, DLS). As análises foram realizadas utilizando a rFTL purificada, slgA1 isolada e misturas contendo ambas as proteínas em diferentes razões molares (0,5:1, 1:1 e 2:1), conforme o protocolo descrito por Costa (2025).

Para preparação dos complexos, foi fixada a concentração de slgA1, variando-se o volume de rFTL de acordo com a razão molar avaliada. O volume final de cada preparação foi ajustado para 1 mL com tampão Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4. Após a preparação, as amostras foram incubadas por 30 min a 4°C para permitir a formação dos complexos moleculares, em seguida, todas foram filtradas em filtro de seringa com retenção de 0,22 µm, para remoção de partículas insolúveis e agregados de grande porte. Dessa forma, as leituras foram submetidas em equipamento da linha *Zetasizer Advance (Malvern Panalytical)*.

Todas as medidas foram realizadas em triplicata técnica e os resultados expressos como distribuições de tamanho hidrodinâmico (*Z-average*) por intensidade e volume, além da determinação do Índice de Polidispersidade (PDI) de cada amostra. Os dados brutos foram tratados e analisados no software *GraphPad Prism 9.0*, para comparação das populações de partículas presentes nas amostras isoladas e nos complexos formados, permitindo avaliar alterações no tamanho hidrodinâmico e a heterogeneidade de partículas decorrentes da interação rFTL:slgA1.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

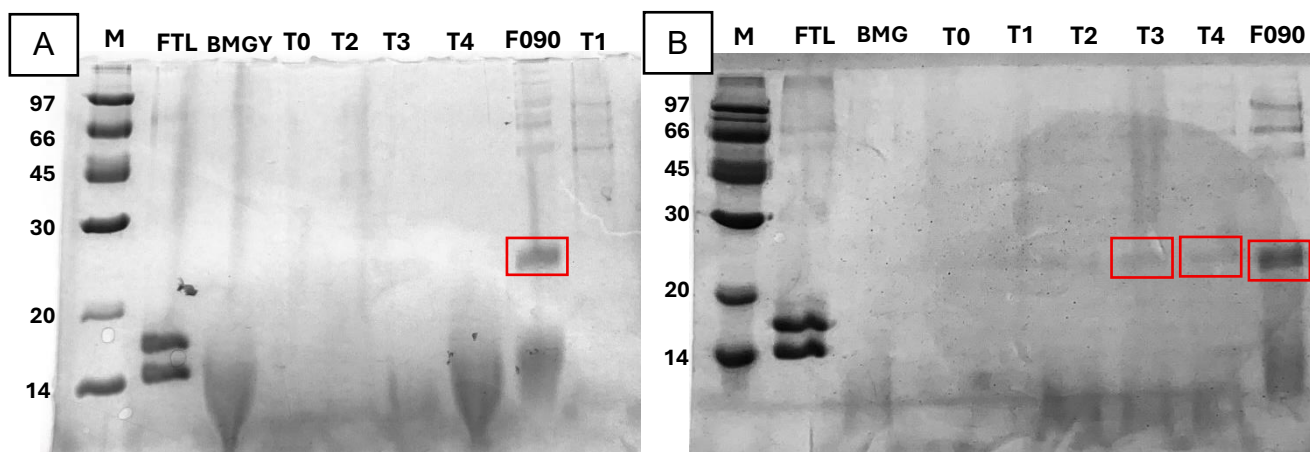
6.1 Avaliação das condições de expressão heteróloga da rFTL

6.1.1 Análise por SDS-PAGE das frações extracelulares

As frações extracelulares e intracelulares analisadas individualmente por SDS-PAGE quanto a presença da banda de massa teórica da rFTL (~27 kDa) indicaram a eficiência na produtividade proteica ao longo do tempo de expressão e permitiram avaliar o perfil de distribuição proteico em ambas as condições.

Na fração extracelular do cultivo realizado a 15°C, detectou-se a presença da rFTL nas amostras de expressão das diferentes condições de indutor avaliadas. Na indução com 1% de metanol foi possível observar banda com mobilidade eletroforética compatível com a rFTL na amostra do sobrenadante de expressão precipitado com sulfato de amônio numa saturação de 90% (F090), corroborando para interpretação de uma boa recuperação proteica pelo método empregado (Figura 6A). Já na indução com 0,5% de metanol, nota-se o surgimento de bandas compatíveis com a massa da Frutalina recombinante a partir de T3 (72 horas de expressão) (Figura 6B).

Figura 7 – Gel de eletroforese da expressão a 15°C (sobrenadante)



Fonte: Elaborada pelo autor

Legenda: A figura evidencia a corrida eletroforética em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de amostras obtidas a partir da expressão realizada numa temperatura de 15°C, com diferentes concentrações de metanol indutor (1% e 0,5%). (A) Observa-se o gel correspondente a expressão com 1% de indutor, onde é possível perceber a presença de banda proeminente na amostra F090, correspondendo a massa teórica da rFTL de ~27kDa. (B) Nota-se o aparecimento de bandas com mobilidade eletroforética compatível a rFTL a partir de T3 (72 horas de indução), indicando maior taxa de secreção proteica numa concentração menor de indutor (0,5%).

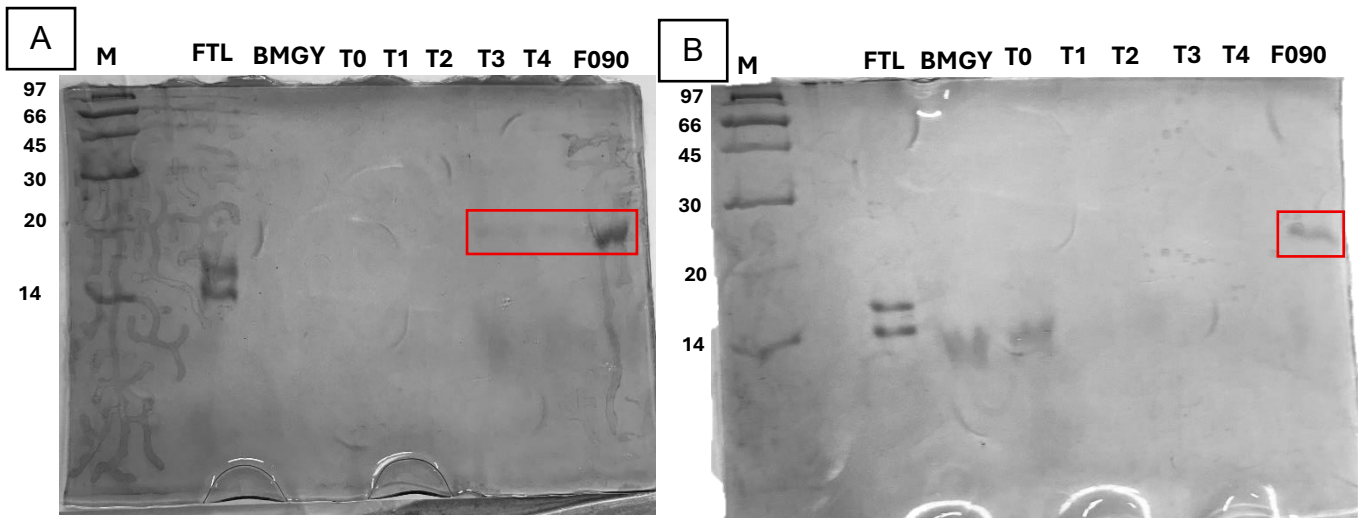
Esse resultado corrobora com estudos conduzidos por Dragosits e colaboradores (2009), onde estudos proteômicos do metabolismo de *K. phaffii* recombinante revelaram que menores temperaturas são capazes de aumentar até três vezes mais a produção do fragmento Fab da imunoglobulina 3H6. Os autores associaram uma menor temperatura de incubação com uma redução no estresse celular e no processamento de proteínas, a partir de uma diminuição na expressão de chaperonas moleculares e proteínas associadas ao enovelamento a temperaturas baixas (20°C). Esses resultados sugerem menor demanda de mecanismos de *refolding* proteico, suportando a hipótese de que temperaturas baixas são capazes de gerar mais estabilidade na fria de produção e enovelamento de proteínas, reduzindo o aparecimento de agregados e proteínas mal dobradas (DRAGOSITS *et al.*, 2009).

De maneira análoga, o processamento proteico da rFTL aparenta ter sido beneficiado em condições de menores temperaturas (15°C) somadas a uma menor concentração de indutor (0,5%), que se justifica numa sinergia entre o metabolismo desacelerado de *K. phaffii* com uma menor concentração de metanol, suficiente para produção recombinante e incapaz de gerar acúmulo de metabólitos tóxicos para a célula. Enquanto numa concentração maior de metanol (1%), a produção proteica pode sofrer diminuições em decorrência de acúmulos de compostos tóxicos para as células, incapazes de acompanhar a disponibilidade de metanol em decorrência de seu metabolismo desacelerado.

Estudos relatam que a diminuição da concentração de metanol indutor pode resultar em uma maior produtividade específica para proteínas recombinantes, enquanto concentrações elevadas tendem a aumentar o estresse metabólico e causar a inibição do crescimento celular (ORMAN; ÇALIK; ÖZDAMAR, 2009; KUPCSULIK ENG, 2004). Além disso, os primeiros estudos conduzidos para expressão da rFTL relataram sucesso ao utilizar concentrações mais baixas de metanol indutor (0,5%) e temperaturas menores (15°C) (OLIVEIRA, C. *et al.*, 2008a).

Em contrapartida, ao analisar a migração eletroforética por SDS PAGE das amostras obtidas da expressão a 30°C, observa-se um padrão oposto. Enquanto na indução realizada com 1% de metanol permitiu visualizar bandas compatíveis a rFTL a partir da amostra de T3 (Figura 7A), a indução com 0,5% de metanol demonstrou apenas na F090 uma banda referente a proteína recombinante (Figura 7B).

Figura 8 – Gel de eletroforese da expressão a 30°C (sobrenadante)



Fonte: Elaborada pelo autor

Legenda: A figura ilustra a corrida em gel de eletroforese (SDS-PAGE) das amostras advindas da expressão a 30°C, com duas condições de metanol indutor. (A) A imagem remete a expressão com 1% de metanol, sendo possível visualizar a presença de bandas em marcação crescente a partir de T3 (72 horas de indução), todas compatíveis com a massa da rFTL. (B) Observa-se a expressão realizada com 0,5% de metanol, com a marcação de banda na amostra da F090 referente a rFTL.

Tal cenário corrobora com os dados obtidos na expressão a 15°C, pois ao conduzir uma expressão em temperaturas mais elevadas, aumenta-se a taxa de síntese metabólica da levedura, conseqüentemente, levando a uma maior atividade da maquinaria de produção e enovelamento proteico (BEYGMORADI *et al.*, 2023a). Essa maior atividade, em tese, pode requerer uma maior concentração de indutor para uma produção eficaz da proteína recombinante, ao passo que em menores concentrações, a produção pode ser insuficiente.

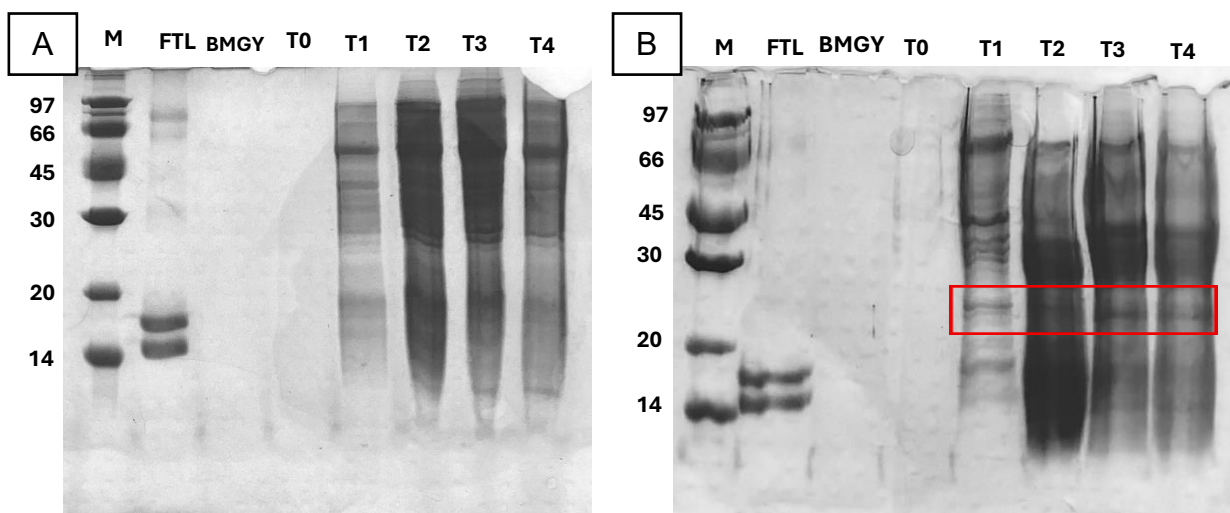
As análises por SDS-PAGE da fração extracelular da expressão recombinante da Frutalina, permitiram concluir que a secreção proteica ocorreu de maneira ativa. A banda de massa de ~27 kDa presente nos géis de eletroforese forneceram um indício do sucesso da secreção ativa da proteína recombinante, sendo necessário a soma de outras técnicas e metodologias para auxiliar na detecção precisa da rFTL.

6.1.2 Análise por SDS-PAGE das frações intracelulares

Ao analisar a fração intracelular das amostras obtidas a partir da expressão recombinante, foi possível entender o fluxo de produção e secreção proteica e determinar a eficácia da via de secreção de proteínas. Na expressão conduzida a

15°C, percebesse que na indução com 1% de metanol, não é observados bandas proeminentes na altura de ~27 kDa (Figura 8A), em contrapartida, na indução realizada a 0,5% de metanol, bandas de massa semelhantes a rFTL podem ser visualizadas a partir de T1 (24 horas de indução) (Figura 8B).

Figura 9 – Gel de eletroforese da expressão a 15°C (lisado)

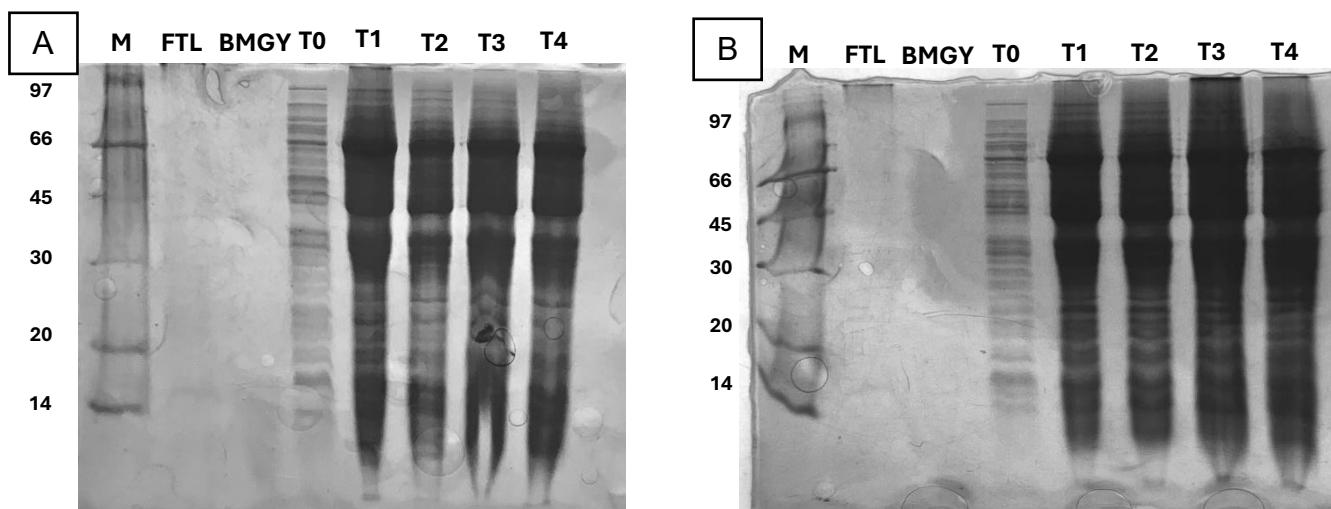


Fonte: Elaborado pelo autor

Legenda: Imagem retratando o perfil proteico obtido a partir da eletroforese feita com amostras do lisado celular da expressão a 15°C. (A) Tem-se o gel referente a expressão conduzida com 1% de metanol, não demonstrando presença de bandas compatíveis a rFTL. (B) Nota-se que no gel da expressão a 0,5% de metanol, há a presença e bandas com padrão de migração similar a rFTL a partir de T1 (24 horas de indução).

Já na expressão conduzida a 30°C, obteve-se um perfil proteico variado, com bandas diversas próximas a massa teórica de rFTL (Figura 9). Tanto a condição com 1% e 0,5% de metanol exibiram amplo perfil proteico das amostras do lisado celular, fator já esperado em detrimento da liberação das proteínas intracelulares nativas da levedura. Ambas as condições de expressão testadas sugerem a possibilidade da sobrecarga da maquinária secretória de proteínas ou ineficiência no reconhecimento da sequência sinal α -fator de *Saccharomyces cerevisiae*, acarretando numa retenção de parte do conteúdo proteico na fração intracelular, diminuindo a taxa de rendimento de proteínas secretadas.

Figura 10 – Gel de eletroforese da expressão a 30°C (lisado)



Fonte: Elaborado pelo autor

Legenda: Géis de eletroforese demonstrando perfil proteico obtido a partir da lise do pellet celular de amostras obtidas da expressão a 30°C. (A) Encontra-se a imagem referente a expressão realizada com 1% de metanol, com bandas próximas a massa da rFTL porém não isoladas. (B) Encontra-se o gel de eletroforese referente a expressão com 0,5% de metanol, também apresentando conteúdo proteico difuso próxima a massa migratória da rFTL.

A obtenção de proteínas recombinantes ativas depende intrinsecamente da manutenção adequada de seu processo de dobramento tridimensional. Durante a indução, as cadeias proteicas imaturas competem entre mecanismos de enovelamento funcional e agregação proteica, podendo resultar na formação de estruturas insolúveis, porém biologicamente ativas. O processo de dobramento proteico segue uma cinética de primeira ordem, enquanto a agregação proteica é regida por uma cinética de segunda ordem, o que favorece a formação de agregados intracelulares de proteínas recombinantes (BEYGMORADI et al., 2023; Hoffmann et al., 2000).

Lin-Cereghino et al. Observaram que determinadas regiões do pró-peptídeo do α -fator podem limitar a eficiência secretória de proteínas heterólogas, sendo possível aumentar significativamente os níveis de secreção por meio de modificações específicas nessa sequência sinal. Tais dados sugerem que o α -fator pode representar um gargalo no processo secretório, causando dificuldades no transporte da proteína pela via secretória (LIN-CEREGHINO, G. P. et al., 2013).

De maneira similar, estudos conduzidos por Ito et al. Verificaram que mutações pontuais no pró-peptídeo do α -fator reduziram o direcionamento de proteínas para compartimentos intracelulares, resultando num aumento significativo da secreção. Os

autores discorrem que determinadas interações entre proteínas heterólogas e o sinal MF- α favorecem a retenção intracelular, agregação ou degradação antes de ocorrer o endereçamento proteico para via secretória (ITO *et al.*, 2022). Esse estudo leva a hipótese de que a eficiência da secreção de proteínas recombinantes pelo MF- α de *S. cerevisiae* tem certo grau de dependência com características próprias da proteína heteróloga expressa.

Diante disso, a redução da temperatura de indução pode desacelerar a taxa de síntese proteica, proporcionando mais tempo para que as proteínas atinjam conformações estruturalmente estáveis antes que cheguem a formar precipitados intracelulares. Entretanto, temperaturas excessivamente baixas também podem comprometer a atividade de chaperonas moleculares envolvidas em mecanismos de enovelamento proteico (RABBANI *et al.*, 2011; SHIH; LAI, 2007).

Paralelamente, concentrações menores de indutor, podem reduzir os níveis transcricionais da proteína e diminuir a sobrecarga da maquinaria celular, reduzindo a probabilidade de agregação proteica. Dessa forma, a determinação experimental das condições de cultivo capazes de equilibrar o rendimento e funcionalidade biológica tornam-se necessárias para aumentar a obtenção de proteínas recombinantes solúveis e ativas (SHIH; LAI, 2007).

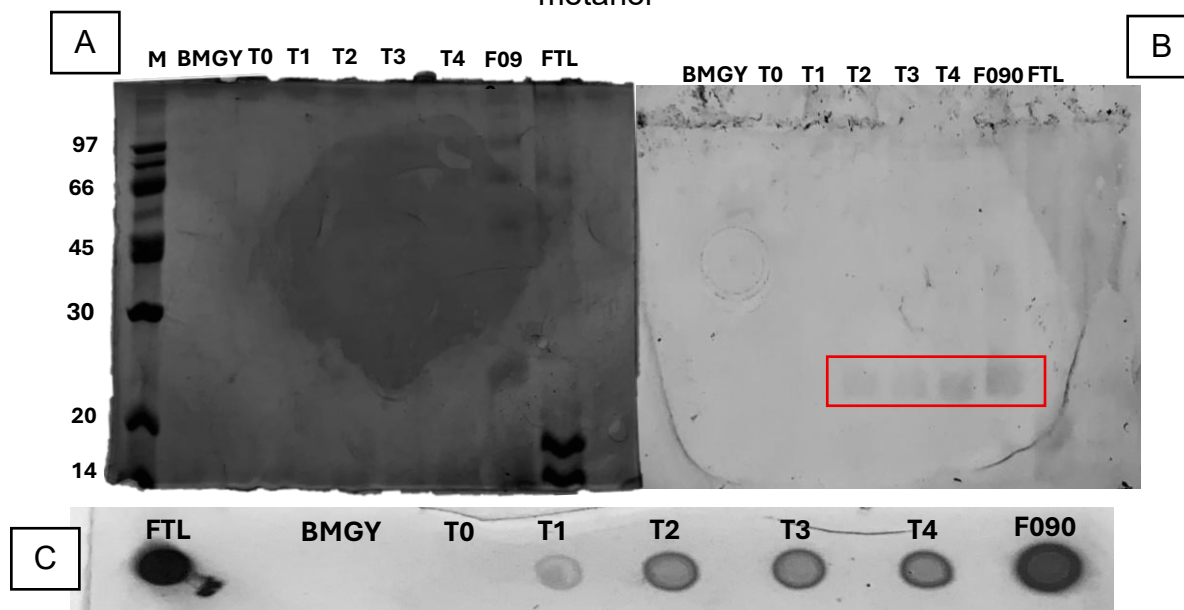
No contexto da expressão da rFTL, esses achados fornecem possíveis causas para retenção de parte do conteúdo proteico produzido em compartimentos internos da levedura. A Frutalina se trata de uma lectina de complexa montagem estrutural de processamento proteolítico pós-traducional, sendo possível que a maquinaria de *K. phaffii* sofra uma sobrecarga durante a manutenção de seu enovelamento proteico, encaminhando parte do conteúdo produzido para compartimentos de degradação ou induzindo a formação de agregados intracelulares. Nesse sentido, embora a análise por SDS-PAGE tenha evidenciado bandas compatíveis com a massa molecular esperada da rFTL, ainda é necessário realizar a identificação específica das proteínas presentes nas alíquotas de expressão. Dessa forma, as mesmas amostras foram submetidas à análise por Western Blot utilizando anticorpo anti-FTL.

6.2 Confirmação da identidade da Frutalina recombinante

6.2.1 Imunodeteccção por Dot Blot e Western Blot da fração extracelular

Na expressão a 15°C, obteve-se a confirmação da presença da Frutalina recombinante nas alíquotas testadas com Dot Blot (Figura 12C). Com isso, ao seguir para análise por Western Blot, observou-se que na indução com 0,5% de metanol obteve-se uma reatividade do anticorpo com amostras de T2 a T4, aumentando sua reatividade na amostra concentrada da F090 (Figura 12B). A reação do controle positivo (Frutalina nativa) confirma que o anticorpo policlonal utilizado consegue reconhecer epítomos específicos preservados da estrutura nativa na proteína recombinante produzida. A migração eletroforética no gel espelho utilizado para o Western Blot atesta que a banda analisada previamente por eletroforese é, de fato, uma assinatura migratória da proteína recombinante produzida, confirmando sucesso em sua secreção (Figura 12 A).

Figura 11 – Detecção da rFTL nas amostras da expressão a 15°C – 0,5% de metanol

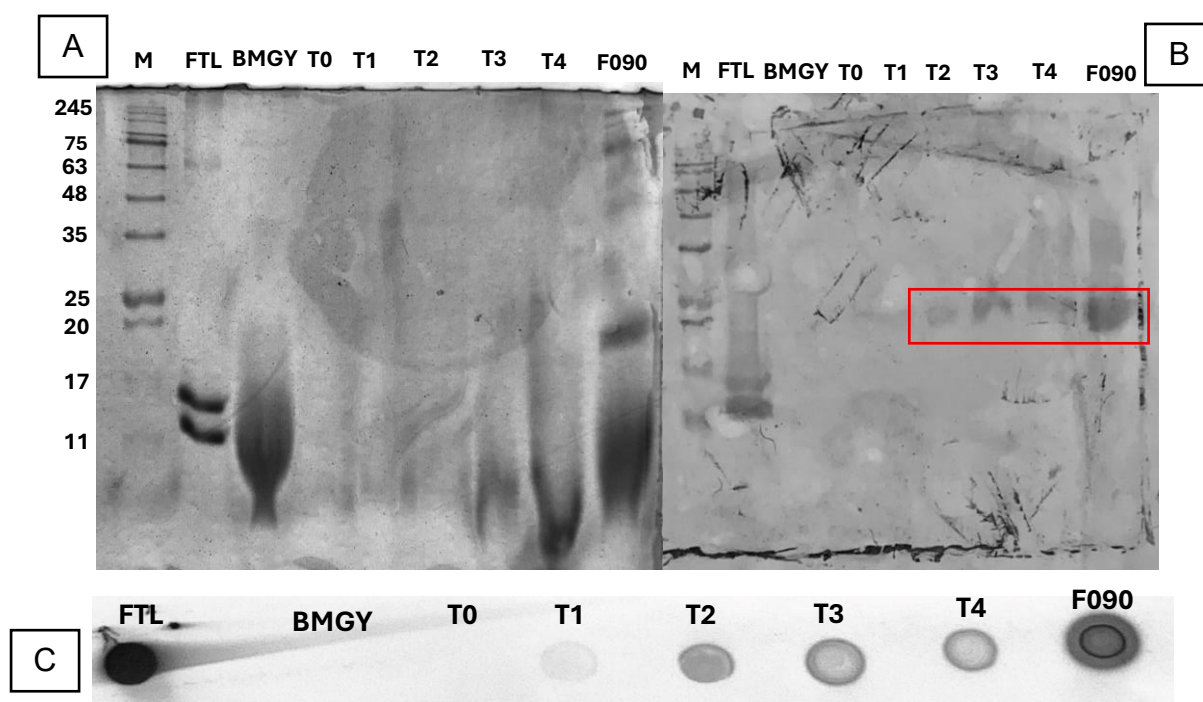


Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: A figura mostra dados provenientes da análise da produção da rFTL por Western Blot na condição de 15°C – 0,5% de metanol. Na figura A tem-se o gel de eletroforese (SDS-PAGE) utilizado como espelho do padrão de migração de proteínas das amostras de expressão. A figura B mostra a membrana de Western Blot com bandas reativas a detecção da Frutalina recombinante, surgindo de maneira crescente de T2 até a F090. Na imagem C está a membrana utilizada para o teste preliminar de Dot Blot, reforçando a reatividade do anticorpo anti-rFTL com as amostras testadas.

Paralelamente, a detecção proteica das amostras resultantes da expressão realizada com 1% de metanol também atestou a presença da proteína recombinante. Na figura 13C, observa-se o teste preliminar utilizando o anticorpo anti-FTL em Dot Blot, exibindo reatividade pelo controle positivo (rFTL) e com marcação crescente nas amostras advindas da expressão. Diante dessa confirmação prévia, pode-se realizar ensaio de Western Blot para as amostras da expressão a 1% (Figura 13B), e os resultados mostraram um padrão similar com o que foi observado na indução com 0,5% de metanol, uma reatividade iniciando em após 48 horas de indução (T2) e se mantendo crescente até o fim da expressão (96 horas). Pelo gel espelho utilizado (Figura 13^a) em comparação com a detecção em Western Blot, também se nota um padrão de altura de bandas em concordância com os resultados da análise por SDS-PAGE, confirmando uma expressão positiva da rFTL nessa condição.

Figura 12 – Detecção da rFTL nas amostras da expressão a 15°C – 1% de metanol



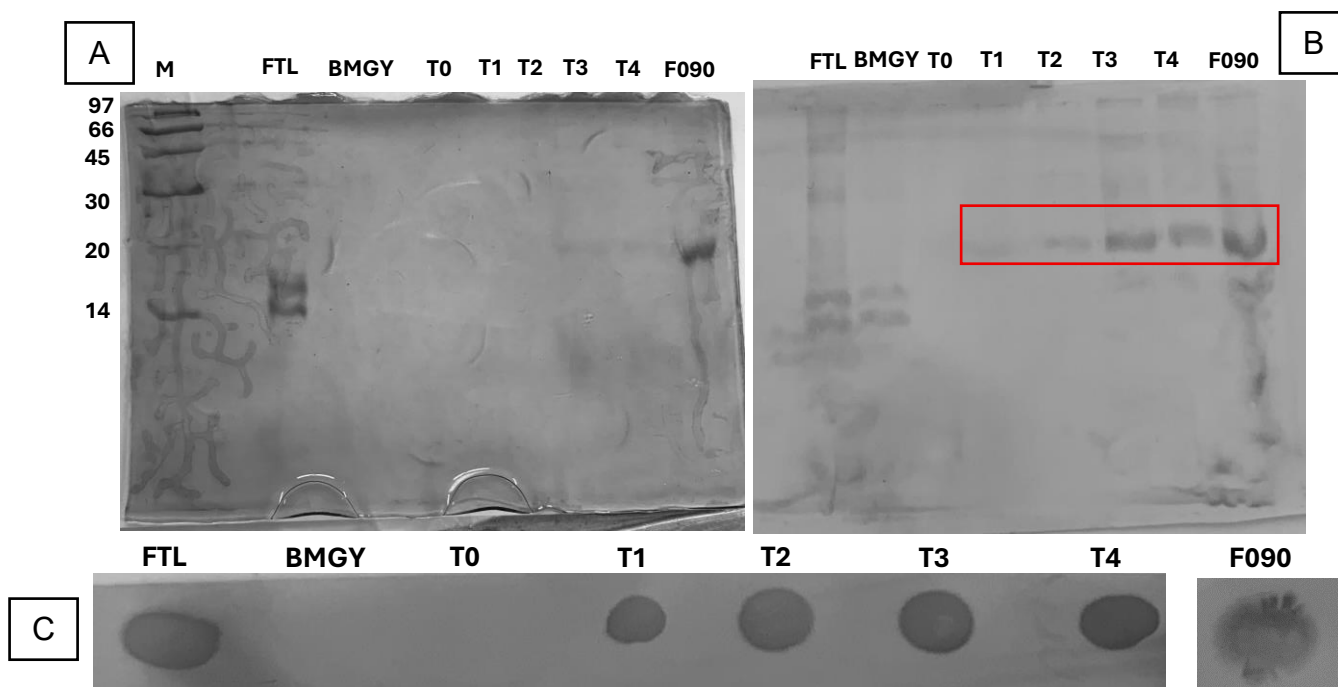
Fonte: Elaborado pelo autor

Legenda: A figura mostra dados provenientes da análise da produção da rFTL por Western Blot na condição de 15°C – 1% de metanol. Na figura A tem-se o gel de eletroforese (SDS-PAGE) utilizado como espelho do padrão de migração de proteínas das amostras de expressão. A figura B mostra a membrana de Western Blot com bandas reativas a detecção da Frutalina recombinante, surgindo de maneira crescente de T2 até a F090, de maneira semelhante a condição de 0,5% de metanol. Na imagem C está a membrana utilizada para o teste preliminar de Dot Blot, reforçando a reatividade do anticorpo anti-rFTL com as amostras testadas.

Apesar da diferença na leve diferença na quantificação proteica das condições 1% e 0,5% expressas a 15°C, pode-se concluir que ambas apresentam comportamento similar de expressão da rFTL, iniciando sua produção a partir de 48 horas de cultivo e aumentando progressivamente a secreção proteica até o fim da indução. Em contrapartida, a expressão realizada a temperatura de 30°C evidenciou divergências consideráveis quanto à produtividade da proteína recombinante.

Enquanto a condição com maior concentração de metanol (1%) exibiu extensa produtividade proteica, podendo detectar a presença de Frutalina recombinante a partir de T1 (24 horas de indução) com aumento de reatividade de bandas até T4 (Figura 14), a expressão a 30°C com 0,5% de metanol demonstrou intensa marcação na fração precipitada do sobrenadante de cultivo (Figura 15).

Figura 13 – Detecção da rFTL nas amostras da expressão a 30°C – 1% de metanol



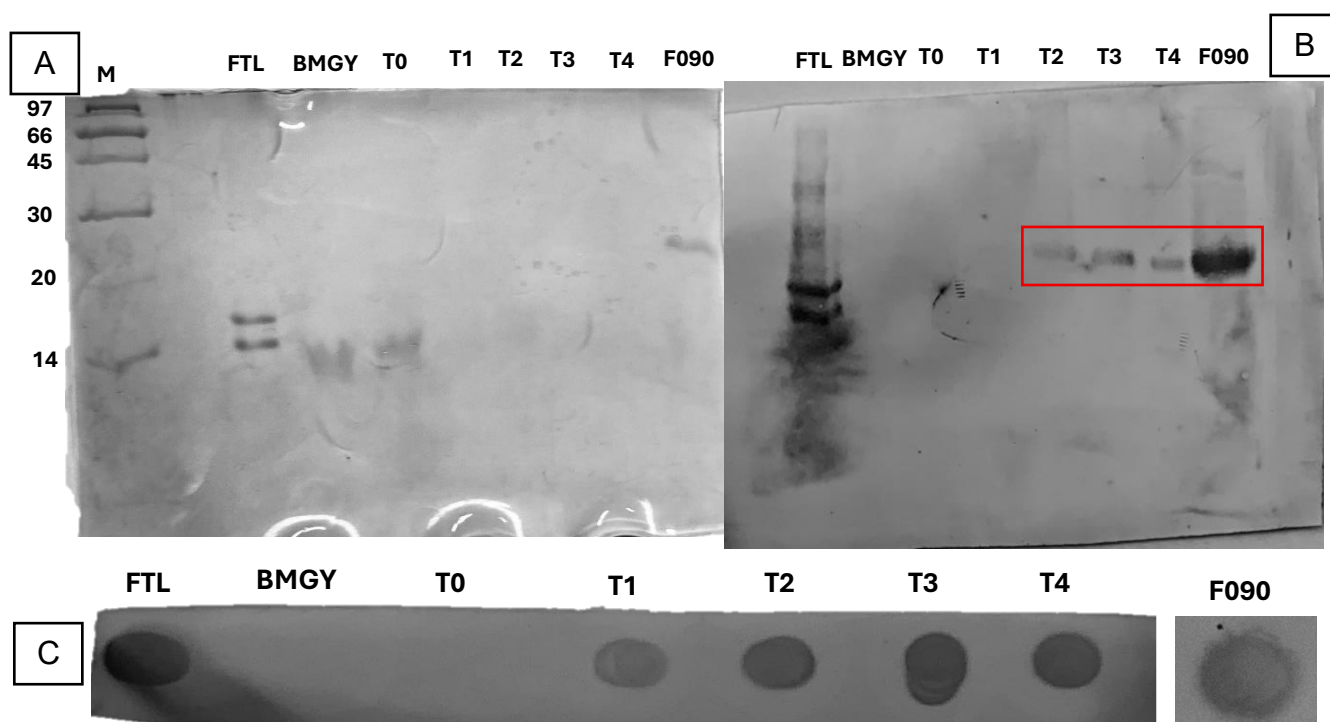
Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: A figura mostra dados advindos da análise da produção da rFTL por Western Blot a 30°C com 1% de indutor. Na figura A observa-se o gel de eletroforese (SDS-PAGE) utilizado como referência do padrão de migração de proteínas das amostras de expressão. A figura B mostra a membrana de Western Blot com bandas reativas a detecção da Frutalina recombinante, com aparecimento desde T1 a T4. Na imagem C está a membrana utilizada para o teste preliminar de Dot Blot, reforçando a reatividade do anticorpo anti-rFTL com as amostras testadas.

É possível notar a presença de bandas compatíveis com a amostra do controle positivo (FTL) na amostra do controle de cultivo de expressão (BMGY). Esse fato

revela o possível extravasamento do conteúdo do poço de eletroforese da amostra do controle positivo ou má polimerização da malha eletroforética, permitindo a migração de proteínas para o poço ao lado. A ausência da marcação imunoquímica na membrana de Dot Blot pelo anticorpo anti-FTL na amostra de BMGY sustenta essa teoria de contaminação entre os poços, alinhado com a marcação nítida do controle positivo de Frutalina nativa isoladamente. Determinado padrão não é replicado na detecção imunoquímica da expressão na mesma temperatura com 0,5% de indutor.

Figura 14 – Detecção da rFTL nas amostras da expressão a 30°C – 0,5% de metanol



Fonte: Elaborado pelo autor

Legenda: Análise da produção proteica por Western Blot, com detecção imunoquímica das amostras da expressão a 30°C – 0,5% de metanol com anticorpo policlonal anti-FTL. Na figura A observa-se o gel de eletroforese (SDS-PAGE) utilizado como referência do padrão de migração de proteínas das amostras de expressão. A figura B mostra a membrana de Western Blot com bandas reativas a detecção da Frutalina recombinante, demonstrando intensa detecção proteica na amostra da F090, em concordância com a intensa concentração de proteínas averiguada por Bradford. Na imagem C está a membrana utilizada para o teste preliminar de Dot Blot, reforçando a reatividade do anticorpo anti-rFTL com as amostras testadas.

Dessa maneira, é possível concluir que a expressão da rFTL foi conduzida com sucesso, evidenciando bom funcionamento da construção recombinante. Na otimização de condições de expressão, foi determinado que a temperatura de 30°C esboçou maior rendimento proteico quando combinada a uma menor concentração de metanol indutor (0,5%), ocasionando numa intensa disponibilidade da rFTL no

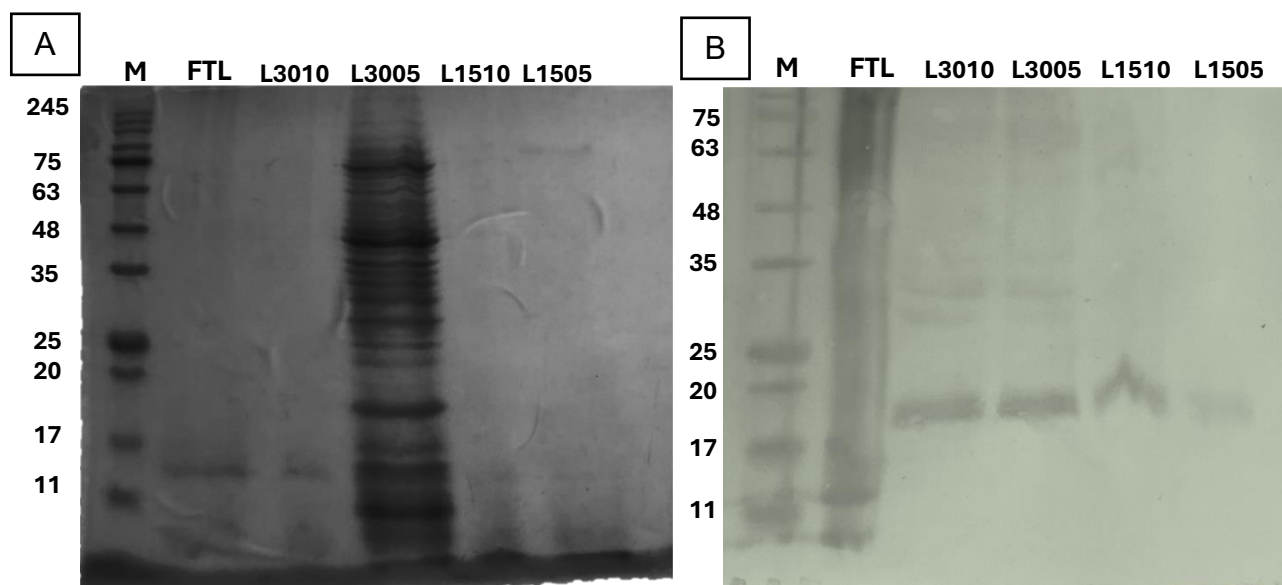
sobrenadante de expressão, sendo possível recuperar consideravelmente o conteúdo proteico obtido.

6.2.3 Imunodeteção por Western Blot da fração intracelular

Para identificação de retenção proteica na fração intracelular, submeteu-se as amostras do lisado celular a imunomarcção por Western Blot. Para garantir maior conteúdo proteico para o experimento, foram utilizados apenas os tempos finais de expressão (T4) de cada um dos experimentos. Para garantia da especificidade de reação do anticorpo utilizado, utilizou-se a Frutalina nativa (FTL) como controle positivo.

A partir desse experimento, pode-se confirmar a retenção de isoformas proteicas da Frutalina não recombinante na fração intracelular (Figura 16). Nas amostras da expressão a 30 graus (L3010 e L3005) observa-se a marcação de bandas intensas, com a presença de bandas mais fracas mais acima, o que pode significar a obtenção de isoformas proteicas diversas da rFTL com o processamento proteolítico incompleto, como a remoção do peptídeo sinal, causando um incremento em sua massa migratória em eletroforese. Já na expressão a 15 graus (L1510 e L1505) também se obteve a imunorreacção com isoformas da rFTL, de maneira mais branda se comparada a expressão a temperatura mais alta.

Figura 15 – Detecção por Western Blot em amostras da fração intracelular



Fonte: Elaborado pelo autor

Legenda: Avaliação da produção proteica recombinante obtida nas amostras do lisado celular. Na figura A, é mostrado o gel de eletroforese utilizado como referência para migração de proteínas em Western Blot, evidenciando a marcação de bandas diversas. Já na figura B, nota-se a imunorreação química entre o anticorpo anti-FTL com amostras do lisado celular de todas as expressões, com bandas intensamente marcadas na expressão a 30 graus (nas amostras L3010 e L3005) do que na expressão a 15 graus (L1510 e L1505). L3010: Expressão a 30 °C – 1% metanol; L3005: Expressão a 30°C – 0,5% de metanol; L1510: Expressão 15°C – 1% de metanol; L1505: Expressão a 15°C – 0,5% de metanol.

No ambiente intracelular, o processamento de proteínas recombinantes se sustenta no funcionamento da maquinária de Golgi e no retículo endoplasmático, com a retenção de proteínas nesse compartimento, processamentos pós-traducionais necessários para obtenção de isoformas maduras pode ser desacelerado por estresses metabólicos induzidos pela alta taxa de síntese proteica, normalmente associado a temperaturas mais altas (BEYGMORADI et al., 2023b). Esse fator pode corroborar para existência de isoformas proteicas de maior massa molecular, associadas a um reconhecimento ineficiente do MF- α , impedindo sua secreção efetiva e retenção em compartimentos intracelulares.

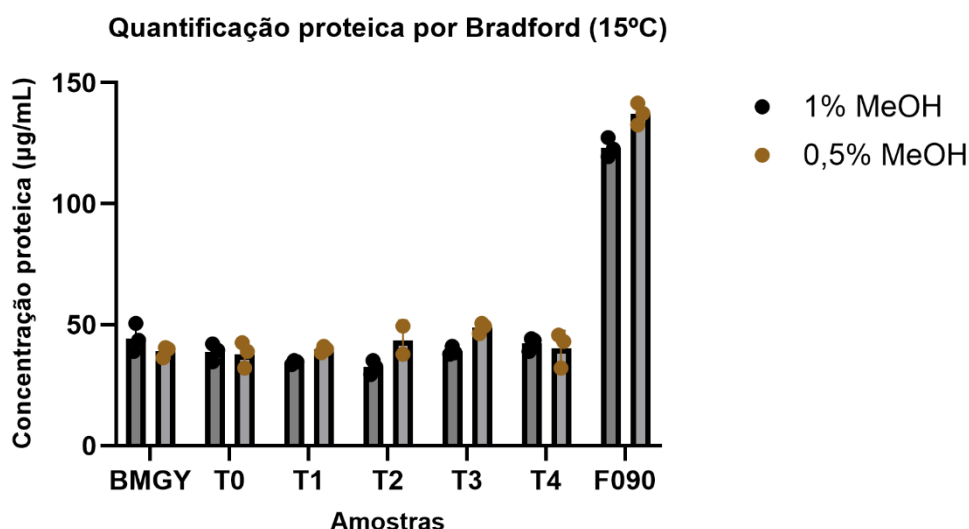
Também é possível notar que a condição a 30°C induzida com 0,5% de metanol exibiu extenso conteúdo proteico detectada por SDS-PAGE, ao passo que as demais condições não apresentaram abundância comparável. Tal achado pode inferir que a técnica de lise mecânica do pellet celular ocorreu de maneira mais eficiente nessa condição, induzindo a uma maior liberação de proteínas intracelulares nativas do metabolismo de *K. phaffii*.

Diante do exposto, as quatro condições permitiram a detecção da rFTL por técnicas imunológicas, indicando que a expressão heteróloga ocorreu com sucesso. Entretanto, diferenças importantes foram observadas quanto ao rendimento proteico total, o perfil de migração em SDS-PAGE e a intensidade das bandas detectadas por Western Blot. A integração desses resultados permitiu identificar a condição de 30° e 0,5% de metanol como a mais promissora para a obtenção da rFTL solúvel, uma vez que apresentou melhor recuperação proteica e confirmação da identidade da proteína recombinante nas metodologias empregadas. Dessa forma, para complementar as evidências obtidas, realizou-se a quantificação do conteúdo proteico total por meio do ensaio de Bradford, permitindo comparar objetivamente a recuperação de proteínas nas diferentes condições de expressão.

6.3 Comparação do rendimento proteico por Bradford

Na análise da fração extracelular da expressão a 15°C, avaliou-se a concentração de proteínas totais presentes nas amostras de expressão (de 0 a 96 horas), bem como a fração proteica concentrada com sulfato de amônio (F090). Quando se comparam as diferentes induções realizadas, percebe-se que a indução com 1% de metanol sofre um decréscimo de seu conteúdo proteico total entre T0 (0 horas de indução) e T2 (48 horas de indução) (Figura 10). Esse padrão não é replicado na indução realizada a 0,5% de metanol, que exibe um conteúdo proteico mais linearizado e crescente. Na recuperação de proteínas totais na F090, observa-se um maior conteúdo proteico total na expressão com menor concentração de indutor.

Figura 16 – Quantificação de proteínas totais da expressão a 15°C



Fonte: Elaborado pelo autor

Legenda: A imagem mostra a quantificação de proteínas totais presentes nas amostras de sobrenadantes de expressão a 15°C, comparando diferentes induções com variação na concentração de metanol (1% e 0,5%). BMGY: Controle de cultivo; T0: 0 horas de indução; T1: 24 horas; T2: 48 horas; T3: 72 horas; T4: 96 horas; F090: Fração de sobrenadante precipitada com sulfato de amônio de 0 – 90%.

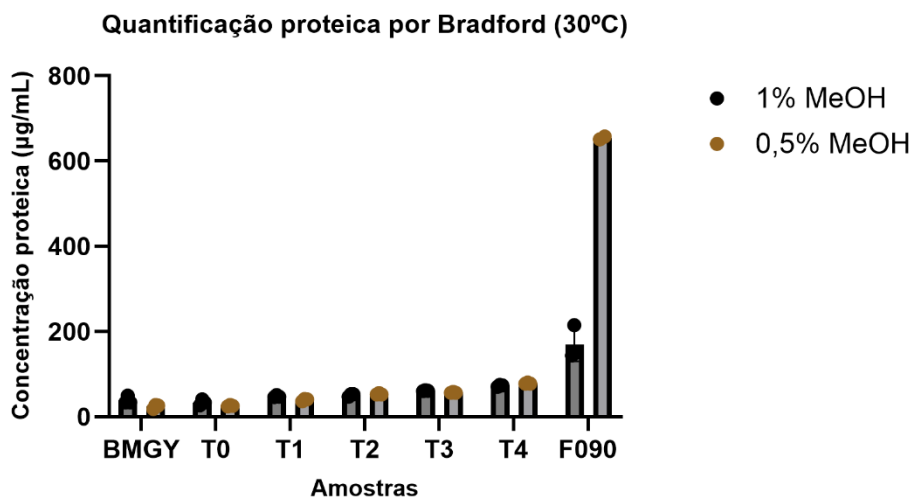
A concentração de metanol é um dos principais fatores que influenciam na expressão de proteínas recombinantes em *K. phaffii*, uma vez que o promotor AOX1 é induzido diretamente por esse substrato. Entretanto, já é relatado na literatura que concentrações excessivas de indutor podem afetar a fisiologia celular e comprometer diretamente a produtividade proteica. De acordo com Bustos et al. (2022), o

metabolismo do metanol em *K. phaffii* gera compostos tóxicos como formaldeído e peróxido de hidrogênio, que juntos são extremamente tóxicos para célula (BUSTOS *et al.*, 2022). Essa toxicidade gera um estresse oxidativo nas células de levedura, possíveis danos celulares e podem comprometer diretamente o funcionamento de organelas, dentre elas, as envolvidas no enovelamento proteico.

Dessa forma, interpreta-se que a redução na concentração de proteínas totais entre T0-T2, representam um cenário de estresse causado pelo acúmulo de metanol no meio de expressão, que somado a uma temperatura mais baixa, pode ter levado a uma menor produtividade proteica pela baixa assimilação das células de *K. phaffii* a uma concentração maior de metanol. A prevalência do crescimento linear da concentração proteica nas amostras de expressão com 0,5% de metanol reforça a essa hipótese.

Na análise da determinação do teor de proteínas totais das amostras de expressão incubadas a 30°C, nota-se elevada concentração proteica nas amostras referentes a F090 em comparação com as anteriores. As alíquotas referentes aos tempos de expressão apresentaram padrão linear e crescente em ambas as condições testadas com diferentes concentrações de indutor, entretanto, na F090 obtida da expressão de 0,5% de metanol, obteve-se um valor cerca de 4,7 vezes maior do que a expressão conduzida a 1% de metanol (Figura 11). Esse dado é favorável à imunodeteccção realizada por Western Blot, que averiguou uma intensa marcação na amostra da F090 na mesma condição.

Figura 17 – Quantificação de proteínas totais da expressão a 30°C



Fonte: Elaborado pelo autor

Legenda: A imagem mostra a quantificação de proteínas totais presentes nas amostras de sobrenadantes de expressão a 30°C, comparando diferentes induções com variação na concentração de metanol (1% e 0,5%). BMGY: Controle de cultivo; T0: 0 horas de indução; T1: 24 horas; T2: 48 horas; T3: 72 horas; T4: 96 horas; F090: Fração de sobrenadante precipitada com sulfato de amônio de 0 – 90%. Nota-se que a F090 a 0,5% obteve uma concentração de, aproximadamente, 654 µg/mL, cerca de 4,7 vezes maior do que a F090 a 1% (137,1 µg/mL).

Apesar de maiores temperaturas apresentarem maiores riscos de indução a formação a agregados proteicos, 30°C constitui-se uma temperatura ótima para sistemas de expressão como *K. phaffii*, podendo alcançar elevados títulos proteicos para produção de determinadas proteínas heterólogas. Joseph et. Al (2022), por exemplo, observaram que a produção da taumatina II recombinante foi cerca de duas vezes superior a temperaturas de 30°C do que a 20°C ou 25°C, embora maior densidade celular tenha sido observada em menores temperaturas (JOSEPH; AKKERMANS; IMPE, VAN, 2022).

A literatura mostra que, em geral, temperaturas mais baixas podem favorecer etapas de maturação proteicas por aliviar o estresse da maquinaria de síntese proteica. No entanto, nem sempre isso é benéfico, pois uma menor temperatura também está atrelada a uma menor biomassa final, levando a uma diminuição da produtividade final do processo (JEONG, G. M. *et al.*, 2014). Diante dos diversos estudos acerca da otimização e produção de proteínas recombinante, compreende-se que a produtividade é dependente de um balanço entre crescimento celular e capacidade de processamento proteico. Um desbalanço nesse equilíbrio pode inferir na má formação de proteínas e no acúmulo no retículo endoplasmático, causando estresse celular e encaminhando para vias de degradação.

Nesse contexto, a detecção por SDS-PAGE e a quantificação do conteúdo de proteínas totais das amostras obtidas da expressão recombinante, permitem inferir que há evidências fortes que indicam a produção e secreção ativa da rFTL nas condições testadas. A integração dos resultados obtidos por SDS-PAGE, Western Blot e Bradford permitiu detectar a expressão e secreção da rFTL em todas as condições testadas, no entanto, a condição a 30 °C com 0,5% de metanol exibiu um conjunto de dados mais consistentes, evidenciando maior recuperação proteica, bandas compatíveis com a rFTL e intensa marcação imunológica. Dessa forma, essa

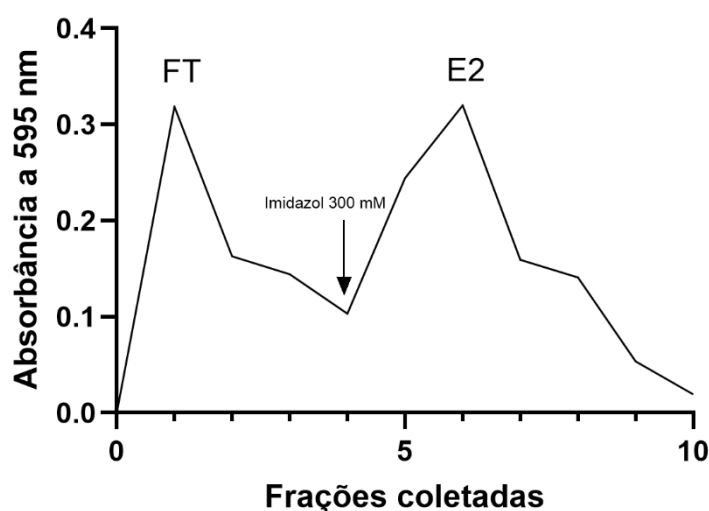
condição foi considerada como a mais promissora para expressão da rFTL e selecionada para as etapas seguintes de purificação e de teste de atividade funcional.

6.4 Purificação da rFTL por IMAC

A purificação da Frutalina recombinante foi realizada utilizando a fração F090 obtida na condição de expressão selecionada (30°C e 0,5% de metanol), previamente concentrada em dispositivo de ultrafiltração. O monitoramento da recuperação proteica durante a IMAC foi realizado por meio da quantificação das frações coletadas utilizando o método de Bradford. Essa abordagem foi adotada devido às limitações encontradas na interpretação do cromatograma obtido por absorbância em 280 nm, uma vez que elevadas concentrações de imidazol empregadas durante a etapa de eluição podem contribuir significativamente para o sinal de absorbância, dificultando a distinção entre os picos correspondentes à proteína recombinante e aqueles decorrentes da composição do tampão.

A Figura 17 apresenta o perfil de recuperação proteica das frações coletadas ao longo da purificação, determinado a partir de leituras de absorbância a 595 nm obtidas no ensaio de Bradford, realizando triplicatas para cada amostra. A análise permitiu identificar as frações com maior conteúdo proteico e acompanhar a eluição de proteínas que interagiram com a matriz.

Figura 18 – Cromatograma da purificação da rFTL em IMAC



Fonte: Elaborado pelo autor

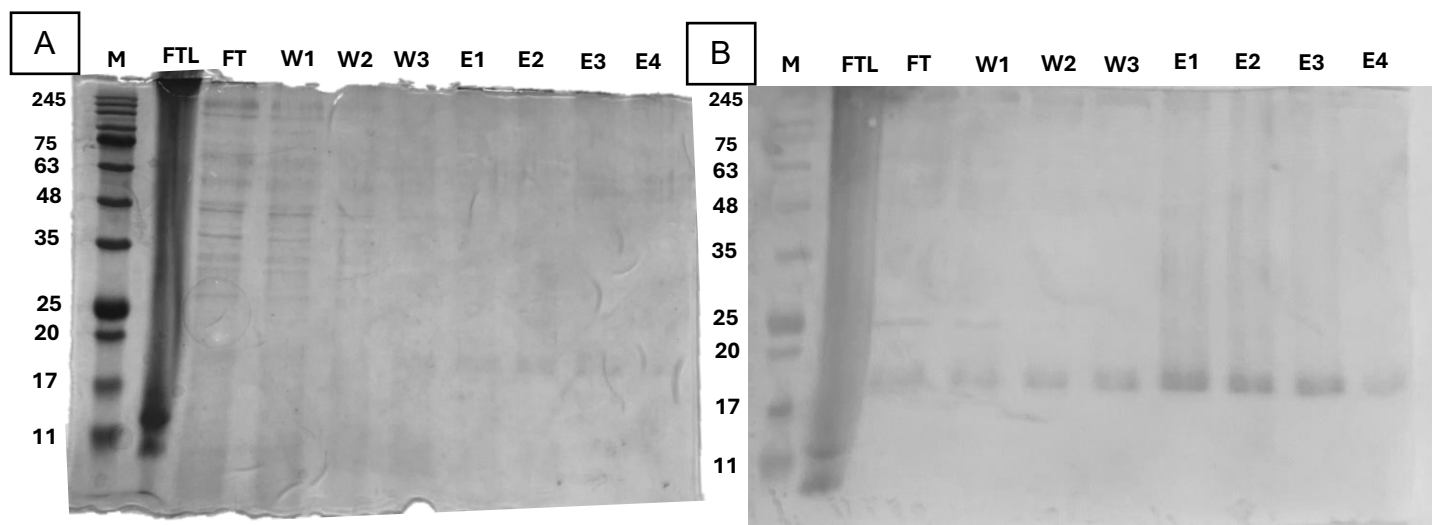
Legenda: Cromatograma referente a purificação da rFTL em matriz de afinidade com *His-tag*, utilizando a proteína produzida na condição de expressão de maior rendimento identificado (30°C e 0,5% de metanol). Na imagem, FT (*Flow-Through*) corresponde ao pico não retido na matriz cromatográfica

após a incubação com a proteína recombinante a 4°C, enquanto E2 (*Elution 2*) corresponde a fração eluída de maior pico de absorbância em 595 nm, determinada a partir de triplicata técnica.

A análise do perfil de eluição obtido por IMAC sugere que uma fração considerável das proteínas presentes na amostra não interagiu com a matriz cromatográfica, sendo recuperada predominantemente nas etapas anteriores de lavagem. Esse comportamento pode ser atribuído à presença de proteínas endógenas secretadas por *K. phaffii*, mas também pode indicar que parte da rFTL produzida não apresentou eficiente interação com íons níquel imobilizados na coluna.

Por outro lado, observou-se um aumento expressivo do conteúdo proteico recuperado nas frações de eluição, especificamente na segunda alíquota eluída, sugerindo a retenção de proteínas na matriz IMAC. A presença de rFTL nessas frações foi posteriormente detectada por SDS-PAGE e Western Blot utilizando anticorpo anti-FTL (Figura 18).

Figura 19 – Análise do perfil proteico da rFTL purificada por IMAC



Fonte: Elaborado pelo autor

Legenda: Perfil proteico obtido pela purificação em matriz de afinidade a *His-tag*, identificado por SDS-PAGE e Western Blot com anticorpo policlonal anti-FTL. Na imagem A, encontra-se o perfil eletroforético exibido nas alíquotas de purificação, sendo possível notar a presença de bandas semelhantes a rFTL nas alíquotas de eluição E1-E4, indicando possível presença da proteína recombinante nas amostras. Na imagem B, nota-se a confirmação da proteína recombinante a partir de imunorreação com anticorpo específico. A presença abundante da rFTL em todas as amostras pode indicar que a acessibilidade da *His-tag* é limitada.

Pela avaliação do perfil proteico obtido nas alíquotas de purificação, pode-se confirmar que a proteína recombinante foi produzida, secretada e recuperada com sucesso após etapa de cromatografia. Entretanto, a recuperação parcial da proteína

de interesse sugere que nem todas as moléculas produzidas apresentaram interação com a resina de níquel.

A eficiência da purificação por IMAC depende diretamente de fatores como a acessibilidade dos resíduos de histidina à superfície das proteínas, uma vez que a coordenação entre grupos proteicos e íons metálicos ocorre somente quando esses resíduos são eficientemente expostos ao solvente. Com isso, alterações conformacionais referentes ao dobramento proteico, oligomerizações ou modificações pós-traducionais não específicas, podem reduzir a acessibilidade da cauda de polihistidina aos íons metálicos e reduzir sua eficiente recuperação (CHEUNG; WONG, J. H.; NG, 2012; GABERC-POREKAR; MENART, 2001).

Esse comportamento de proteínas recombinantes purificadas por IMAC já foi descrito na literatura, no qual a exposição parcial ou a internalização da *His-tag* resultaram na diminuição da afinidade pela resina e a consequente perda de proteínas em etapas anteriores à eluição. Além disso, características intrínsecas da *K. phaffii* também podem contribuir para recuperação parcial das proteínas recombinantes produzidas, diante das modificações em padrões de glicosilação, distintos daqueles observados em organismos vegetais, influenciando em um enovelamento incorreto, secreção incompleta e mudanças de conformação. Estratégias recentes de engenharia de proteínas demonstraram que a acessibilidade estérica de regiões terminais influencia significativamente na secreção e recuperação das proteínas recombinantes produzidas (DALVIE *et al.*, 2022).

Diante desse cenário, a purificação da rFTL por IMAC foi efetiva e permitiu a obtenção de frações isoladas da proteína recombinante, no entanto, os resultados sugerem que uma parcela das proteínas produzidas não foi ativamente recuperada por IMAC, sugerindo possível necessidade do emprego de outras técnicas de purificação adicionais que permitam aumentar a eficiência de captura e recuperação da rFTL.

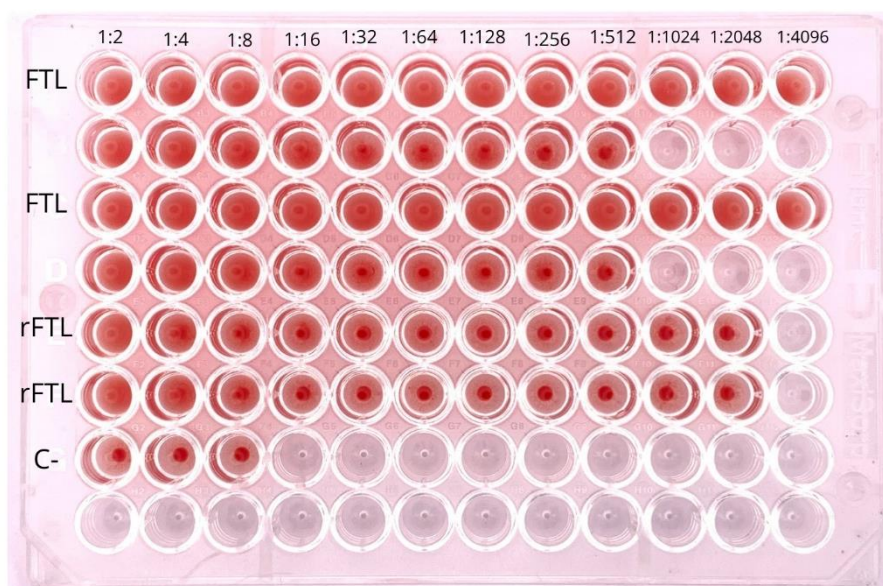
6.5 Teste de atividade hemaglutinante

Com objetivo de averiguar a funcionalidade biológica da rFTL produzida em *K. phaffii*, foi realizado o ensaio de atividade hemaglutinante com eritrócitos de coelho a 3% (v/v). Foi testada a amostra da rFTL obtida a partir da purificação por IMAC e

previamente concentrada e também se utilizou a amostra da FTL nativa, como controle positivo para o ensaio.

A amostra de FTL nativa apresentou título hemaglutinante elevado, mantendo atividade até a diluição 1:32.768 (2^{15} HU), resultado compatível com relatos da literatura, nos quais a Frutalina nativa pode atingir títulos de até 2^{17} HU (COSTA et al., 2025). Em contraste, a rFTL apresentou atividade hemaglutinante até a diluição de 1:2, com perda da aglutinação nas diluições subsequentes.

Figura 20 – Ensaio de hemaglutinação rFTL purificada e expressa em *K. phaffii*



Fonte: Elaborado pelo autor

Legenda: Ensaio de atividade hemaglutinante da rFTL purificada por IMAC, ajustada para uma concentração de 50 µg/mL, utilizando FTL nativa como controle positivo, na mesma concentração. As amostras foram submetidas a diluições seriadas de razão 1:2 e incubadas com suspensão de eritrócitos de coelho a 3% (v/v). Como controle negativo (C-), foi utilizado o tampão de diluição das amostras (NaCl 0,15 M). O ensaio foi realizado em duplicata.

Embora significativamente menor à observada na proteína nativa, esse resultado reflete um indício de manutenção parcial da atividade biológica, diferindo de estudos anteriores nos quais a rFTL produzida em *Komagataella phaffii* não apresentou atividade hemaglutinante detectável (OLIVEIRA et al., 2008; WANDERLEY et al., 2013). A redução da atividade pode estar relacionada a múltiplos fatores inerentes ao sistema de expressão. Em *K. phaffii*, a ocorrência de hipermanosilação de N-glicanos e diferenças no processamento pós-traducional em relação às células vegetais podem modificar a conformação tridimensional da proteína ou restringir parcialmente a acessibilidade ao CRD, comprometendo a formação de

pontes entre eritrócitos necessárias para hemaglutinação (OLIVEIRA et al., 2014; DALVIE et al., 2022).

Além disso, a rFTL utilizada neste ensaio manteve a cauda de poli-histidina em sua extremidade C-terminal, uma vez que esta não foi removida após a purificação. Embora amplamente empregada para purificação de proteínas recombinantes, a permanência dessa sequência adicional pode alterar a organização conformacional da proteína, interferir na dinâmica oligomérica ou promover impedimento estérico próximo a regiões funcionalmente relevantes, reduzindo a eficiência da interação multivalente necessária para aglutinação celular. (TERPE et al., 2003; Young et al., 2012).

Outros parâmetros, como diferenças no padrão de oligomerização e baixa concentração de proteínas na amostra, também podem contribuir para a redução da atividade hemaglutinante. Entretanto, a detecção de um título hemaglutinante, embora baixo, representa um avanço em relação a estudos anteriores com a rFTL produzida em *K. phaffii*, sugerindo que a proteína obtida preserva, parcialmente, sua capacidade de reconhecer carboidratos. Essa hipótese foi investigada por meio de análises de espalhamento dinâmico de luz (DLS), empregadas para avaliar a interação da rFTL com a glicoproteína slgA1 em solução.

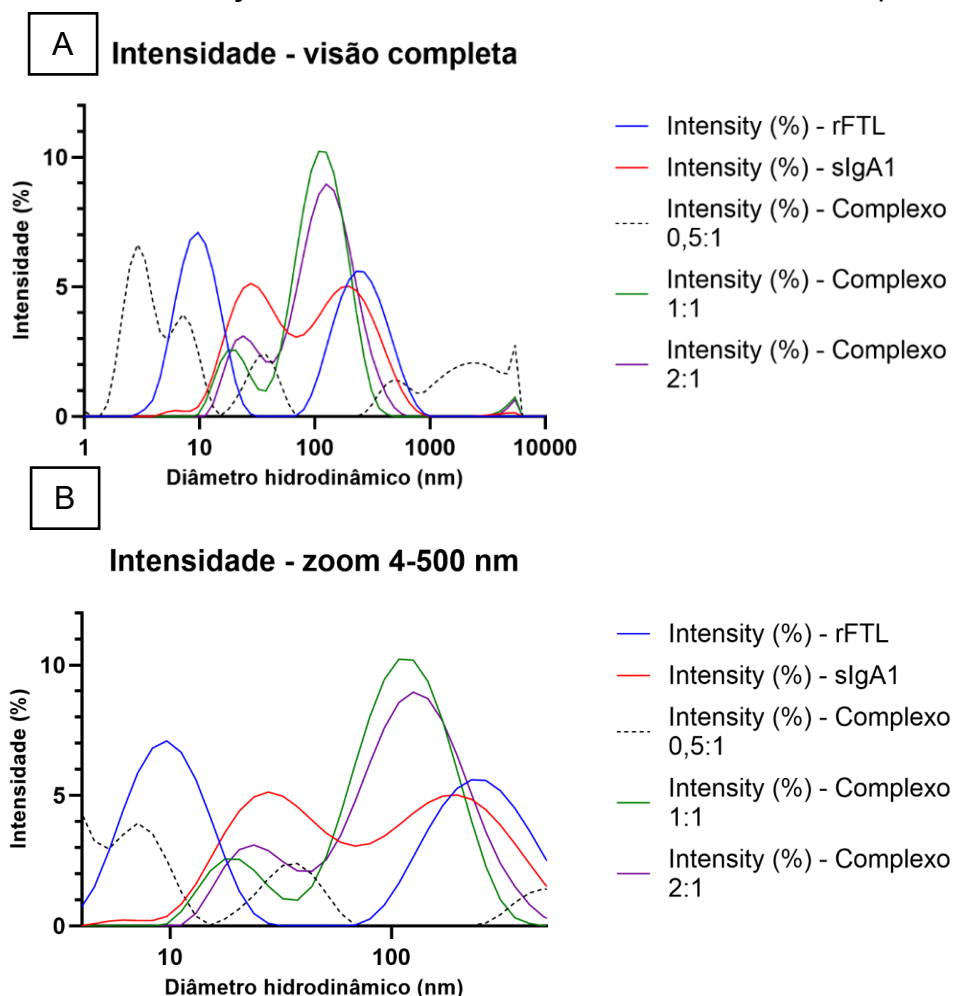
6.6 Análise da formação do complexo rFTL:slgA1 por DLS

A análise das distribuições por intensidade dos controles individuais revelou perfis bimodais tanto para rFTL quanto para slgA1 isolados (Figura 19). A rFTL apresentou pico principal centrado em $10,26 \pm 0,38$ nm, compatível com a forma tetramérica esperada para a proteína (~60 kDa), em concordância com o Rh (raio hidrodinâmico) de 11 nm reportado por Costa *et al.* (2025) para a FTL nativa purificada por matriz de afinidade (COSTA, R. C. C. *et al.*, 2025). Um segundo pico de maior intensidade foi detectado em $\sim 281,39 \pm 11,35$ nm, correspondente a possíveis agregados proteicos de alto peso molecular. A elevada distribuição dessa população na distribuição por intensidade é consequência direta da dependência da intensidade do espalhamento de luz ao diâmetro elevado à sexta potência ($I \propto D^6$), no qual partículas maiores tendem a espalhar luz de forma desproporcionalmente intensa, dominando o sinal mesmo quando presentes em pequenas quantidades (STETEFELD; MCKENNA; PATEL, 2016). A presença desses agregados é esperada

para proteínas recombinantes e sugere necessidade de etapa adicional de polimento cromatográfico, como uso de matrizes de exclusão por tamanho (SEC), de forma a não comprometer a interpretação dos dados de formação de complexos.

Já para o slgA1 isolado, obteve-se um pico principal em, aproximadamente, $33,39 \pm 3,00$ nm, compatível com a molécula dimérica secretória (~400 kDa), e pico secundário em $\sim 217,30 \pm 24,31$ nm, refletindo a presença de formas oligoméricas diversas ou de agregados. A heterogeneidade do slgA1 em solução já é documentada na literatura e atribuída à sua natureza molecular complexa, somada a coexistência de formas poliméricas em equilíbrio dinâmico (ALMOGREN *et al.*, 2009; DONALD *et al.*, 2022). Os valores obtidos são compatíveis aos reportados por Costa *et al.* (2025) para a mesma preparação de slgA1 de colostro humano, validando a qualidade e a consistência da amostra utilizada.

Figura 21 – Distribuição de diâmetro hidrodinâmico das amostras por intensidade



Fonte: Elaborado pelo autor

Legenda: Dados de análise do diâmetro hidrodinâmico por intensidade das amostras testadas em DLS. Na imagem A, é retratada a distribuição de diferentes amostras em ampla faixa de tamanhos, sendo possível verificar a distribuição geral. Na figura B, observa-se a mesma imagem com foco em uma faixa mais estreita de tamanho, onde nota-se os principais picos de intensidade detectados para os controles rFTL (0,25 mg/mL) e slgA1 (0,25 mg/mL) e para os complexos testados.

Ao analisar as distribuições por intensidade dos complexos rFTL:slgA1, observou-se uma reorganização expressiva do perfil de tamanhos em relação aos controles testados (Figura 19). O complexo na razão molar 1:1 apresentou pico dominante em $\sim 126,54 \pm 9,99$ nm, com deslocamento significativo em relação ao pico principal aferido para os controles de slgA1 (~ 33 nm) e da rFTL livre (~ 10 nm). Também é possível notar que a população de possíveis agregados de rFTL em ~ 281 nm, desapareceu completamente nos complexos, sugerindo que esses agregados participaram da formação de estruturas supramoleculares ou foram desorganizados durante a interação com o slgA1. Já na razão 2:1, o pico principal avançou levemente para $\sim 146,86 \pm 35,79$ nm, com maior variabilidade entre as réplicas analisadas, indicando a formação de complexos com maiores indícios de heterogeneidade.

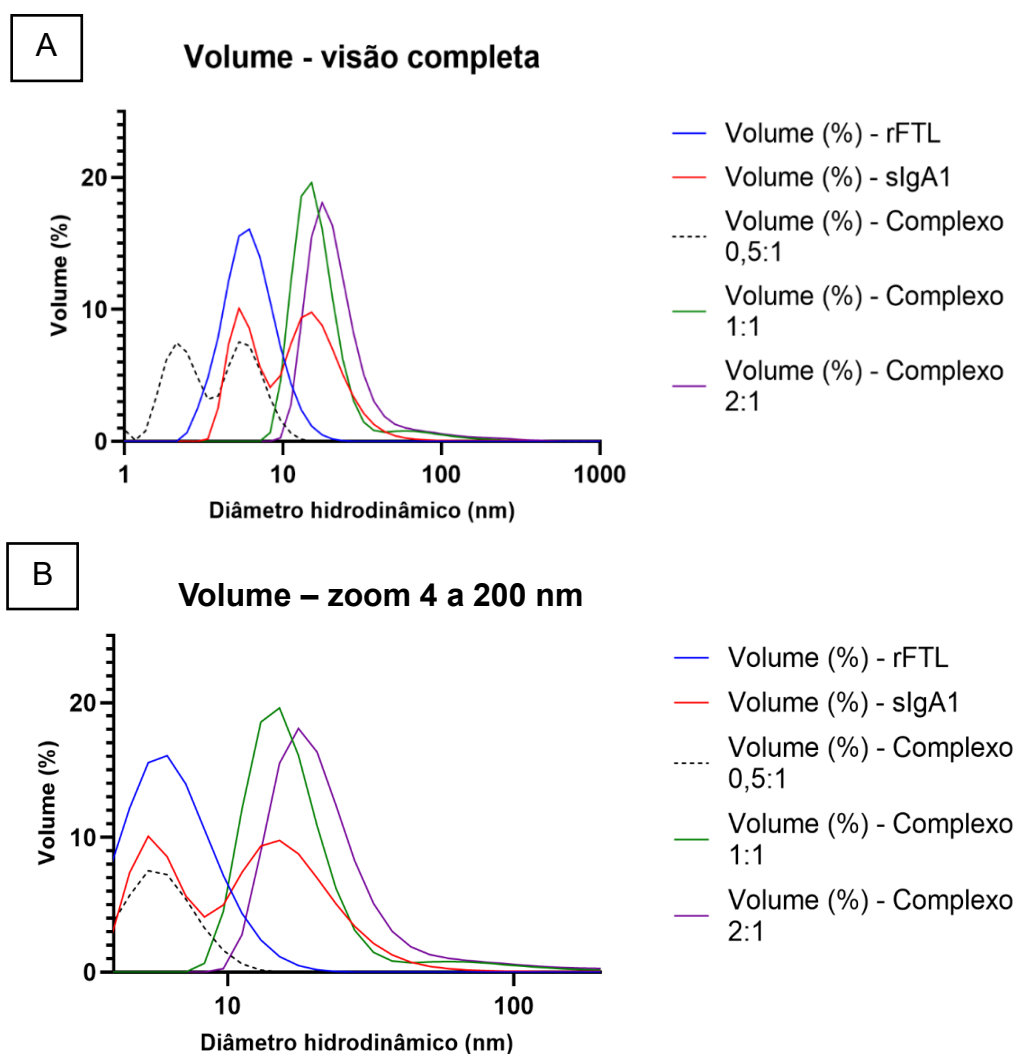
O complexo na razão molar 0,5:1 apresentou perfil inconsistente entre as triplicatas técnicas, com *Z-average* variando entre 0 a 8,8 nm e PDI máximo de 1,0 em uma das réplicas, sendo, portanto, excluído da análise quantitativa. Essa consistência é provavelmente atribuída à concentração mínima de rFTL, insuficiente para gerar sinal de espalhamento notável e estável nas condições experimentais empregadas.

Para complementação dos dados obtidos por intensidade, as análises das distribuições por volume também foram avaliadas para todas as amostras (Figura 20). Para rFTL, obteve-se um pico único e definido em ~ 6 nm, com desaparecimento aparentemente completo da contribuição dos agregados observados por intensidade. Esse dado revela que, em termos de fração de volume da amostra, a população tetramérica da rFTL é possivelmente superior aos agregados, apesar destes serem dominantes em leituras por intensidade. O contraste na distribuição por intensidade e volume é classicamente relatado como efeito do espalhamento preferencial por partículas grandes, amplamente discutido na literatura de DLS para proteínas (STETEFELD; MCKENNA; PATEL, 2016).

Enquanto isso, para o slgA1, a distribuição por volume confirmou um padrão de heterogeneidade esperado pela molécula, com pico principal entre 5-15 nm que se

estende até ~30 nm. Para os complexos 1:1 e 2:1, a distribuição por volume apresentou picos em ~15,2 nm e 17,7 nm, respectivamente, inferiores aos observados por intensidade. Esse deslocamento progressivo dos picos por volume de ~6 nm (rFTL livre) e 5-15 nm (slgA1 livre) para ~15-18 nm nos complexos pode atestar a formação de estruturas hidrodinamicamente maiores. A convergência entre as distribuições por intensidade e volume reforça que o deslocamento observado pode refletir a uma formação de complexos supramoleculares rFTL:slgA1, e não para artefatos de agregação pontuais.

Figura 22 – Distribuição do diâmetro hidrodinâmico por volume para as amostras analisadas em DLS



Fonte: Elaborado pelo autor

Legenda: Dados de análise do diâmetro hidrodinâmico por volume das amostras testadas em DLS. Na imagem A, é retratada a distribuição de diferentes amostras em ampla faixa de tamanhos, sendo possível verificar a distribuição geral. Na figura B, observa-se a mesma imagem com foco em uma faixa

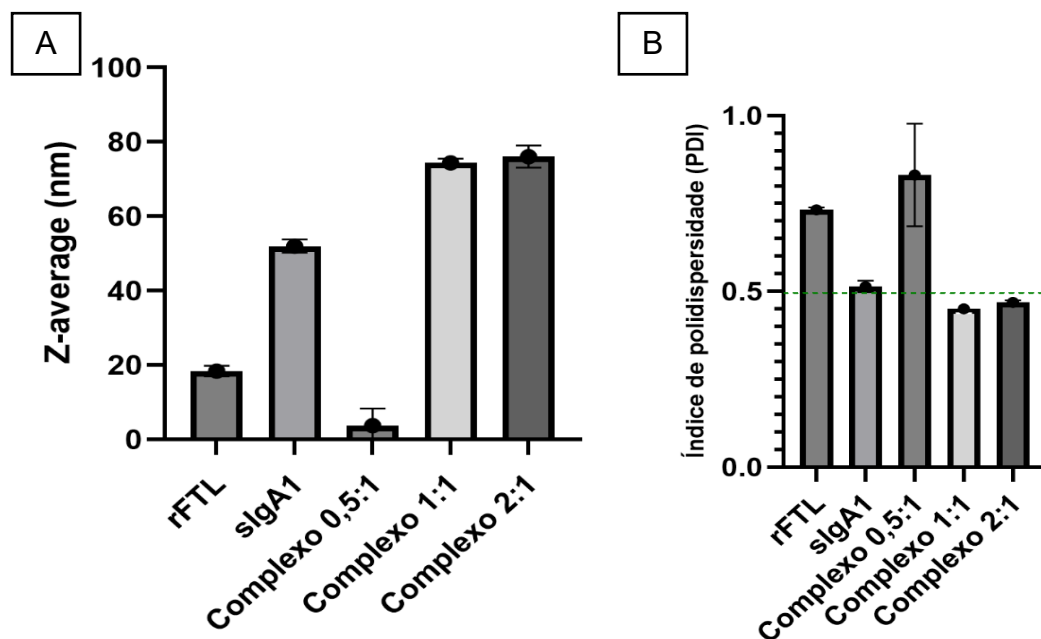
mais estreita de tamanho, onde nota-se os principais picos de intensidade detectados para os controles rFTL (0,25 mg/mL) e slgA1 (0,25 mg/mL) e para os complexos testados.

A comparação entre os valores de *Z-average* dos controles isolados e dos complexos rFTL:slgA1 revelou padrão consistente com a formação de complexos supramoleculares dependentes da razão molar (Figura 21A). O *Z-average* é o parâmetro primário calculado diretamente da função de autocorrelação no DLS, sendo definido como média harmônica ponderada pelo espalhamento de luz de todas as partículas em solução. Por esse motivo, o *Z-average* é fortemente influenciado pela presença de populações maiores, mesmo que em concentrações minoritárias, sendo um forte parâmetro de comparação entre amostras (STETEFELD; MCKENNA; PATEL, 2016).

A rFTL isolada apresentou *Z-average* de $18,37 \pm 1,45$ nm, um valor elevado se comparado com seu pico principal (~ 10 nm) devido a contribuição dos agregados na distribuição por intensidade, conforme discutido anteriormente. Já para o slgA1, os valores de $51,98 \pm 1,79$ nm encontram-se em concordância com o Rh de 49,4 nm reportado por Costa *et al.* (2025).

Em seguida, o complexo na razão molar 1:1 apresentou *Z-average* de $75,04 \pm 1,21$ nm, sendo um valor notavelmente próximo ao obtido por Costa *et al.* (2025) (Rh 76,81) para o complexo FTL:slgA1 na mesma razão molar, convergindo para uma evidência de que a rFTL mantém sua capacidade funcional a glicanos de slgA1 em solução, mesmo na presença da cauda de histidina e do linker GRG não clivado. Somado a isso, a reprodutibilidade desse resultado foi elevada, conferindo confiabilidade estatística do dado (Figura 21A). De maneira similar, a razão molar de 2:1 obteve um valor de $76,06 \pm 2,94$ nm, praticamente equivalente à razão 1:1, com aumento de variabilidade entre as triplicatas. Isso sugere que nessa razão o sistema começa a se aproximar de um cenário de saturação, onde o aumento de rFTL não promove aumento expressivo dos complexos.

Figura 23 – Comparação entre os valores de *Z-average* e PDI obtidos pelas amostras testadas



Fonte: Elaborado pelo autor

Legenda: Imagem A, comparação do diâmetro hidrodinâmico médio (*Z-average*) entre rFTL, slgA1 e seus complexos. Imagem B, comparação dos índices de polidispersidade (PDI) das amostras analisadas por DLS), a linha verde estabelece uma divisão entre amostras consideradas não polidispersas e polidispersas (PDI > 0,5).

A análise do PDI das amostras revelou um padrão particularmente informativo. A rFTL isolada apresentou PDI de $0,732 \pm 0,007$, o que configura uma amostra altamente polidispersa ou com múltiplas populações discretas (PDI > 0,5). No caso da rFTL, esse valor pode refletir a coexistência de populações tetraméricas com agregados, identificados em distribuição por intensidade. Já para o slgA1, o PDI calculado foi de $0,514 \pm 0,016$, confirmando sua heterogeneidade intrínseca em solução.

De forma notável, os complexos 1:1 e 2:1 apresentaram PDI de $0,450 \pm 0,012$ e $0,469 \pm 0,006$, respectivamente, indicando uma distribuição moderada de tamanhos (PDI entre 0,1 e 0,4), porém mais homogêneo se comparado aos controles. Essa redução pode significar que a formação de complexos proteicos rFTL:slgA1 são mais homogêneos do que os componentes isolados. Essa hipótese é sustentada pelo desaparecimento de agregados proteicos na amostra da rFTL isolada, o que contribuiu para seu PDI elevado, e pela obtenção de tamanhos mais homogêneos detectados por intensidade em torno de 126 nm. Esse é padrão indicativo para interações específicas ocorrentes entre o CRD da rFTL e glicanos presentes no slgA1.

7 CONCLUSÃO

Diante dos expostos, conclui-se que os resultados corroboram parcialmente para a hipótese proposta, no qual a avaliação das diferentes condições de expressão testadas permitiu identificar a combinação de 30 °C e 0,5% de metanol como a mais promissora para produção da rFTL em *Komagataella phaffii* X-33. Além disso, testes de atividade hemaglutinante preliminares e o estudo da interação da proteína produzida com o sIgA1, sugerem a preservação da capacidade de reconhecimento de glicanos.

Como perspectivas futuras, propõe-se a incorporação de uma etapa adicional de cromatografia de exclusão por tamanho (SEC) para remoção de agregados proteicos, avaliar a clivagem proteolítica do peptídeo *linker* (GRG) e aprofundar a caracterização estrutural e conformacional da rFTL por meio de técnicas biofísicas complementares, contribuindo para o melhor entendimento de sua funcionalidade e potencial aplicação biotecnológica.

8 REFERÊNCIAS

ALBANYAN, E. A.; EDWARDS, M. S. Lectin site interaction with capsular polysaccharide mediates nonimmune phagocytosis of type III group B streptococci. **Infection and Immunity**, 2000. v. 68, n. 10, p. 5794–5802. Disponível em: </doi/pdf/10.1128/iai.68.10.5794-5802.2000?download=true>. Acesso em: 12 maio 2026.

AL-MAMUN, M. A. *et al.* Assessment of antioxidant, anticancer and antimicrobial activity of two vegetable species of *Amaranthus* in Bangladesh. **BMC Complementary and Alternative Medicine** 2016 **16:1**, 31 maio. 2016. v. 16, n. 1, p. 157-. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1186/s12906-016-1130-0>. Acesso em: 5 jun. 2026.

ALMOGREN, A. *et al.* Functional and structural characterisation of human colostrum free secretory component. **Molecular Immunology**, 1 abr. 2009. v. 46, n. 7, p. 1534–1541. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016158900900011X?casa_token=EGv6piqcYsAAAAA:GHrsBC-MFvOb1k1juYfShNxVwweTD68No4gJYOSO3QsuJkwNtRsKH5PXyYfiZ3bQSeWf-_5btM>. Acesso em: 11 jun. 2026.

AMORIM, R. M. F. *et al.* The leguminous lectin of *Lonchocarpus araripensis* promotes antinociception via mechanisms that include neuronal inhibition of Na⁺ currents. **Inflammation Research** 2016 **65:9**, 18 maio. 2016. v. 65, n. 9, p. 701–708. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00011-016-0951-0>. Acesso em: 5 jun. 2026.

ANDRE, P. M.; POGAMP, P. LE; CHEVET, D. Impairment of jacalin binding to serum IgA in IgA nephropathy. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, 1 jan. 1990. v. 4, n. 2, p. 115–119. Disponível em: </doi/pdf/10.1002/jcla.1860040208>. Acesso em: 13 maio 2026.

AROCKIA JEYAPRAKASH, A. *et al.* Structural Basis for the Energetics of Jacalin–Sugar Interactions: Promiscuity Versus Specificity. **Journal of Molecular Biology**, 18 mar. 2005. v. 347, n. 1, p. 181–188. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283605000379?casa_token=tC58gEz1ud4AAAAA:LoW93JC6uEJR7B2tVy8gu-60ZfwjqaxB1yXAt7OHOBTCZ_zT0i6dNze2Vt5MqshvXR8H8esU2Nc>. Acesso em: 13 maio 2026.

ATALAH, B. AL *et al.* Transcriptional behavior of EUL-related rice lectins toward important abiotic and biotic stresses. **Journal of Plant Physiology**, 15 jul. 2014. v. 171, n. 12, p. 986–992. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0176161714000911#sec0065>>. Acesso em: 5 jun. 2026.

BARBOSA, F. E. V. *et al.* Exploring structural characteristics and biological effects of the lectin from *Dioclea violacea* Mart. Ex Benth: an integrative review. **International Journal of Biological Macromolecules**, 1 set. 2025. v. 321, p. 146466. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813025070230>>. Acesso em: 12 maio 2026.

BARRAGÁN-OCAÑA, A. *et al.* Biotechnology and Bioprocesses: Their Contribution to Sustainability. **Processes** 2020, Vol. 8, Page 436, 7 abr. 2020. v. 8, n. 4, p. 436. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2227-9717/8/4/436/htm>>. Acesso em: 5 jun. 2026.

BEYGMORADI, A., HOMAEI, A., HEMMATI, R., & FERNANDES, P. (2023). Recombinant protein expression: Challenges in production and folding related matters. In **International Journal of Biological Macromolecules (Vol. 233)**. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123407>. Acesso em: 5 jun. 2026.

BLOCH, Y. *et al.* The crystal structure of Nictaba reveals its carbohydrate-binding properties and a new lectin dimerization mode. **Glycobiology**, 1 dez. 2024. v. 34, n. 12, p. cwae087. Disponível em: <<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11632377/>>. Acesso em: 5 jun. 2026.

BOYD, W. C.; REGUERA, R. M. Hemagglutinating Substances for Human Cells in Various Plants. **The Journal of Immunology**, 1 jul. 1949. v. 62, n. 3, p. 333–339. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.62.3.333>>. Acesso em: 6 maio 2026.

BRANDO-LIMA, A. C. *et al.* Frutalin, a galactose-binding lectin, induces chemotaxis and rearrangement of actin cytoskeleton in human neutrophils: Involvement of tyrosine kinase and phosphoinositide 3-kinase. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 15 out. 2005. v. 208, n. 2, p. 145–154. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041008X05001079?casa_token=ZaqGOLHnCaAAAAA:vpadzJ8bn0OWB0cWcbvluuXyk7rBKqb-GNL9r7z1fhe5ciEDA_aN7sCkD4YzV0tGjAuJy3swyWg>. Acesso em: 15 maio 2026.

BRANDO-LIMA, A. C. *et al.* Involvement of phosphatidylinositol-3 kinase–Akt and nuclear factor kappa-B pathways in the effect of frutalin on human lymphocyte.

International Immunopharmacology, 1 mar. 2006. v. 6, n. 3, p. 465–472.

Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567576905002638>>. Acesso em: 15 maio 2026.

BUSTOS, C. *et al.* Advances in Cell Engineering of the Komagataella phaffii Platform for Recombinant Protein Production. **Metabolites**, 1 abr. 2022. v. 12, n. 4, p. 346.

Disponível em: <<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9027633/>>. Acesso em: 6 jun. 2026.

CAMPANA, P. T. *et al.* Unfolding and refolding studies of frutalin, a tetrameric D-galactose binding lectin. **European Journal of Biochemistry**, 1 nov. 2001. v. 268, n. 21, p. 5647–5652. Disponível em: </doi/pdf/10.1046/j.1432-1033.2001.02502.x>.

Acesso em: 15 maio 2026.

CARPENTIERI, A. *et al.* The antiretroviral lectin cyanovirin-N targets well-known and novel targets on the surface of Entamoeba histolytica trophozoites. **Eukaryotic Cell**, nov. 2010. v. 9, n. 11, p. 1661–1668. Disponível em: </doi/pdf/10.1128/ec.00166-10?download=true>. Acesso em: 5 jun. 2026.

CAVADA, Benildo Sousa *et al.* Lectins applied to diagnosis and treatment of prostate cancer and benign hyperplasia: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, 1 nov. 2021. v. 190, p. 543–553. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813021019243>>. Acesso em: 15 maio 2026.

CAVALCANTE, M. De S. *et al.* A panel of glycoproteins as candidate biomarkers for early diagnosis and treatment evaluation of B-cell acute lymphoblastic leukemia.

Biomarker Research 2016 4:1, 27 jan. 2016. v. 4, n. 1, p. 1-. Disponível em:

<<https://link.springer.com/article/10.1186/s40364-016-0055-6>>. Acesso em: 15 maio 2026.

CHETTRI, D. *et al.* Lectins: Biological significance to biotechnological application.

Carbohydrate Research, 1 ago. 2021. v. 506, p. 108367. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0008621521001361?via%3Dihub>>. Acesso em: 11 maio 2026.

CHEUNG, R. C. F.; WONG, J. H.; NG, T. B. Immobilized metal ion affinity chromatography: A review on its applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 26 dez. 2012. v. 96, n. 6, p. 1411–1420. Disponível em:

<<https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-012-4507-0>>. Acesso em: 11 jun. 2026.

CONINCK, T. DE; DAMME, E. J. M. VAN. Review: The multiple roles of plant lectins. **Plant Science**, 1 dez. 2021. v. 313, p. 111096. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168945221002922#sec0035>>. Acesso em: 11 maio 2026.

COSTA, R. C. C. *et al.* Frutalin as an Affinity Tool for slgA1: Biophysical and Structural Characterization of the Lectin–Antibody Complex. **ACS Omega**, 16 dez. 2025. v. 10, n. 49, p. 60298–60308. Disponível em: <[doi/pdf/10.1021/acsomega.5c06812?ref=article_openPDF](https://doi.org/10.1021/acsomega.5c06812?ref=article_openPDF)>. Acesso em: 5 maio 2026.

COSTA, S. J. *et al.* The novel Fh8 and H fusion partners for soluble protein expression in *Escherichia coli*: a comparison with the traditional gene fusion technology. **Applied Microbiology and Biotechnology** 2012 **97:15**, 20 nov. 2012. v. 97, n. 15, p. 6779–6791. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-012-4559-1>>. Acesso em: 15 maio 2026.

CREGG, J. M. *et al.* *Pichia pastoris* as a Host System for Transformations. **Molecular and Cellular Biology**, 1 dez. 1985. v. 5, n. 12, p. 3376–3385. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1128/mcb.5.12.3376-3385.1985>>. Acesso em: 16 maio 2026.

CUMMINGS, R. D. *et al.* Galectins. **Carbohydrates in Chemistry and Biology**, 24 abr. 2022. v. 4–4, p. 625–647. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK579987/>>. Acesso em: 10 maio 2026.

DALVIE, N. C. *et al.* Steric accessibility of the N-terminus improves the titer and quality of recombinant proteins secreted from *Komagataella phaffii*. **Microbial Cell Factories** 2022 **21:1**, 5 set. 2022. v. 21, n. 1, p. 180-. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1186/s12934-022-01905-2>>. Acesso em: 11 jun. 2026.

DAMASCENO, M. B. M. V. *et al.* Frutalin reduces acute and neuropathic nociceptive behaviours in rodent models of orofacial pain. **Chemico-Biological Interactions**, 25 ago. 2016. v. 256, p. 9–15. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009279716302320?via%3Dihub>>. Acesso em: 15 maio 2026.

DAMME, E. 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**, 1 out. 2002. v. 130, n. 2, p. 757–769. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1104/pp.005892>>. Acesso em: 13 maio 2026.

VAN DAMME, ELS J.M.. History of plant lectin research. **Methods in Molecular Biology**, 2014. v. 1200, p. 3–13. Disponível em: <https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-1292-6_1>. Acesso em: 6 maio 2026.

DONALD, K. *et al.* Secretory IgA: Linking microbes, maternal health, and infant health through human milk. **Cell Host and Microbe**, 11 maio. 2022. v. 30, n. 5, p. 650–659. Disponível em: <<https://www.cell.com/action/showFullText?pii=S1931312822000919>>. Acesso em: 13 maio 2026.

DRAGOSITS, M. *et al.* The Effect of Temperature on the Proteome of Recombinant *Pichia pastoris*. **Journal of Proteome Research**, 6 mar. 2009. v. 8, n. 3, p. 1380–1392. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/pr8007623>>. Acesso em: 6 jun. 2026.

ESCH, L.; SCHAFFRATH, U. An Update on Jacalin-Like Lectins and Their Role in Plant Defense. **International Journal of Molecular Sciences** 2017, Vol. 18, Page 1592, 22 jul. 2017. v. 18, n. 7, p. 1592. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/18/7/1592/htm>>. Acesso em: 12 maio 2026.

FERNANDEZ-DEL-CARMEN, A. *et al.* Recombinant jacalin-like plant lectins are produced at high levels in *Nicotiana benthamiana* and retain agglutination activity and sugar specificity. **Journal of Biotechnology**, 20 fev. 2013. v. 163, n. 4, p. 391–400. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016816561200733X#bib0225>>. Acesso em: 13 maio 2026.

FOUQUAERT, E.; DAMME, E. J. M. VAN. Promiscuity of the Euonymus Carbohydrate-Binding Domain. **Biomolecules** 2012, Vol. 2, Pages 415–434, 8 out. 2012. v. 2, n. 4, p. 415–434. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2218-273X/2/4/415/htm>>. Acesso em: 5 jun. 2026.

FRANKE, H.; SCHOLL, R.; AIGNER, A. Ricin and *Ricinus communis* in pharmacology and toxicology-from ancient use and “Papyrus Ebers” to modern perspectives and “poisonous plant of the year 2018”. **Naunyn-Schmiedeberg’s**

Archives of Pharmacology 2019 **392:10**, 29 jul. 2019. v. 392, n. 10, p. 1181–1208. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00210-019-01691-6>>. Acesso em: 10 maio 2026.

GABERC-POREKAR, V.; MENART, V. Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, 30 out. 2001. v. 49, n. 1–3, p. 335–360. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165022X0100207X?via%3Dihub>>. Acesso em: 11 jun. 2026.

GAO, J.; JIANG, L.; LIAN, J. Development of synthetic biology tools to engineer *Pichia pastoris* as a chassis for the production of natural products. **Synthetic and Systems Biotechnology**, 1 jun. 2021. v. 6, n. 2, p. 110–119. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405805X21000247>>. Acesso em: 16 maio 2026.

GOMES, A. M. V. *et al.* Comparison of Yeasts as Hosts for Recombinant Protein Production. **Microorganisms** 2018, **Vol. 6, Page 38**, 29 abr. 2018. v. 6, n. 2, p. 38. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2076-2607/6/2/38/htm>>. Acesso em: 5 jun. 2026.

HAMILTON, S. R. *et al.* Humanization of yeast to produce complex terminally sialylated glycoproteins. **Science**, 8 set. 2006. v. 313, n. 5792, p. 1441–1443. Disponível em: <[doi/pdf/10.1126/science.1130256](https://doi.org/10.1126/science.1130256)>. Acesso em: 16 maio 2026.

HETZ, C.; ZHANG, K.; KAUFMAN, R. J. Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response. **Nature Reviews Molecular Cell Biology** 2020 **21:8**, 26 maio. 2020. v. 21, n. 8, p. 421–438. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41580-020-0250-z>>. Acesso em: 16 maio 2026.

HOLLE, S. VAN; DAMME, J. M. VAN. Signaling through plant lectins: modulation of plant immunity and beyond. **Biochemical Society Transactions**, 17 abr. 2018. v. 46, n. 2, p. 217–233. Disponível em: <biochemsoctrans/article/46/2/217/67175/Signaling-through-plant-lectins-modulation-of>. Acesso em: 12 maio 2026.

ITO, Y. *et al.* Avoiding entry into intracellular protein degradation pathways by signal mutations increases protein secretion in *Pichia pastoris*. **Microbial Biotechnology**, 1 set. 2022. v. 15, n. 9, p. 2364. Disponível em: <<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9437885/>>. Acesso em: 6 jun. 2026.

JEONG, G. M. *et al.* High-level production of Fc-fused kringle domain in *Pichia pastoris*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 1 jun. 2014. v. 41, n. 6, p. 989–996. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1007/s10295-014-1435-2>>. Acesso em: 6 jun. 2026.

JOO, H. H. *et al.* Structural characterization of the α -mating factor prepro-peptide for secretion of recombinant proteins in *Pichia pastoris*. **Gene**, 20 jan. 2017. v. 598, p. 50–62. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378111916308654?casa_token=xTgXfp46pkcAAAAA:9sDz-DAr5Y5IBgJMakPjvxjLOCgF3Ef-1uooe8llldJmXxaQVYuPBqrggPtiiNK7GgyIrEXzql>. Acesso em: 16 maio 2026.

JOSEPH, J. A.; AKKERMANS, S.; IMPE, J. F. M. VAN. Effects of Temperature and pH on Recombinant Thaumatin II Production by *Pichia pastoris*. **Foods**, 1 maio. 2022. v. 11, n. 10, p. 1438. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2304-8158/11/10/1438/htm>>. Acesso em: 6 jun. 2026.

KELLER, C. *et al.* *Yarrowia lipolytica*, *Komagataella phaffii* and secretory proteins: Recombinant laccase as a case study. **Journal of Biotechnology**, 1 abr. 2026. v. 412, p. 1–4. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165626000222>>. Acesso em: 5 jun. 2026.

KENT, D. *et al.* Edible mushroom (*agaricus bisporus*) lectin inhibits human retinal pigment epithelial cell proliferation in vitro. **Wound Repair and Regeneration**, 1 jul. 2003. v. 11, n. 4, p. 285–291. Disponível em: <[doi/pdf/10.1046/j.1524-475X.2003.11408.x](https://doi.org/10.1046/j.1524-475X.2003.11408.x)>. Acesso em: 5 jun. 2026.

KHASA, Y. P.; ADIVITIYA; DAGAR, V. K. Yeast expression systems: Current status and future prospects. **Yeast Diversity in Human Welfare**, 13 maio. 2017. p. 215–250. Disponível em: <https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-10-2621-8_9>. Acesso em: 16 maio 2026.

KHOURY, G. A. *et al.* Protein folding and de novo protein design for biotechnological applications. **Trends in Biotechnology**, 1 fev. 2014. v. 32, n. 2, p. 99–109. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167779913002266>>. Acesso em: 5 jun. 2026.

KIEFER, D. *et al.* From Acetate to Bio-Based Products: Underexploited Potential for Industrial Biotechnology. **Trends in Biotechnology**, 1 abr. 2021. v. 39, n. 4, p. 397–411. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com>>

com.ez11.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0167779920302419?via%3Dihub>. Acesso em: 5 jun. 2026.

HOFFMANN, F.; POSTEN, C.; RINAS, U. **Kinetic model of in vivo folding and inclusion body formation in recombinant *Escherichia coli***. *Biotechnology and Bioengineering*, Hoboken, v. 72, n. 3, p. 315–322, 5 fev. 2001. DOI: 10.1002/1097-0290(20010205)72:3<315::AID-BIT8>3.0.CO;2-G. Acesso em: 6 jun. 2026.

KONOZY, E. H. E. *et al.* Plant lectins: A new antimicrobial frontier. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 1 nov. 2022. v. 155, p. 113735. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332222011246?via%3Dihub#bib12>>. Acesso em: 12 maio 2026.

KONOZY, E. H. E; OSMAN, M. E. Fadil M. Plant lectin: A promising future anti-tumor drug. **Biochimie**, 1 nov. 2022. v. 202, p. 136–145. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300908422001973?via%3Dihub>>. Acesso em: 13 maio 2026.

KONOZY, E.; OSMAN, M.; DIRAR, A. Plant lectins as potent Anti-coronaviruses, Anti-inflammatory, antinociceptive and antiulcer agents. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 1 jun. 2022. v. 29, n. 6, p. 103301. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319562X22002170>>. Acesso em: 5 maio 2026.

KUMAR, Kk. *et al.* Biological role of lectins: A review. **Journal of Orofacial Sciences**, 2012. v. 4, n. 1, p. 20. Disponível em: <https://journals.lww.com/joro/fulltext/2012/04010/biological_role_of_lectins__a_review.6.aspx>. Acesso em: 12 maio 2026.

LAKHTIN, V.; LAKHTIN, M.; ALYOSHKIN, V. Lectins of living organisms. The overview. **Anaerobe**, 1 dez. 2011. v. 17, n. 6, p. 452–455. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1075996411001120>>. Acesso em: 11 maio 2026.

LANNOO, N.; DAMME, E. J. M. VAN. Nucleocytoplasmic plant lectins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, 1 fev. 2010a. v. 1800, n. 2, p. 190–201. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304416509002128?via%3Dihub>>. Acesso em: 11 maio 2026.

LANOO, N; VAN DAMME, ELS. Nucleocytoplasmic plant lectins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, 1 fev. 2010b. v. 1800, n. 2, p. 190–201. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304416509002128?casa_token=EzZTng3ki08AAAAA:ZRKZjYzU2QXpa-DV6cxOgXDNCweiHKsr4B-X-6u3jxXnbnMBb7ucDouVb0FZc1BbF4Ufu5gbQDo>. Acesso em: 12 maio 2026.

LEITE, Talita Abrante. Caracterização biofísica da Frutalina recombinante e sua aplicação na purificação de Imunoglobulinas a1 (siga1) secretoras humanas. 2016. Disponível em: <<http://repositorio.ufc.br/handle/riufc/29680>>. Acesso em: 5 maio 2026.

LI, Hao *et al.* Engineering yeast expression platforms: Advanced strategies for heterologous protein production and glycosylation modification. **Chemical Engineering Journal**, 15 dez. 2025. v. 526, p. 171510. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1385894725123577>>. Acesso em: 16 maio 2026.

LI, N. *et al.* The thomsen-friedenreich antigen-binding lectin jacalin interacts with desmoglein-1 and abrogates the pathogenicity of pemphigus foliaceus autoantibodies in vivo. **Journal of Investigative Dermatology**, 1 dez. 2010. v. 130, n. 12, p. 2773–2780. Disponível em: <<https://www.jidonline.org/action/showFullText?pii=S0022202X15346340>>. Acesso em: 13 maio 2026.

LIN-CEREGHINO, G. P. *et al.* The Effect of α -Mating Factor Secretion Signal Mutations on Recombinant Protein Expression in *Pichia pastoris*. **Gene**, 1 maio. 2013. v. 519, n. 2, p. 311. Disponível em: <<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3628533/>>. Acesso em: 6 jun. 2026.

LIU, C. P. *et al.* Glycoengineering of antibody (Herceptin) through yeast expression and in vitro enzymatic glycosylation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 23 jan. 2018. v. 115, n. 4, p. 720–725. Disponível em: <[doi/pdf/10.1073/pnas.1718172115?download=true](https://doi.org/10.1073/pnas.1718172115?download=true)>. Acesso em: 16 maio 2026.

LIU, Q. *et al.* CRISPR–Cas9-mediated genomic multiloci integration in *Pichia pastoris*. **Microbial Cell Factories** 2019 18:1, 21 ago. 2019. v. 18, n. 1, p. 144-. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1186/s12934-019-1194-x>>. Acesso em: 16 maio 2026.

LOBO, M. D. P. *et al.* Label-free proteome analysis of plasma from patients with breast cancer: Stage-specific protein expression. **Frontiers in Oncology**, 2 fev. 2017. v. 7, n. FEB, p. 218323. Disponível em: <www.frontiersin.org>. Acesso em: 15 maio 2026.

LOO, S. *et al.* Anti-Fungal Hevein-like Peptides Biosynthesized from Quinoa Cleavable Hololectins. **Molecules** **2021**, Vol. **26**, Page **5909**, 29 set. 2021. v. 26, n. 19, p. 5909. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1420-3049/26/19/5909/htm>>. Acesso em: 5 jun. 2026.

LV, W. *et al.* The industrial yeast *Komagataella phaffii* blooms for advanced biomanufacturing. **Biotechnology Advances**, 1 set. 2026a. v. 90, p. 108905. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975026001114#s0010>>. Acesso em: 16 maio 2026.

LV, W; CAI, M. Advancing recombinant protein expression in *Komagataella phaffii*: opportunities and challenges. **FEMS Yeast Research**, 30 jan. 2025. v. 25. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1093/femsyr/foaf010>>. Acesso em: 16 maio 2026.

MANFRÃO-NETTO, J. H. C. *et al.* Evaluation of *Ogataea* (*Hansenula*) polymorpha for Hyaluronic Acid Production. **Microorganisms** **2021**, Vol. **9**, Page **312**, 3 fev. 2021. v. 9, n. 2, p. 312. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2076-2607/9/2/312/htm>>. Acesso em: 5 jun. 2026.

MANSOUR, A. A. *et al.* Galectin-9 supports primary T cell transendothelial migration in a glycan and integrin dependent manner. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 1 jul. 2022. v. 151, p. 113171. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332222005601?via%3Dihub>>. Acesso em: 10 maio 2026.

MARIANO, D. O. C. *et al.* Protein identification from the parotoid macroglan secretion of *Duttaphrynus melanostictus*. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, 2019. v. 25, p. e20190029. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/jvatitd/a/x8v9wMBBPS6M8nDJZ64RH6m/?lang=en>>. Acesso em: 10 maio 2026.

MIRELMAN, D. *et al.* Inhibition of fungal growth by wheat germ agglutinin. **Nature** **1975** **256**:5516, 1975. v. 256, n. 5516, p. 414–416. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/256414a0>>. Acesso em: 13 maio 2026.

MOAR, P.; TANDON, R. Galectin-9 as a biomarker of disease severity. **Cellular Immunology**, 1 mar. 2021. v. 361, p. 104287. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000887492100006X?via%3Dihub>>. Acesso em: 10 maio 2026.

MONTEIRO, R. C.; WINKEL, J. G. J. VAN DE. IgA Fc receptors. **Annual Review of Immunology**, 1 abr. 2003. v. 21, n. Volume 21, 2003, p. 177–204. Disponível em: <<https://www.annualreviews.org/content/journals/10.1146/annurev.immunol.21.120601.141011>>. Acesso em: 13 maio 2026.

MOREIRA, A. C. De O. M. Caracterização estrutural de três lectinas apresentando especificidades por açúcar distintas, isoladas de sementes de Fruta Pão (*Artocarpus incisa* L.). 2002. Disponível em: <<http://repositorio.ufc.br/handle/riufc/47470>>. Acesso em: 5 maio 2026.

MOREIRA, R. A. *et al.* Isolation and partial characterization of a lectin from *Artocarpus incisa* L. seeds. **Phytochemistry**, 1 abr. 1998. v. 47, n. 7, p. 1183–1188. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S003194229700753X>>. Acesso em: 15 maio 2026.

MOREIRA, R. de A.; PERRONE, J. C. Purification and partial characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 59, n. 5, p. 783–787, maio 1977. DOI: 10.1104/pp.59.5.783. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16659942/>. Acesso em: 5 jun. 2026.

NESTL, B. M. *et al.* The Development and Opportunities of Predictive Biotechnology. **ChemBioChem**, 2 jul. 2024. v. 25, n. 13, p. e202300863. Disponível em: <[doi/pdf/10.1002/cbic.202300863](https://doi.org/10.1002/cbic.202300863)>. Acesso em: 5 jun. 2026.

NETO, A. E. V. *et al.* New structural insights into anomeric carbohydrate recognition by frutalin: an α -D-galactose-binding lectin from breadfruit seeds. **Biochemical Journal**, 15 jan. 2019. v. 476, n. 1, p. 101–113. Disponível em: <[biochemj/article/476/1/101/87/New-structural-insights-into-anomeric-carbohydrate](https://www.biochemj.org/article/476/1/101/87/New-structural-insights-into-anomeric-carbohydrate)>. Acesso em: 15 maio 2026.

NIELSEN, J. Production of biopharmaceutical proteins by yeast. **Bioengineered**, jul. 2013. v. 4, n. 4, p. 207–211. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.4161/bioe.22856>>. Acesso em: 5 jun. 2026.

OLIVEIRA, C. *et al.* Expression of frutalin, an α -d-galactose-binding jacalin-related lectin, in the yeast *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, 1 ago. 2008a. v. 60, n. 2, p. 188–193. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046592808001149?via%3Dihub>>. Acesso em: 5 maio 2026.

OLIVEIRA, C; COSTA, S.; *et al.* cDNA Cloning and Functional Expression of the α -d-Galactose-Binding Lectin Frutalin in *Escherichia coli*. **Molecular Biotechnology** **2009 43:3**, 12 jun. 2009. v. 43, n. 3, p. 212–220. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s12033-009-9191-7>>. Acesso em: 15 maio 2026.

OLIVEIRA, C; TEIXEIRA, José A.; *et al.* A comparative study of recombinant and native frutalin binding to human prostate tissues. **BMC Biotechnology** **2009 9:1**, 9 set. 2009. v. 9, n. 1, p. 78-. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1186/1472-6750-9-78>>. Acesso em: 15 maio 2026.

OLIVEIRA, C *et al.* Cytotoxic Effects of Native and Recombinant Frutalin, a Plant Galactose-Binding Lectin, on HeLa Cervical Cancer Cells. **BioMed Research International**, 1 jan. 2011. v. 2011, n. 1, p. 568932. Disponível em: <[doi/pdf/10.1155/2011/568932](https://doi.org/10.1155/2011/568932)>. Acesso em: 15 maio 2026.

OLIVEIRA, C; TEIXEIRA, José A.; DOMINGUES, L. Recombinant production of plant lectins in microbial systems for biomedical application - The frutalin case study. **Frontiers in Plant Science**, 8 ago. 2014. v. 5, n. AUG, p. 102947. Disponível em: <www.frontiersin.org>. Acesso em: 15 maio 2026.

OLIVEIRA, M. D. L. *et al.* Purification of a lectin from *Eugenia uniflora* L. seeds and its potential antibacterial activity. **Letters in Applied Microbiology**, 1 mar. 2008. v. 46, n. 3, p. 371–376. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02319.x>>. Acesso em: 12 maio 2026.

ORMAN, M. A.; ÇALIK, P.; ÖZDAMAR, T. H. The influence of carbon sources on recombinant-human- growth-hormone production by *Pichia pastoris* is dependent on phenotype: a comparison of Mut s and Mut + strains . **Biotechnology and Applied Biochemistry**, mar. 2009. v. 52, n. 3, p. 245–255. . Acesso em: 6 jun. 2026.

PACK, T. D. Purification of Human Ig A . **Current Protocols in Immunology**, 1 ago. 2000. v. 38, n. 1, p. 2.10B.1-2.10B.7. Disponível em: <[doi/pdf/10.1002/0471142735.im0210bs38](https://doi.org/10.1002/0471142735.im0210bs38)>. Acesso em: 13 maio 2026.

PEREIRA-DA-SILVA, G. *et al.* Neutrophil activation induced by the lectin KM+ involves binding to CXCR2. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, 1 jan. 2006. v. 1760, n. 1, p. 86–94. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304416505002886?casa_token=ETmMfnpGneYAAAAA:pTw-2wCRXcvbX8wFYx9KGitBFmsvTu4PjDEY8wotVDx72WqChVIGHVxHBPitH5gGhFQbQfWyLsl>. Acesso em: 13 maio 2026.

PEUMANS, W. J.; DAMME, E. J. M. VAN. Lectins as Plant Defense Proteins. **Plant Physiology**, 1 out. 1995. v. 109, n. 2, p. 347–352. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1104/pp.109.2.347>>. Acesso em: 6 maio 2026.

PHAFF, H. J.; MILLER, M. W.; SHIFRINE, M. The taxonomy of yeasts isolated from *Drosophila* in the Yosemite region of California. **Antonie van Leeuwenhoek** **1956** **22:1**, dez. 1956. v. 22, n. 1, p. 145–161. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/BF02538322>>. Acesso em: 16 maio 2026.

POLYTECHNICA, P.; ENG, S. C. EFFECT OF METHANOL CONCENTRATION ON THE RECOMBINANT *PICHA PASTORIS* MUT^S FERMENTATION. **Periodica Polytechnica Chemical Engineering**, 25 fev. 2004. v. 48, n. 2, p. 73–87. Disponível em: <<https://www.pp.bme.hu/ch/article/view/253>>. Acesso em: 6 jun. 2026.

RABBANI, G. *et al.* pH-Dependent Conformational Transitions in Conalbumin (Ovotransferrin), a Metalloproteinase from Hen Egg White. **Cell Biochemistry and Biophysics** **2011** **61:3**, 21 jul. 2011. v. 61, n. 3, p. 551–560. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s12013-011-9237-x>>. Acesso em: 24 maio 2026.

ROCHA, B.A.M. Caracterização estrutural por espectrometria de massas e cristalografia de raios X de lectinas da família Leguminosae. 2007. Disponível em: <<http://repositorio.ufc.br/handle/riufc/77030>>. Acesso em: 6 maio 2026.

ROCHA, D.; FORTALEZA, N. Clonagem e expressão de uma lectina de *Artocarpus incisa* L. (Frutalina) em *Escherichia coli*. 2008. Disponível em: <<http://repositorio.ufc.br/handle/riufc/10819>>. Acesso em: 15 maio 2026.

RODRIGUES, F. N. Desenvolvimento de uma matriz de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro funcionalizadas com frutalina, lectina α -D-galactose ligante de *Artocarpus incisa* L. 2022. Disponível em: <<http://repositorio.ufc.br/handle/riufc/70023>>. Acesso em: 15 maio 2026.

SALLADA, N. D.; HARKINS, L. E.; BERGER, B. W. Effect of gene copy number and chaperone coexpression on recombinant hydrophobin HFBI biosurfactant production in *Pichia pastoris*. **Biotechnology and Bioengineering**, 1 ago. 2019. v. 116, n. 8, p. 2029–2040. Disponível em: </doi/pdf/10.1002/bit.26982>. Acesso em: 16 maio 2026.

SANKARANARAYANAN, R. *et al.* A novel mode of carbohydrate recognition in jacalin, a Moraceae plant lectin with a β -prism fold. **Nature Structural Biology** 1996 **3:7**, jul. 1996. v. 3, n. 7, p. 596–603. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nsb0796-596>. Acesso em: 13 maio 2026.

SANTOS, F. A. Avaliação da atividade tripanocida da lectina de *Vatairea macrocarpa* sobre a forma evolutiva *Tripomastigota* do *Trypanosoma cruzi*, cepa Y. 2023. Disponível em: <http://repositorio.ufc.br/handle/riufc/85045>. Acesso em: 13 maio 2026.

SCHUSTERBAUER, V. *et al.* Whole Genome Sequencing Analysis of Effects of CRISPR/Cas9 in *Komagataella phaffii*: A Budding Yeast in Distress. **Journal of Fungi**, 1 out. 2022. v. 8, n. 10, p. 992. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2309-608X/8/10/992/htm>. Acesso em: 16 maio 2026.

SHEN, Q. *et al.* Identification of a novel growth-associated promoter for biphasic expression of heterogenous proteins in *Pichia pastoris*. **Applied and Environmental Microbiology**, 21 fev. 2024. v. 90, n. 2. Disponível em: </doi/pdf/10.1128/aem.01740-23?download=true>. Acesso em: 16 maio 2026.

SHIH, C. J.; LAI, M. C. Analysis of the AAA+ chaperone *clpB* gene and stress-response expression in the halophilic methanogenic archaeon *Methanohalophilus portucalensis*. **Microbiology**, 1 ago. 2007. v. 153, n. 8, p. 2572–2583. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.2007/007633-0>. Acesso em: 24 maio 2026.

SILVA, R. R. S. *et al.* *Parkia platycephala* lectin enhances the antibiotic activity against multi-resistant bacterial strains and inhibits the development of *Haemonchus contortus*. **Microbial Pathogenesis**, 1 out. 2019. v. 135, p. 103629. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0882401019305303?casa_token=3ZiK9UB-cuMAAAAA:O23fVm3RtVS7e3RhUQJhemHGWbPzo-Srmix7E4Drl1jMrrwMYr6l-1W4dCwMkXcW8Yo0fVuMZoM>. Acesso em: 12 maio 2026.

SILVA, T. F. DA *et al.* Loading of bacterial cellulose dressing with frutalin, a lectin from *Artocarpus incisa* L. **International Journal of Biological Macromolecules**, 1 set. 2024. v. 276, p. 133774. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813024045793>>. Acesso em: 15 maio 2026.

SINGHANIA, U.; YEMULKAR, B. S.; PATHAN, E. K. Non-conventional yeasts: Versatile platforms for the expression and secretion of eukaryotic proteins. **Systems Microbiology and Biomanufacturing** 2026 **6:3**, 13 abr. 2026. v. 6, n. 3, p. 62-. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s43393-026-00469-1>>. Acesso em: 5 jun. 2026.

SPOHNER, S. C. *et al.* *Kluyveromyces lactis*: An emerging tool in biotechnology. **Journal of Biotechnology**, 20 mar. 2016. v. 222, p. 104–116. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016816561630075X?casa_token=3DencPaVlvUAAAAA:YmvmjmLkXsOBU7c8AisAURMpVeRrlcGVduX9AnsDh-cA_oThIB8dQRoU7Q7WPiEEQvWqbZdqU4>. Acesso em: 5 jun. 2026.

STETEFELD, J.; MCKENNA, S. A.; PATEL, T. R. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. **Biophysical Reviews** 2016 **8:4**, 6 out. 2016. v. 8, n. 4, p. 409–427. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s12551-016-0218-6>>. Acesso em: 11 jun. 2026.

SWAMY, M. J.; MONDAL, S. Subunit association, and thermal and chemical unfolding of Cucurbitaceae phloem exudate lectins. A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, 1 abr. 2023. v. 233, p. 123434. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813023003203>>. Acesso em: 11 maio 2026.

SWANSON, M. D. *et al.* A Lectin Isolated from Bananas Is a Potent Inhibitor of HIV Replication. **Journal of Biological Chemistry**, 19 mar. 2010. v. 285, n. 12, p. 8646–8655. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925820872639>>. Acesso em: 13 maio 2026.

TACHIBANA, Kouichi *et al.* Elucidation of binding specificity of Jacalin toward O-glycosylated peptides: quantitative analysis by frontal affinity chromatography. **Glycobiology**, 1 jan. 2006. v. 16, n. 1, p. 46–53. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1093/glycob/cwj038>>. Acesso em: 13 maio 2026.

TERPE, K. (2003). Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. ***Applied Microbiology and Biotechnology***, 60(5), 523–533. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1158-6>. Acesso em: 13 maio 2026

THAK, E. J. *et al.* Structural analysis of N-/O-glycans assembled on proteins in yeasts. ***Journal of Microbiology*** 2018 **56:1**, 4 jan. 2018. v. 56, n. 1, p. 11–23. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s12275-018-7468-x>>. Acesso em: 16 maio 2026.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. *EasySelect™ Pichia Expression Kit: user manual*. Rev. Date: 18 June 2010. Manual part no. 25-0172. MAN0000042. Carlsbad: Thermo Fisher Scientific, 2010. Disponível em: Thermo Fisher Scientific – EasySelect™ Pichia Expression Kit User Manual. Acesso em: 6 jul. 2026.

TOLEDO, K. A. *et al.* Neutrophil activation induced by ArtinM: Release of inflammatory mediators and enhancement of effector functions. ***Immunology Letters***, 24 mar. 2009. v. 123, n. 1, p. 14–20. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165247809000133>>. Acesso em: 13 maio 2026.

TSANEVA, M.; DAMME, E. J. M. VAN. 130 years of Plant Lectin Research. ***Glycoconjugate Journal*** 2020 **37:5**, 29 ago. 2020. v. 37, n. 5, p. 533–551. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10719-020-09942-y>>. Acesso em: 5 maio 2026.

TYO, K. E. J. *et al.* Impact of protein uptake and degradation on recombinant protein secretion in yeast. ***Applied Microbiology and Biotechnology*** 2014 **98:16**, 10 maio. 2014. v. 98, n. 16, p. 7149–7159. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-014-5783-7>>. Acesso em: 16 maio 2026.

UNVER, Y. *et al.* Komagataella phaffii (Pichia pastoris) as a Powerful Yeast Expression System for Biologics Production. ***Frontiers in Bioscience-Elite*** 2024 **16 (2)**, 12 jun. 2024. v. 16, n. 2. Disponível em: <<https://www.imrpress.com/journal/FBE/16/2/10.31083/j.fbe1602019>>. Acesso em: 16 maio 2026.

VALDICÉLIO, F. *et al.* Galactomanana reticulada de sementes de peltogyne confertiflora: uma eficiente matriz cromatográfica de afinidade para isolar lectinas galactose-ligantes. 3 jun. 2021. Disponível em: <<http://repositorio.ufc.br/handle/riufc/59459>>. Acesso em: 11 maio 2026.

VANDENBUSSCHE, F. *et al.* Analysis of the in planta antiviral activity of elderberry ribosome-inactivating proteins. **European Journal of Biochemistry**, 1 abr. 2004. v. 271, n. 8, p. 1508–1515. Disponível em: <[doi/pdf/10.1111/j.1432-1033.2004.04059.x](https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.04059.x)>. Acesso em: 12 maio 2026.

VASCONCELLOS ABDON, A. P. DE *et al.* Gastroprotective potential of frutalin, a d-galactose binding lectin, against ethanol-induced gastric lesions. **Fitoterapia**, 1 abr. 2012. v. 83, n. 3, p. 604–608. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0367326X12000329>>. Acesso em: 15 maio 2026.

VOGL, T.; GLIEDER, A. Regulation of *Pichia pastoris* promoters and its consequences for protein production. **New Biotechnology**, 25 maio. 2013. v. 30, n. 4, p. 385–404. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1871678412008679?casa_token=q1x2hDmObCMAAAAAA:5ls-ybaoacDZ7ujl1cTzhFv8MHHT2fT0djSVKJldRITNAQ49v33hhpKiX18ilXdx-NvJELEWt5g>. Acesso em: 16 maio 2026.

WANDERLEY, M. S. O. *et al.* Influence of trace elements supplementation on the production of recombinant frutalin by *Pichia pastoris* KM71H in fed-batch process. **Chemical Papers** 2013 **67:7**, 2 mar. 2013. v. 67, n. 7, p. 682–687. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.2478/s11696-013-0363-3>>. Acesso em: 15 maio 2026.

WANG, P. *et al.* Recombinant *Phaseolus vulgaris* phytohemagglutinin L-form expressed in the *Bacillus brevis* exerts in vitro and in vivo anti-tumor activity through potentiation of apoptosis and immunomodulation. **International Immunopharmacology**, 1 jul. 2023. v. 120, p. 110322. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567576923006458?via%3Dihub>>. Acesso em: 10 maio 2026.

WATKINS, W. M.; MORGAN, W. T. J. Neutralization of the Anti-H Agglutinin in Eel Serum by Simple Sugars. **Nature** 1952 **169:4307**, 1952. v. 169, n. 4307, p. 825–826. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/169825a0>>. Acesso em: 6 maio 2026.

WEIS, W. I.; DRICKAMER, K. Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. **Annual Review of Biochemistry**, 1 jul. 1996. v. 65, n. Volume 65, 1996, p. 441–473. Disponível em: <<https://www.annualreviews.org/content/journals/10.1146/annurev.bi.65.070196.002301>>. Acesso em: 13 maio 2026.

YOUNG, C. L. BRITTON, Z. T., & Robinson, A. S. (2012). Recombinant protein expression and purification: A comprehensive review of affinity tags and microbial applications. **Biotechnology Journal**, 7(5), 620–634.
<https://doi.org/10.1002/biot.201100155>. Acesso em: 13 maio 2026.

ZHANG, W.; WANG, T. Understanding Protein Functions in the Biological Context. **Protein & Peptide Letters**, 8 maio. 2023. v. 30, n. 6, p. 449–458. Disponível em: <<https://www.eurekaselect-com.ez11.periodicos.capes.gov.br/article/131572>>. Acesso em: 5 jun. 2026.

ZHOU, S. M. *et al.* Lectin RCA-I specifically binds to metastasis-associated cell surface glycans in triple-negative breast cancer. **Breast Cancer Research**, 11 mar. 2015. v. 17, n. 1. Disponível em: <<https://www.scopus.com/pages/publications/84926290072>>. Acesso em: 13 maio 2026.