



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**  
**CURSO DE BIOTECNOLOGIA**

**SARAH ELIZABETH GOMES CORREIA**

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE LECTINA**  
**ISOLADA DE SEMENTES DE *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub**

**FORTALEZA**

**2019**

**SARAH ELIZABETH GOMES CORREIA**

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE LECTINA  
ISOLADA DE SEMENTES DE *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub**

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

Orientador: Profa. Dra. Kyria Santiago do Nascimento.

Coorientador: Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada.

**FORTALEZA**

**2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

C849p Correia, Sarah Elizabeth Gomes.  
Purificação e caracterização físico-química de lectina isolada de sementes de *Dalbergia ecastophyllum* (L.)  
Taub / Sarah Elizabeth Gomes Correia. – 2019.  
42 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências,  
Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2019.

Orientação: Profa. Dra. Kyria Santiago do Nascimento.  
Coorientação: Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada.

1. Lectina. 2. *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub. 3. Atividade hemaglutinante. I. Título.

CDD 661

---

SARAH ELIZABETH GOMES CORREIA

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE LECTINA  
ISOLADA DE SEMENTES DE *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub**

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

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Kyria Santiago Nascimento (Orientadora)

---

Dra. Mayara Torquato Lima Silva  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Ma. Cláudia Figueiredo Lóssio  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A minha vó, que me ensinou que precisamos ser fortes e corajosos apesar das circunstâncias, que me apoia independentemente do que ela acha e me alimenta com a melhor comida do mundo, dedico este trabalho.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Senhor Deus por tudo, pois até o ar que enche os meus pulmões vem dEle e sem seu amor eu nada seria.

A Professora Dra. Kyria Santiago do Nascimento pela orientação, pelos aprendizados, conselhos, incentivos e oportunidades de descobrir meu potencial. Obrigado por me aceitar e acreditar em mim!

Ao Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada pela co-orientação neste trabalho e pelos valiosos ensinamentos, não só para a profissão, mas para a vida também.

Ao grande Me. Messias Vidal de forma especial, por toda sua orientação, gentileza e principalmente paciência, por acreditar que eu era capaz quando nem eu acreditei. Obrigada por me ajudar a ser uma pessoa melhor.

A Me. Cláudia Figueirêdo Lóssio, pelo tempo e pela indispensável ajuda.

A Dra Mayra Torquato Lima Silva por ter aceitado participar da banca avaliadora desse trabalho e pela ajuda.

Aos grandes colegas do BioMol-Lab que são admiráveis por se dedicarem dia após dia ao trabalho. Agradeço à todos que contribuíram durante esta minha caminhada, pelo companheirismo sempre, e por me permitirem fazer parte dessa família.

Aos meus grandes amigos feitos ao longo desses anos, especialmente, mas não se limitando a Tailanna, Raynier, os primeiros a serem gentis e que deram início a isso tudo. Aos queridos Joselio, Wendel, Amanda, Mateus, Joaquim, Rafael (bolota), Vagner, Pablo, Pedro, Dani e todos que não sabem o quanto me fazem bem, motivam e curam.

Aos queridíssimos Lu, Gabs e Fabrício que mais de uma vez, com assuntos específicos e aleatórios, tornaram um dia ruim, num dia bom. Obrigada.

Um agradecimento especial pra Thamiris, Jessica, Arildo, Eduardo, Raylsom, Alex, esse grupo de desajustados que cuidaram tão carinhosamente bem do meu coração, sem vocês essa caminhada diária pela Universidade não seria possível.

Aos “chefes” Juliana e Dasayeve por me acharem suficiente. Ao “gerente” Roberto e ao Caio por receberem “textões” e mesmo assim não terem ido embora. Ao Edu pela ajuda.

As minhas “irmãs” Carol, Laís, Paloma e Thaiana minhas “bússolas morais” e todo meu coração, obrigada por me suportarem em amor e me fazerem uma pessoa melhor. Ao meu “irmão” Matheus pelo cuidado e o carinho, pelas conversas e aprendizados, por ter ficado. Ao incrível Prieto que apareceu sem avisar, e deixa a vida um pouco mais interessante.

A Juju pelo carinho, por se importar e comprar minhas brigas. A Carol pelo xadrez, o Uno e as risadas. Ao Mateus pelos almoços e as conversas sobre quadrinhos.

Meu agradecimento sincero a todos os meus professores do curso de Biotecnologia e departamentos próximos, principalmente ao professor Vicente e ao professor Júlio César que me provaram que pesquisa não se faz somente com a cabeça, mas com o coração também.

Em especial agradeço à minha família, minha mãe Mary, meu pai Neto, minha vó Rita, minha tia Marluce. Obrigada pai por não ter hesitado em me proporcionar a melhor educação. Obrigada mãe por não ter medido esforços para me dar o que quer que fosse. Obrigada minha vó por ser o maior exemplo do que eu preciso ser agora. Obrigada minha tia por me ensinar a rir e pelo gosto pela arte. Amo vocês mais do que se pode colocar nessas simples palavras.

A UFC, minha segunda casa, agradeço pelo acolhimento e pela sabedoria. Ao CNPq que proporcionou o suporte necessário durante todo esse projeto, obrigada.

“Eu fui encontrado sendo que eu sempre fui o esquecido  
em tudo que eu vivi e me chama amigo  
e eu não sou mais estranho, eu sou um filho.”

Mais – Os Arrais



## RESUMO

As sementes de *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub, uma espécie pertencente á família Fabaceae, subfamília Papilionoideae, tribo Dalbergieae, e gênero Dalbergia, possuem uma lectina N-acetil-D-glucosaina/melibiose/L-rhamnose específica, que aglutina eritrócitos de coelho nativos ou tratados com enzima tripsina. A lectina, nomeada de DeL, foi purificada em um passo através da cromatografia de afinidade em matriz de Quitina, se mostrando a primeira lectina do gênero a ser purificada. O processo todo de purificação foi monitorado por SDS-PAGE, atividade hemaglutinante específica e cromatografia de exclusão molecular. Onde a DeL purificada apresentou um perfil eletroforético composto por uma banda de aproximadamente 20 kDa de massa molecular aparente. Ademais, a DeL não demonstra estabilidade em ampla faixa de pH ou temperatura. Também não apresenta toxicidade contra nauplios de *Artemia sp.*, também não é glicoproteína.

**Palavras-chave:** Lectina, Atividade hemaglutinante, *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub.

## ABSTRACT

The seeds of *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub, a species belonging to the Fabaceae family, Papilionoideae subfamily, Dalbergieae tribe, and genus *Dalbergia*, have a specific N-acetyl-D-glucosamin/melibiose/L-rhamnose lectin, which agglutinates erythrocytes native or trypsin-treated rabbit. The lectin, named DeL, was purified in one step by Chitin matrix affinity chromatography, the first lectin of its genus to be purified. The entire purification process was monitored by SDS-PAGE, specific haemagglutination activity and molecular exclusion chromatography. Where the purified DeL presented an electrophoretic profile composed of a band of approximately 20 kDa of apparent molecular mass. In addition, DeL does not demonstrate stability over a wide range of pH or temperature. It also has no toxicity against *Artemia* sp. Nauplii, nor is it glycoprotein too.

Keywords: Lectin, Haemagglutinating activity, *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** NaCIM – Extrato de farinha de *Dalbergia*.

**Figura 2:** Atividade hemaglutinante das frações eluídas por exclusão.

**Figura 3:** Atividade hemaglutinante das frações liofilizadas eluídas em matriz de Quitina.

**Figura 4:** Eletroforese em gel de poliacrilamida (12%) com sulfato dodecil de sódio (SDS-PAGE).

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Processo de purificação da lectina de *D. ecastophyllum* (L.) Taub.

**Tabela 2:** Inibição da atividade hemaglutinante no extrato total.

## LISTA DE GRÁFICOS

**Gráfico 1:** Cromatograma de DeL em matriz de Quitina.

**Gráfico 2:** Cromatograma de P2.

**Gráfico 3:** Cromatograma de P3.

**Gráfico 4:** Estabilidade térmica da DeL.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A.H: Atividade Hemaglutinante

A.H.E.: atividade hemaglutinante específica

ASL: lectina de *Andira surinamensis*

ConA: lectina de *Canavalia ensiformis*

DeL: Lectina de *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub

DNA: ácido desoxirribonucleico

EDTA: Ácido Etilenodiaminotetracético

kDa: Quilodalton

PFL: Lectina de *Platymiscium floribundum*

pH: potencial hidrogeniônico

RIP: proteínas inativadoras de ribossomos

SEC: Cromatografia de Exclusão por Tamanho

SDS: dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de dodecil sulfato de Sódio

TEMED: N-N-N'-N'-tetrametilenodiamina

U.H/mg: Unidade de Hemaglutinante por miligrama de proteína

U.H./mL: Unidade Hemaglutinante

VGL: Lectina de *Vatairea guianensis*

## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b>                                       | <b>16</b> |
| <b>1.1 Lectinas: aspectos geral e histórico</b>           | <b>16</b> |
| <b>1.2 Lectinas: definições e classificação</b>           | <b>17</b> |
| <b>1.3 Dalbergia ecastophyllum (L.) Taub</b>              | <b>19</b> |
| <b>2 OBJETIVO</b>   | <b>20</b> |
| <b>2.1 Geral</b>  | <b>20</b> |
| <b>2.2 Específicos</b>                                    | <b>20</b> |
| <b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b>                              | <b>21</b> |
| <b>3.1 Origem do material</b>                             | <b>21</b> |
| <b>3.2 Obtenção da farinha</b>                            | <b>21</b> |
| <b>3.3 Extração total de proteínas solúveis</b>           | <b>21</b> |
| <b>3.4 Dosagem de proteínas solúveis</b>                  | <b>21</b> |
| <b>3.5 Atividade hemaglutinante (A.H)</b>                 | <b>22</b> |
| <b>3.6 Cálculo da atividade hemaglutinante específica</b> | <b>22</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>3.7 Cromatografia de afinidade em matriz de Quitina e de exclusão molecular</b>                          | <b>22</b> |
| <b>3.8 Eletroforese em SDS-PAGE</b>   | <b>23</b> |
| <b>3.9 Inibição da atividade hemaglutinante por açúcar</b>  | <b>24</b> |
| <b>3.10 Efeito da temperatura sobre a atividade hemaglutinante</b>  | <b>24</b> |
| <b>3.11 Efeito doo pH sobre a atividade hemaglutinante da lectina</b>                                       | <b>25</b> |
| <b>3.12 Efeito de agente quelante sobre a atividade hemaglutinante</b>                                      | <b>25</b> |
| <b>3.13 Dosagem de carboidratos totais</b>  | <b>25</b> |
| <b>3.14 Teste de letalidade de <i>Artemia sp.</i></b>   | <b>26</b> |
| <b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>   | <b>27</b> |
| <b>4.1 Purificação da lectina de sementes de <i>Dalbergia ecastophyllum</i> (L.) Taub</b>                   | <b>27</b> |
| <b>4.2 Caracterização físico-química da lectina de sementes de <i>Dalbergia ecastophyllum</i> (L.) Taub</b> | <b>35</b> |
| <b>5 CONCLUSÃO</b>  | <b>39</b> |
| <b>REFERÊNCIAS</b>  | <b>40</b> |

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Lectinas: aspectos geral e histórico

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas capazes de se ligar reversivelmente e especificamente a carboidratos (PEUMANS; VAN DAMME, 1995), ação que é muito útil para identificação destes. Isso leva a um abrangente espectro de aplicações em diversos setores econômicos, sendo assim potenciais importantes, como ferramentas biotecnológicas com atividades antitumoral (CORRÊA *et al.* 2019), antiinflamatória (PIRES *et al.*, 2019), antimicrobiana (COELHO *et al.*, 2018), entre outras. Sua interação com carboidratos é semelhante a interação enzima/substrato, por exemplo, transpeptidase e penicilina (GHAZARIAN; IDONI; OPPENHEIMER, 2011), de modo a ser específica, porém não catalítica. Essa interação é devido a presença de um domínio de reconhecimento a carboidrato (CRD) nas lectinas (SHARON; LIS, 2004).

Lectinas estão presentes em todos os seres vivos e as plantas são um amplo campo de estudo, sendo o mais pesquisado, estando presentes em todas as partes da planta (semente, folha, fruto, etc) (PEUMANS; VAN DAMME, 1995).

Em 1888, uma proteína hemaglutinante foi detectada em extratos de sementes de *Ricinus communis* por Stillmark. A proteína foi nomeada de ricina e determinou um marco biológico, várias outras proteínas com a mesma propriedade foram descritas posteriormente em euforbiácias e leguminosas. Em 1898, foi cunhado pela primeira vez o termo “hemaglutininas”, por Elfstand. Ele denominava o grupo de proteínas citotóxicas hemaglutinantes. Em 1907, o termo caiu em desuso, pois os pesquisadores Landsteiner e Raubitschek descreveram hemaglutininas que não eram citotóxicas em *Phaseolus vulgaris*, *Pisum sativum*, *Lens culinaris* (SOL., 2006).

Em 1919, a primeira “hemaglutinina” concanavalina A (ConA), foi purificada de sementes de *Canavalia ensiformis*, por Sumner. Em 1936, Sumner e Howell atestaram que ConA podia ter o processo de hemaglutinação inibido por sacarose e que a hemaglutinação ocorria pela ligação específica entre os açúcares presentes na superfície de eritrócitos e ConA. Entre o período de 1948 e 1949, o termo “hemaglutininas” foi substituído por “lectinas” (do latim “legere”, escolha) após Renkonen e, independentemente, Boyd e Reguera descobrirem que algumas lectinas de leguminosas ligam-se preferencialmente a células do sangue humano

de determinados grupos do sistema ABO. Isso solidificou os estudos de Stillmark sobre tal característica, porém com eritrócitos de animais (SOL., 2006).

Em 1960, uma descoberta revolucionária para a imunologia foi feita por Nowell que corroborou que lectina de *Phaseolus vulgaris* tem atividade mitogênica sobre linfócitos, surpreendentemente, pois acreditava-se, até então, que os linfócitos não eram capazes de se diferenciar ou se dividir (SHARON; LIS, 2004).

## 1.2 Lectinas: definições e classificação

Lectinas tiveram sua primeira definição baseada na capacidade de inibir a aglutinação e de se ligar especificamente em açúcar, contudo essa denominação não abrangia todos os grupos de lectinas (GOLDSTEIN *et al.*, 1980). Uma nova definição foi proposta por Kocourek e Horejsi incluindo lectinas com baixa atividade hemaglutinante, tóxicas e que tivessem cadeia genuína, apenas com um aviso para as que poderiam ter pelo menos uma subunidade de função diferente. Essa definição também foi considerada restritiva (SHARON; LIS, 2004).

Em 1995, (PEUMANS; VAN DAMME, 1995) definiram lectinas como proteínas de origem não imune que possuem ao menos um domínio não catalítico que se liga reversivelmente a um mono ou oligossacarídeo específico.

Visto a dificuldade em defini-las, é notável que a classificação das lectinas também seria um processo complexo. Peumans e Van Damme tentaram classificar lectinas vegetais em quatro grupos diferentes: Merolectinas (possuem apenas um domínio de ligação a carboidratos, sem capacidades de oligomerização, de aglutinar células e de precipitar glicoconjugados), Hololectinas (possuem mais que um domínio de ligação a carboidratos com estruturas semelhantes e capazes de aglutinação e precipitação de glicoconjugados), Quimerolectinas (possuem um ou mais domínios de ligação a carboidrato, com pelo menos um sem relação com ações lectínicas que tem atividade catalítica bem definida e independente dos outros domínios) (VAN DAMME *et al.*, 1998) e Superlectinas (possuem mais de um domínio de ligação a carboidrato que reconhecem açúcares distintos, estruturalmente e funcionalmente). As lectinas podem ser divididas em sete famílias baseado na afinidade por carboidratos e características estruturais (VAN DAMME *et al.*, 1996).



A família mais estudada é a das lectinas de leguminosas conhecidas por serem bastante semelhantes físico-quimicamente (PINTO *et al.*, 2005) e em suas estruturas primárias e terciárias, variando em suas estruturas quaternárias (LORIS *et al.*, 1998). Já a família das lectinas relacionadas com proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs) do tipo 2 é reconhecida pelo seu efeito citotóxico e por possuir atividade catalítica capaz de deixar ribossomos eucarióticos inativos. Isso ocorre por que a ligação N-glicosídica de um resíduo de adenina no RNA é clivada (PEUMANS *et al.*, 2001).

Outra família é a de lectinas que se ligam à quitina através da sua principal unidade monomérica, N-acetilglicosamina. É interessante observar que essa família possui um domínio ligante a heveína também (ZANETTI., 2017). Em seguida, temos a família de lectinas de monocotiledônias ligantes a manose com o nome autoexplicativo. As pertencente a essa família possuem até quatro subunidades de 12kDa manose específicas restritas. Ademais, uma família peculiar é a de lectinas semelhantes a Jacalina, com mais um nome auto definido, são lectinas específicas à galactose (COLLINGE *et al.*, 1993).

Além disso, as lectinas isoladas do floema de Cucurbitaceae formam mais uma família dessa divisão caracterizadas por serem construídas de duas subunidades de 24kDa ligantes à N-acetilglicosamina e glicosiladas. No geral, possuem domínio para quitina, porém não para heveína (ZANETTI., 2017). Todos os componentes dessa família, semelhante as de leguminosas, são altamente similares uns com os outros, contudo não têm semelhança, de sequência pelo menos, com lectinas de outras espécies botânicas. Em vista disso, essa família é a menor dentro dessa divisão (VAN DAMME *et al.*, 1998). Por fim, uma família extremamente restrita, a família de lectinas relacionadas a amarantina. Restrita, pois a lectina extraída de *Amaranthus caudatus*, amarantina, não é correspondente a nem uma outra no reino Planta, e por isso ela se mostra uma representante singular para sua família (VAN DAMME *et al.*, 1998).

Nessa classificação, as lectinas da tribo Dalbergieae (como a lectina estudada nesse trabalho), estão inseridas na categoria das leguminosas, a família mais estudada. Apesar de ser a família mais estudada, é evidente a necessidade de uma expansão dos estudos sobre a tribo Dalbergieae, bem como sobre o gênero *Dalbergia*, visto que a *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub foi a primeira de tal gênero a ser purificada neste presente estudo, apesar de já ter sido descoberta e catalogada no século 19 (CARVALHO., 1997).

### 1.3 Lectinas: *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub

*Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub é um espécime do reino Viridiplantae, da ordem Fabales, da família Fabaceae, da subfamília Papilionoideae, da tribo Dalbergieae e do gênero Dalbergia. A tribo Dalbergieae é taxinomicamente mais próxima da tribo Sophoreae que tem sido tradicionalmente usada como “sexta de lixo” para espécies que não se encaixam na tribo Faboideae (CALVETE *et al.*, 1998). *D. ecastophyllum* (L.) Taub. É popularmente conhecida como rabo-de-bugio, marmelo, bugi e marmeleiro-de-praia, pertence a família Fabaceae e está presente nos domínios fitogeográficos amazônico e mata atlântico, em áreas de manguezal e beira-mar. Menos comum, mas também há relatos de crescimento dessa espécie em restinga. No geral, ela está presente no sul das américas, Índias Ocidentais e África Ocidental, compreendendo quase todas as regiões do Brasil, com exceção ao centro-oeste (CARVALHO., 1997). É um vegetal arbustivo que se adapta bem em condições salinas. Fruto é adaptado a flutuar, o que faz sentido pra posição litorânea em que crescem promovendo uma dispersão oceânica que deve ter levado a sua presença, nas já mencionadas, diferentes regiões do globo. Com frequência ela domina a vegetação dos locais típicos de onde cresce e ainda não se tem um consenso científico definitivo de sua origem (DAUGSCH *et al.*, 2007).

Ela é rica em isoflavonóides que possuem um leque de atividades biológicas como antibacteriana, antifúngica e antioxidante. Também há relatos dela sendo usada na área de segurança alimentar, o que a leva a ser muito usada na medicina popular (DONNELLY., 1973). Estes também são responsáveis pela constituição da intrigante própolis vermelha brasileira, substância resinosa fabricada por abelhas que o utilizam como selante de orifícios nos favos de mel e protetor da colmeia, geralmente amarelo ou acastanhado, por isso o vermelho chama a atenção (PARK *et al.*, 2004). Por si só este composto possui uma ampla variedade de aplicações, de anti-herpes, até antitumorais e anti-HIV. Por isso é uma substância que vem sendo fortemente pesquisada. A própolis vermelha brasileiro é constituído de três isoflavonoides: daidzenína, formononetina e biocanina A, semelhante a própolis vermelha cubana. (DAUGSCH *et al.*, 2007).

## 2 OBJETIVO

### 2.1 Geral

O presente trabalho teve por objetivo detectar, isolar, purificar e caracterizar físico-química de uma lectina de sementes de *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub. e avaliar seu efeito citotóxico em modelo de *Artemia*.

### 2.2 Específicos

- Determinar um protocolo de extração e purificação específico para a lectina de *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub.
- Determinar quais açúcares inibem a atividade hemaglutinante da lectina.
- Determinar em quais temperaturas a lectina perde atividade hemaglutinante.
- Determinar em qual pH a lectina perde atividade hemaglutinante.
- Determinar se a lectina é uma glicoproteína.
- Determinar se a lectina é uma metaloproteína.
- Determinar a letalidade da lectina para *Artemia sp.*

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Origem do material

Sementes de *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub foram colhidas manualmente no litoral do estado do Espírito Santo. Após isso, as sementes foram colocadas em um recipiente para o transporte para Fortaleza-CE.

#### 3.2 Obtenção da farinha

As sementes foram deixadas na estufa a 37° C por uma semana durante o processo de secagem. Após esse tempo, foram retiradas, descascadas e trituradas manualmente. A farinha então foi guardada em recipientes apropriados.

#### 3.3 Extração total de proteínas solúveis

As proteínas solúveis presentes na farinha de sementes de *D. ecastophyllum* (L.) Taub foram extraídas com diferentes tampões (Glicina 0,1 M pH 2,6, Acetato de sódio 0,1 M pH 4, Tris 0,1 M pH 7,6, Glicina 0,1 M pH 9,0 e NaCl 0,15 M) na proporção de 1:10 (p/v), sob agitação constante por uma hora. Em seguida, a suspensão disso foi centrifugada a 9000 rpm, á uma temperatura de 4°C por 20 minutos, tendo como resultado um sobrenadante, que foi filtrado em algodão. O resultado disso, extrato total em cada tampão, foi utilizado em ensaios de atividade hemaglutinante. E o extrato que apresentou melhor atividade foi utilizado em teste de dosagem de proteínas (teste de Bradford) e cromatografia.

#### 3.4 Dosagem de proteínas solúveis

A concentração de proteínas solúveis no extrato de sementes de *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub foi determinado pelo método descrito por BRADFORD (1976) que determinou que a cada 100 µL de amostra diluída ou não, em tampão NaCl 0,15 M, é adicionado 2,5 mL de reagente de Bradford. A mistura ficou em repouso por 10 minutos e teve sua absorbância medida á 595 nm em um espectrofotômetro de luz

visível, tendo a concentração determinada por uma curva padrão construída com uso de soluções de concentração conhecidas de albumina sérica bovina (BSA)

### 3.5 Atividade hemaglutinante (A.H)

A presença da lectina no extrato foi determinada a partir de ensaios de aglutinação celular de acordo com o protocolo descrito por Moreira e Perrone em 1977 (MOREIRA., *et al* 1977), que é descrito a seguir: O extrato foi submetido ao ensaio de atividade hemaglutinante fazendo-se uso de hemácias de coelho e humano (sangue A, B, O) ao longo das etapas de purificação da lectina. O extrato foi diluído em série e em duplicata, em tampão NaCl 0,15 M com CaCl<sub>2</sub> 5mM e MnCl<sub>2</sub> 5mM. Em 50µL de cada diluição adicionou-se 50µL da suspensão de hemácias a 3% em NaCl 0,15 M de três tratamentos: nativo, tratamento com papaína e tratamento com tripsina. O ensaio foi colocado na estufa a 37 °C por 30 minutos, depois em temperatura ambiente por mais 30 minutos. Os títulos de hemaglutinação foram medidos em Unidade Hemaglutinante (U.H./mL).

### 3.6 Cálculo da atividade hemaglutinante específica

Logo depois de obtido o título de hemaglutinação e da quantidade de proteínas solúveis, foi calculada a atividade específica para que fosse monitorado a concentração/purificação da lectina em análise. Para isso é feita a divisão do valor do título de hemaglutinação (U.H./mL) pelo valor da dosagem de proteínas solúveis (mg/mL), resultando num quociente expresso em U.H/mg (Unidade de hemaglutinação por miligrama de proteína) (MOREIRA., *et al* 1977).

### 3.7 Cromatografia de afinidade em matriz de Quitina e de exclusão molecular

Para purificação da lectina foi realizada uma cromatografia de afinidade de matriz de quitina, onde o extrato rico em lectinas foi aplicado, em uma coluna (15cm x 8cm) equilibrada com NaCl 0,15 M com CaCl<sub>2</sub> 5mM e MnCl<sub>2</sub> 5mM sendo mantido em fluxo constante por 2 horas. A fração não retido (P1) foi eluído com o mesmo tampão de equilíbrio e coletado em 1 ml por tubo de ensaio. Em seguida, a fração intermediário (P2) foi eluído com tampão Glicina 0,1 M pH 2,6 com NaCl 0,15 M,

também coletado em 1 mL por tubo de ensaio. Por fim, a fração final (P3) foi eluído com tampão Glicina 0,1 M pH 9,0 com NaCl 0,15 M, também coletado em frações de 1 mL.

As frações coletadas foram monitoradas no espectrofotômetro com leituras de absorvância de 280 nm. Após isso, elas foram separadas por ordem de eluição coletando as leituras acima de 0.100, em sacos de diálise e dialisadas contra água destilada para então serem liofilizadas. Enfim, foram analisados a atividade hemaglutinante, o teor de proteínas solúveis e a atividade específica das frações cromatográficas.

O cromatograma de exclusão molecular das frações eluídas em cromatografia de Quitina foi obtido em um cromatógrafo modelo ACQUITY UPLC® H-Class Bio System (Waters), em coluna BioSuite 250. As frações liofilizadas foram solubilizadas em tampão fosfato dibásico pH 7,6 com NaCl 0,15 M na concentração 4mg/mL, filtrados em filtro WHATMAN 45 µm PVDF e aplicadas separadamente na coluna SEC (Size Exclusion Chromatography), eluídos a velocidade de 1,0 mL/min, temperatura de 27 °C.

### 3.8 Eletroforese em SDS-PAGE

Com o intuito de avaliar o grau de pureza e a massa molecular aparente de todas as amostras obtidas, tanto do extrato quanto das frações, foi feita a eletroforese em SDS-PAGE seguindo o protocolo desenvolvido por Laemmli em 1970 (LAEMMLI., 1970). O gel de empilhamento foi feito com 0,61 mL de água destilada ultra pura, 0,61 mL de tampão Tris-HCl 0,5 M, 245 µL acrilamida/bisacrilamida (4%), 17,5 µL de SDS (10%), 25 µL persulfato de amônio (100 mg/ml) e 5 µL TEMED. O gel de separação da amostra foi preparado com 1,55 mL de água ultra pura, 1,05 mL de tampão Tris-HCl 1,5 M, 1,65 mL de acrilamida/bisacrilamida (12%), 45 µL de SDS (10%), 20 µL de persulfato de amônio (100 mg/mL) e 5 µL de TEMED. Este último gel é anexado ao primeiro formando um só gel.

Durante a polimerização dos géis, as amostras liofilizadas foram solubilizadas a uma concentração de 1 mg/mL em tampão de amostra contendo Tris-HCl 0,0625 M, 10% de glicerol, 0,02% de azul de bromofenol e 1% de SDS. Então, a corrida eletroforética foi realizada com a voltagem variando até 150V, amperagem constante

de 30 mA e potência de até 10W. O tampão de corrida continha água ultra pura, Tris 0,25 M pH 8,8, Glicina 1,92M e SDS 1%. Ao fim da corrida o gel foi lavado com água destilada para a retirar o excesso de tampão de corrida e então é corado com o corante coomasie blue G-250 a 0,05%, dissolvido em metano, ácido acético e água a uma proporção de 1:3:5:8 (v/v/v). Após uma noite, embebido no corante, o gel foi lavado novamente com água destilada.

### 3.9 Inibição da atividade hemaglutinante por açúcar

Foram utilizados alguns açúcares simples disponíveis. Nas mesmas placas de atividade hemaglutinante, foram adicionados em forma duplicada 25 µL de tampão de NaCl 0,15 M com CaCl<sub>2</sub> 5mM e MnCl<sub>2</sub> 5mM em cada poço, 25 µL de cada um dos açúcares (N-acetil-D-glucosamina, Melibiose, L-rhamnose, D-glucose, D-manose, α-metil-D-glucopiranosídeo, α-metil-D-manosídeo, D-galactose, α-lactose) apenas no primeiro poço em duplicada que posteriormente diluídos em série. Após isso, 25 µL de solução de lectina (2mg/mL) na concentração da penúltima U.H/mL (previamente determinada) foram adicionados em todos os poços. A placa foi, então, à 37°C em estufa por 30 min e depois deixada em repouso à temperatura ambiente por mais 30 min. Em seguida, 50 µL de sangue de coelho nativo foram adicionados a cada poço e a placa foi mais uma vez incubada à 37 °C durante 30 minutos e depois deixada em repouso à temperatura ambiente por mais 30 minutos. Por fim, inibição da A.H pelos açúcares foi observada ao perceber-se a menor concentração dos açúcares que inibe a A.H, ou seja, a concentração mínima inibitória (MOREIRA., *et al* 1977).

### 3.10 Efeito de temperatura sobre a atividade hemaglutinante

O efeito da temperatura sobre a atividade da lectina foi analisado utilizando a lectina em concentração de 2 mg/mL, onde alíquotas de 100 µL foram submetidas separadamente a diferentes temperaturas: 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 °C por uma hora. Em seguida, foi analisada sua atividade pelo ensaio de hemaglutinação, a 37 °C.

### 3.11 Efeito do pH sobre a atividade hemaglutinante da lectina

O efeito da variação de pH sobre a atividade hemaglutinante da lectina foi analisado utilizando-se alíquotas de 100 µL da solução de lectina a uma concentração 2 mg/ml em tampões: Acetato 0,1 M pH 4,0, Acetato 0,1 M pH 5,0, Bis-Tris 0,1 M pH 6,0, Fosfato de Sódio 0,1 M pH 7,0, Tris-HCl 0,1 M pH 8,0, Glicina 0,1 M pH 9,0 e Glicina 0,1 M pH 10,0, na análise da atividade hemaglutinante (GRANGEIRO., 1990).

### 3.12 Efeito de agente quelante sobre a atividade hemaglutinante

O efeito da dependência da atividade hemaglutinante da lectina por agente quelante foi analisada utilizando-se 50 µL da lectina (2 mg/mL) solubilizada em tampão NaCl 0,15 M com CaCl<sub>2</sub> 5mM e MnCl<sub>2</sub> 5mM e dialisada contra soluções de EDTA 0,1 M contendo NaCl 0,15 M por 24 horas e em seguida foi feita diálise contra NaCl 0,15 M para retirada de excesso de EDTA. Logo depois, a atividade hemaglutinante foi analisada normalmente (ECHEMENDIA-BLANCO *et al.*, 2009).

### 3.13 Dosagem de carboidratos totais

A lectina em solução na concentração 2 mg/mL, solubilizada em NaCl 0,15 M, foi submetida ao método de Dubois (DUBOIS *et al.*, 1956) para determinar o conteúdo de carboidratos, utilizando-se galactose com padrão. De modo que 500 µL da solução de lectina foram adicionados a um tubo de ensaio, em duplicata, e a esse tubo foram adicionados 500 µL de Fenol 5% e 2,5mL de Ácido Sulfúrico concentrado lentamente e pela parede do tubo, na capela. O branco foi feito com a mesma solução utilizada para diluir a proteína. E então, foram-se esperados 30 minutos para se esfriar os tubos, pois a mistura produz uma reação exotérmica, e o conteúdo dos tubos foi lido no mesmo espectrofotômetro utilizado para o teste de Bradford no comprimento de onda de 490 nm.



### 3.14 Teste de letalidade de *Artemia* sp.

Para analisar o efeito citotóxico da lectina, cistos de *Artemia* sp. Foram colocados para eclodir sob luz, aeração e temperatura controlada, como descrito a seguir: 30 mg de cistos de artêmia foram pesados, adicionados em um béquer com 300 mL de água do mar natural autoclavada e incubados por 48 h. Após isto, foi preparada uma solução com a lectina na concentração de 200 µg/mL em água do mar natural autoclavada. Em seguida, foi adicionada em uma placa Linbro de 24, a alíquota da solução de proteínas em cada poço com concentrações finais de 12,5, 25, 50, 100 µg/mL, em cada. Após isso, mais uma alíquota da solução de água do mar natural contendo 10 exemplares de náuplios foi adicionada, deixando ao final, 2 mL de solução por poço. A análise foi conduzida de forma triplicada, para cada diferente concentração, onde o controle foi feito semelhantemente, mas sem a adição da lectina. Já para inibir o efeito da lectina, nas mesmas concentrações, ela foi incubada em água do mar natural autoclavada com 0,1 M de N-acetil-D-glicosamina, por 1h a 37 °C (VANHAECKE et al., 1981).

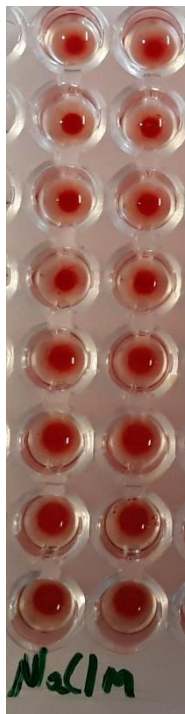
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Purificação da Lectina de Sementes de *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub

Inicialmente uma triagem de tampões de extração foi feita na proporção 1:10, onde apenas o extrato do tampão NaCl 0,15 M apresentou atividade, diante dos tampões Glicina 0,1 M pH 2,6, Acetato 0,1 M pH 4,0, Tris 0,1 M pH 7,6 e Glicina 0,1 M pH 9,0. Então, as já usuais técnicas de extração e purificação de lectinas vegetais foram aplicadas aqui para purificar *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub. São elas: extração utilizando soluções salinas e/ou ácidas, precipitação por solventes orgânicos ou por sais neutros e fracionamento por técnicas cromatográficas (BELITZ *et al.* 1990). Outra técnica comum que foi utilizada para identificação é a da atividade hemaglutinate, que só é possível devido a capacidade das lectinas de interagirem com glicoconjugados na superfície celular (PEUMANS; VAN DAMME, 1995).

O extrato proteico preparado com a farinha de sementes de *D. ecastophyllum* (L.) Taub em NaCl 0,15 M apresentou atividade apenas em sangue de coelho nativo e tratado com tripsina, com o maior resultado sendo dado em sangue nativo (Figura 1). Isso se torna um fato interessante se compararmos com seu parente próximo recém purificado, a MAL, lectina de *Machaerium acutifolium* Vogel, um integrante da tribo Dalbergieae que obteve níveis altos de atividade hemaglutinante, tanto em sangue de coelho quanto humano do sistema ABO, mesmo tratados com enzimas proteolíticas e não tratados (MARTINS., 2017).

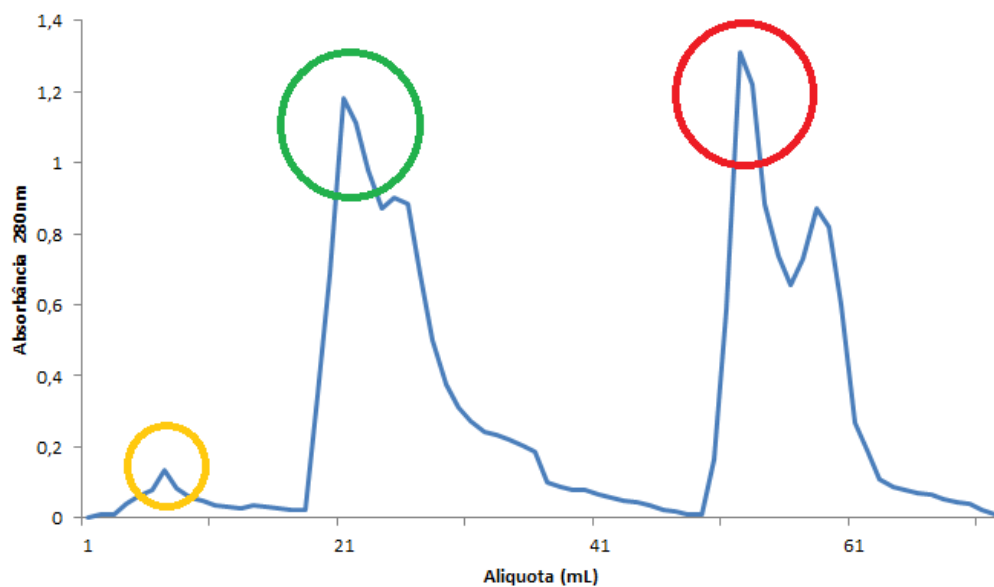
**Figura 1.** NaClM – Extrato de farinha de *Dalbergia*.



**Fonte:** Elaborada pela autora. Extrato em NaCl 0,15M fracionado em NaCl 0,15 M com  $\text{CaCl}_2$  5 mM E  $\text{MnCl}_2$  5 mM em sangue nativo de coelho.

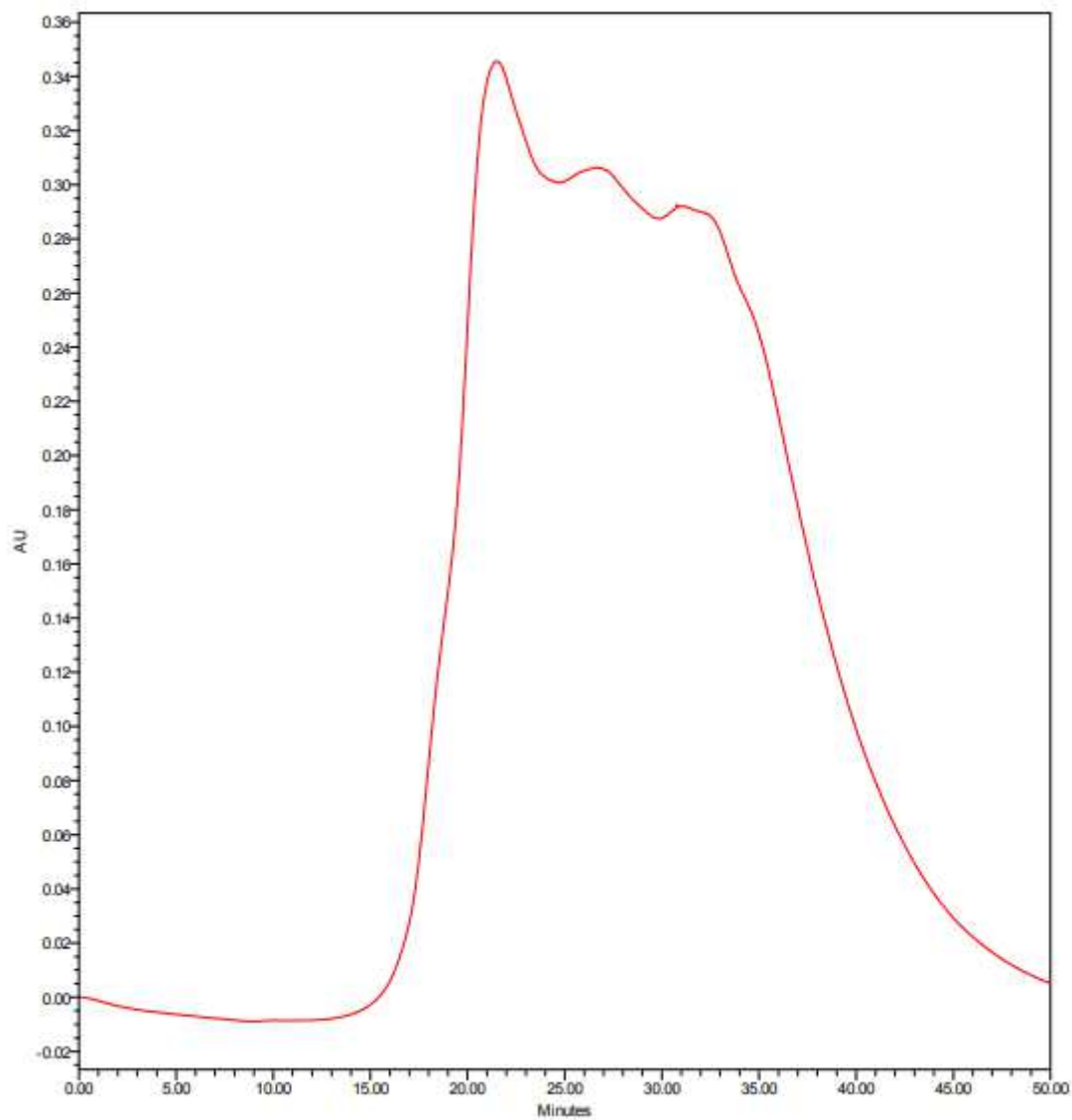
A lectina de sementes de *D. ecastophyllum* (L.) Taub, aqui chamada de DeL, foi purificada em uma etapa cromatográfica. A atividade hemaglutinante se apresentou apenas no extrato e nas duas últimas frações (Gráfico 1), por isso, estas frações foram aplicadas na coluna de exclusão molecular. Com a fração 2 apresentando um pico muito amplo (Gráfico 2) e apenas a fração três apresentando um único pico, indicando que estava pura (Gráfico 3). Após isso, a atividade foi refeita com os eluídos da matriz de exclusão onde as duas frações apresentaram atividade (Figura 2).

**Gráfico 1.** Cromatograma de DeL em matriz de Quitina.



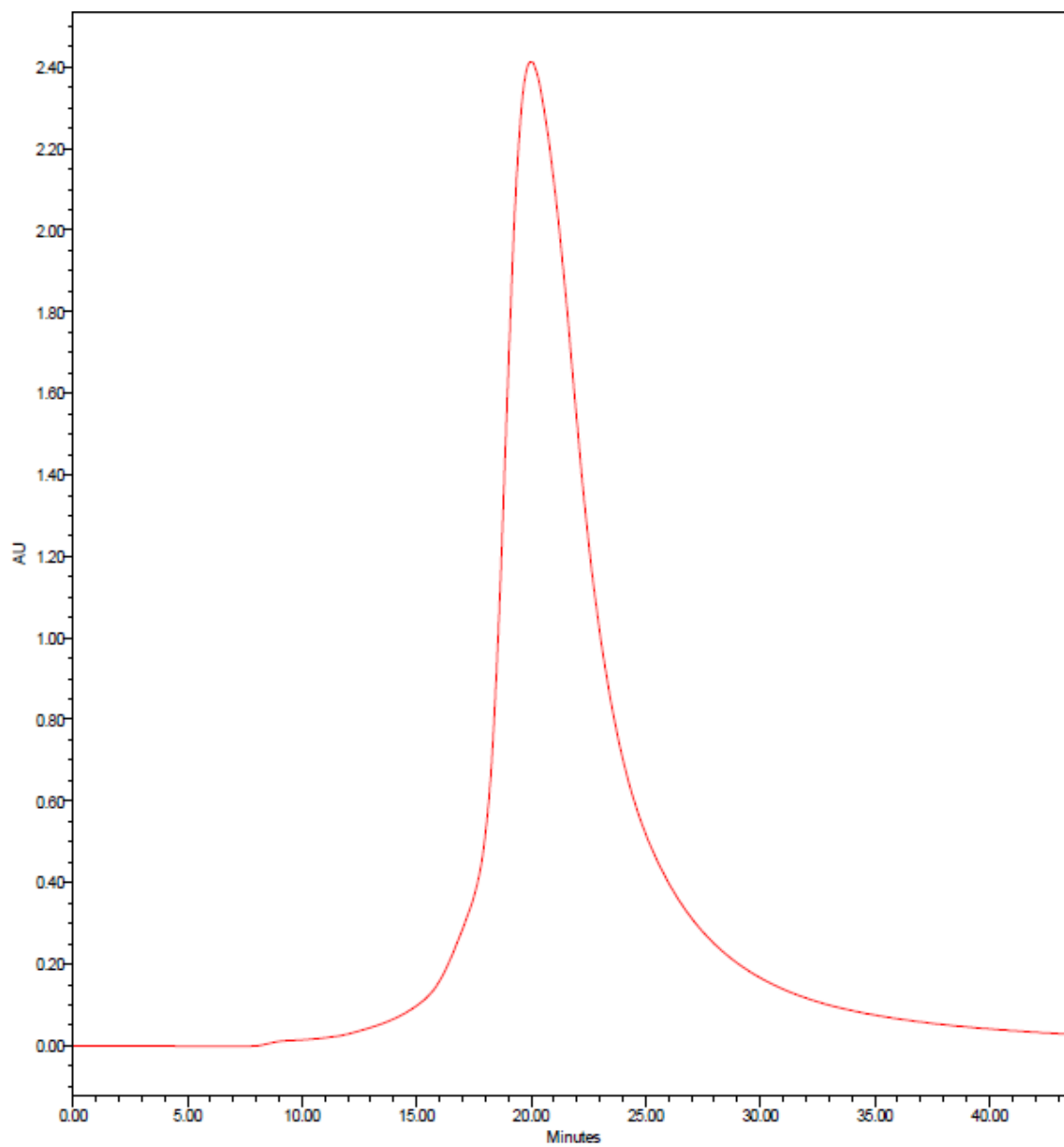
**Fonte:** Elaborado pela autora. P1(amarelo) eluído com NaCl 0,15 M com CaCl<sub>2</sub> 5 mM e MnCl<sub>2</sub> 5 mM; P2 (verde) eluído com Glicina 0,1M pH 2,6 e P3 (vermelho) eluído com Glicina 0,1M pH 9.

**Gráfico 2.** Cromatograma de P2.



**Fonte:** Elaborado pela autora. P2 eluído com tampão fosfato dibásico pH 7,6 com NaCl 0,15 M.

**Gráfico 3.** Cromatograma de P3.



**Fonte:** Elaborado pela autora. P3 eluído com tampão fosfato dibásico pH 7,6 com NaCl 0,15 M.

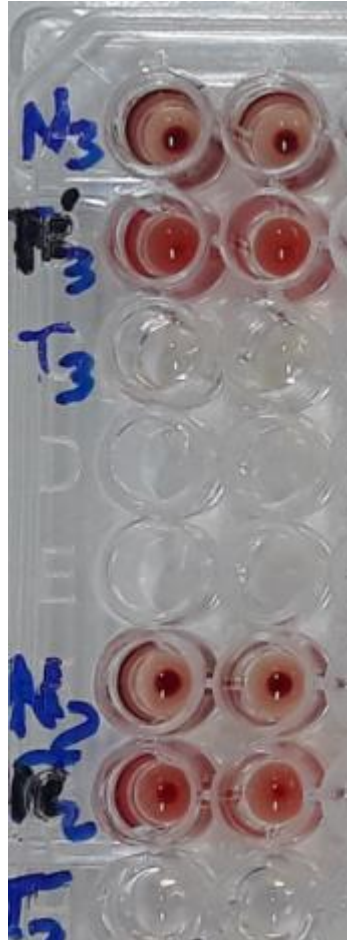
**Figura 2.** Atividade hemaglutinante das frações eluídas por exclusão molecular.



**Fonte:** Elaborado pela autora. Frações em tampão fosfato dibásico pH 7,6 com NaCl 0,15 M. fracionado em NaCl 0,15 M com  $\text{CaCl}_2$  5 mM E  $\text{MnCl}_2$  5 mM em sangue nativo de coelho.

Porém, apesar desse resultado duplamente positivo não se repetiu quando as frações liofilizadas da matriz de Quitina foram submetidas ao teste de atividade hemaglutinante. Apenas, a terceira fração apresentou atividade (Figura 3).

**Figura 3.** Atividade hemaglutinante das frações liofilizadas eluídas em matriz de Quitina.



**Fonte:** Elaborado pela autora. Frações em tampão NaCl 0,15 M com CaCl<sub>2</sub> 5 mM E MnCl<sub>2</sub> 5 mM em sangue nativo de coelho.

Então, a lectina foi purificada em uma etapa, onde apenas a última apresentou atividade depois de liofilizada juntamente com o extrato o que resultou em um grau de pureza de duas vezes (Tabela 1).



**Tabela 1.** Processo de purificação da lectina de *D. ecastophyllum* (L.) Taub.

| Fração     | Proteínas <sup>1</sup> (mg/mL) | U.H/mL <sup>2</sup> | A.H.E <sup>3</sup> (U.H/mg) | Fator de Purificação <sup>4</sup> |
|------------|--------------------------------|---------------------|-----------------------------|-----------------------------------|
| Extrato    | 0,43                           | 32                  | 74,41                       | 1                                 |
| P3-Quitina | 0,22                           | 32                  | 145,45                      | 1,95                              |

**Fonte:** Elaborado pela autora. <sup>1</sup>Concentração de proteínas determinada pelo método de Bradford (1976). <sup>2</sup>Atividade hemaglutinante contra eritrócitos de coelho (nativo), expressa em termos de Unidade Hemaglutinante (U.H) por mL. <sup>3</sup>Atividade Hemaglutinante Específica calculada pela divisão entre a atividade hemaglutinante e concentração de proteínas. <sup>4</sup>Fator de Purificação, calculada pela divisão entre a atividade hemaglutinante específica do extrato e aquela de cada passo de purificação.

A especificidade por carboidratos foi determinada através da inibição da atividade hemaglutinante em diferentes soluções de açúcares, onde os melhores resultados foram com N-acetil-D-glicosamina, Melibiose, L-rhamnose, como apresentados a seguir (Tabela 2). A N-acetil-D-glicosamina é o monossacarídeo que constitui o polímero quitina, que foi a matriz utilizada para purificação. Esse monossacarídeo também possui muitas aplicações na área da saúde com efeito anti-inflamatório, antienvhecimento e contra danos nas articulações (IBEROQUIMICA, 2018). Já Melibiose é um dissacarídeo redutor formado por uma ligação  $\alpha$ -1,6 entre galactose e glicose, onde sua única diferença com relação a lactose é a quiralidade do carbono onde o anel da galactose está fechado e a galactose está ligada a um ponto diferente da fração glicose (ROBYT., 1998). A Ramnose é naturalmente encontrada nas paredes celulares de vegetais e bactérias gram-negativas do gênero *Mycobacterium*. Apesar da maioria dos açúcares ocorrerem naturalmente na forma dextrogra, a ramnose é encontrada na natureza sob a forma levogira, L-ramnose (SIGMA-ALDRICH, 2019).

Comparativamente, tanto as lectinas de *Machaerium acutifolium* Vogel (MAL) (MARTINS., 2017) quanto de *Platymiscium floribundum* (PFL) (PEREIRA-JÚNIOR, 2011), igualmente extraídas de sementes, também apresentaram inibição por N-acetil-D-glicosamina. Porém, elas também têm em comum serem inibidas por manose, assim como a lectina de *Centrolobium microchaete* (CML) (VASCONCELOS *et al.*, 2015) da mesma tribo, assim diferindo da DeL. Além disso, ainda na mesma tribo,

lectinas de *Pterocarpus angolensis* (LORIS *et al.*, 2003) e *Platypodium elegans* (BENEVIDES, 2008) apresentaram inibição por glicose e manose, já *Varairea guianensis* (VGL) apresentou inibição por galactose (SILVA *et al.*, 2012). Semelhantemente, todas são extraídas de sementes.

**Tabela 2.** Inibição da atividade hemaglutinante no extrato total.

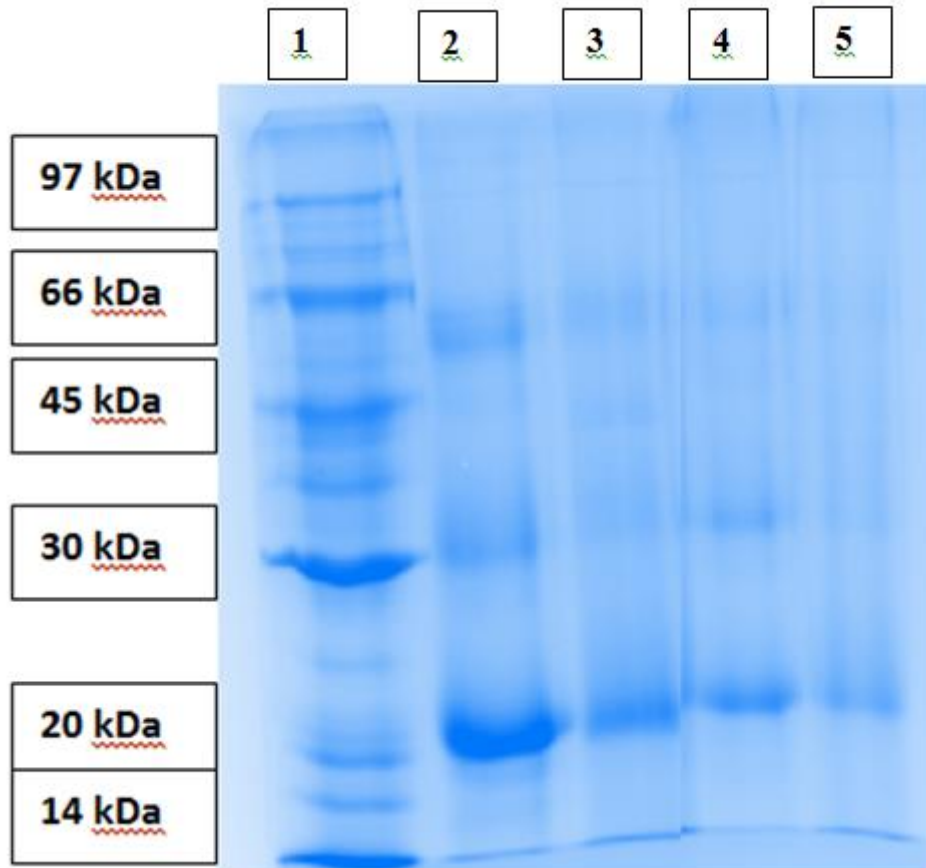
| Açúcares                           | Concentração inibitória mínima (mM) |
|------------------------------------|-------------------------------------|
| N-acetil-D-glicosamina             | 12,5                                |
| Melibiose                          | 25                                  |
| L-rhamnose                         | 25                                  |
| D-glucose                          | N.I                                 |
| D-manose                           | N.I                                 |
| $\alpha$ -metil-D-glucopiranosídeo | N.I                                 |
| $\alpha$ -metil-D-manosídeo        | N.I                                 |
| D-galactose                        | N.I                                 |
| $\alpha$ -lactose                  | N.I                                 |

**Fonte:** Elaborado pela autora. N.I – Não Inibido.

#### 4.2 Caracterização físico-química da lectina de sementes de *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub

Todo o processo de purificação foi monitorado por SDS-PAGE. A Figura 4 mostra o perfil eletroforético das frações proteicas correspondentes aos diferentes estágios de purificação da lectina, podendo observar-se que a lectina purificada é caracterizada por um perfil composto por uma banda, de aproximadamente 20 kDa. A lectina PFL também possui um perfil eletroforético composto por apenas uma banda de aproximadamente 29 kDa (PEREIRA-JÚNIOR, 2011), já a VGL, possui um perfil eletroforético de três bandas, onde uma delas tem peso molecular aparente de 30 kDa e duas peso molecular de 18 e 15 kDa, mesmo também pertencendo a tribo Dalbergieae (SILVA *et al.*, 2012). Além disso, a MAL foi caracterizada por um perfil composto por quatro bandas, uma principal de 30 kDa e menores pesando por volta de 18, 15 e 12 kDa (MARTINS., 2017).

**Figura 4.** Eletroforese em gel de poliacrilamida (12%) com sulfato dodecil de sódio (SDS-PAGE)

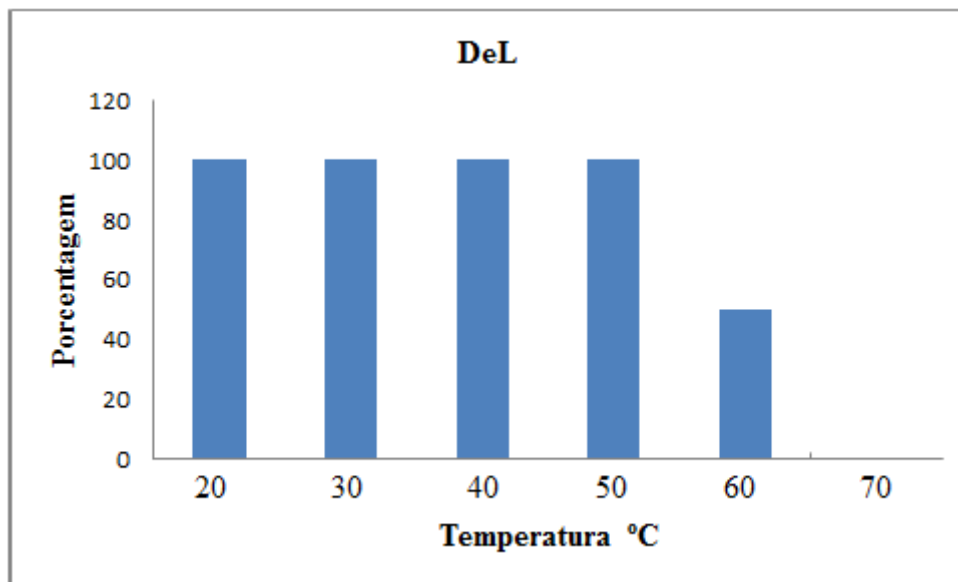


**Fonte:** Elaborado pela autora. 1) marcador molecular GE LMW, 2) fração dois eluída de matriz de Quitina, 3) fração três eluída em matriz de Quitina, 4) fração dois da matriz de Quitina eluída em matriz de exclusão e 5) fração três da matriz de Quitina eluída em matriz de exclusão.

Diante disso, a lectina foi submetida a varias temperaturas, onde a DeL (2mg/mL) conseguiu manter sua atividade hemaglutinante até 60°C, onde teve atividade reduzida pela metade. Acima de 70°C não teve atividade. Uma lectina semelhante é a ASL de *Andira surinamensis*, também da tribo Dalbergieae, que tem atividade reduzida a 70°C e a perde acima de 80°C. Ambas diferentes de PFL, lectina de *Platymiscium floribundum*, que mantêm atividade até 90°C, embora reduzida a

partir de 70 °C. É interessante ressaltar que todas não possuem atividade a 100 °C (MARTINS., 2017).

**Gráfico 4.** Estabilidade térmica da DeL.



**Fonte:** Elaborado pela autora. DeL a 2 mg/mL em NaCl 0,15 M com CaCl<sub>2</sub> 5 mM e MnCl<sub>2</sub> 5 mM.

Além disso, DeL foi submetida a uma abrangente faixa de pH com os tampões já mencionados na descrição metodológica. Não houve atividade hemaglutinante em nem um pH testado, corroborando os dados iniciais de triagem de tampão de extração. Em comparativo com lectinas da mesma tribo, DeL se sobressai por não possuir resistência a uma ampla faixa de pH. VGL (SILVA et al., 2012) e PFL (PEREIRA-JÚNIOR et al., 2014) mantêm atividade em pH 7 e 8, porém VGL atua melhor em uma faixa mais neutra de pH, entre 6 e 8, já PFL atua melhor em pH básico na faixa de 7 a 9. Em contra partida a MAL, lectina de *Machaerium acutifolium*, mantêm a atividade em apenas um pH, o pH 8.

Então, foi-se testado o efeito de EDTA na atividade hemaglutinante de DeL que não apresentou atividade na presença de EDTA. Também não apresentou atividade com apenas Cálcio ou Manganês presentes separadamente. Apenas apresentou atividade na presença de Cálcio e Manganês juntos, o que indica a dependência da lectina a cátions divalentes, tendo sua atividade restabelecida na presença deles. Semelhantemente a ASL, lectina de *Andira surinamensis*, que tem a atividade hemaglutinante reduzida após a diálise contra EDTA, mas é retomada após adição de Cálcio e Manganês (NOBRE, 2012), diferentemente da lectina de

*Pterocarpus angolensis* que não tem a atividade retomada (ECHEMENDIA-BLANCO *et al.*, 2009). Contudo, lectinas altamente resistentes, PFL e VGL nem se quer têm a atividade afetada (PEREIRA-JÚNIOR, 2011; SILVA *et al.*, 2012).

Ao se verificar a dosagem carboidratos totais pelo método Dubois, observou-se que a DeL possui 0,58% de carboidrato, o que se apresenta um baixo teor semelhante a lectina de *Platypodium elegans* que possui apenas 2% (ARARIPE *et al.*, 2017). Ambas diferentes da lectina de *Vatairea macrocarpa* que é uma glicoproteína com 8% de carboidratos (CAVADA *et al.*, 1998).

Por fim, DeL não apresentou atividade tóxica contra náuplios de *Artemia* sp. Diante disso, a DeL pode ser usada em ensaios biológicos *in vivo*, pois para tais ensaios é importante que a lectina não tenha atividade tóxica que possam vir a causar algum dano às células do animal.

## 5 CONCLUSÃO

A lectina DeL foi purificada e caracterizada físico-quimicamente. Teve seu perfil de massa molecular aparente, de apenas uma banda de aproximadamente 20 kDa, observado por meio de SDS-PAGE. Foi descoberto que DeL aglutina eritrócitos de coelho em sangue nativo e tratado com tripsina, além disso, ela também é inibida com maior especificidade por N-acetil-D-glucosamina. Apesar de ser termoestável, não é estável na ampla faixa de pH testada, nem na presença de EDTA. E não apresenta letalidade para *Artemia* sp. Diante disso, os planos futuros para a DeL são: determinar o tempo ideal de extração, conferir a letalidade em concentrações mais altas, determinar a massa molecular por espectrômetro de massa e determinar a estrutura primária. Também é preciso um estudo aprofundado do potencial farmacológico da DeL ligada aos açúcares já presentes na indústria farmacêutica, valendo-se de sua característica atóxica.

## REFERÊNCIAS

ARARIPE, D. A.; PINTO-JÚNIOR, V.R.; NECO, A.H.B.; SANTIAGO, M.Q.; OSTERNE, V.J.S.; PIRES, A.F.; LÓSSIO, C.F.; MARTINS, G.Q.M.; CORREIA, J.L.A.; BENEVIDES, R.G.; LEAL, R.B.; ASSREUY, A.M.S.; NASCIMENTO, K. S.; CAVADA, B.S. Partial characterization and immobilization in CNBe-activated Sepharose of a native lectin from *Platypodium elegans* seeds (PELa) and comparative study of edematogenic effect with the recombinant from. **International Journal of Biological Macromolecules.**, v. 102, p. 323-330, 2017.

BENEVIDES, R. G. **Avaliação do Potencial Fungicida e Termiticida de uma Fração Protéica Lectínica de Sementes de *Platypodium elegans* Vogel e Obtenção da Lectina Purificada.** 151 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) –Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

BRADFORD, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, [s.l.], v. 72, n. 1-2, p.248-254, 7 maio 1976. Elsevier BV.

CALVETE, J. J.; SANTOS, C. F.; MANN, K.; GRANGEIRO, T. B.; NIMTZ, M.; URBANKE, C.; CAVADA, B. S. Amino acid sequence, glycan structure, and proteolytic processing of the lectin of *Vatairea macrocarpa* seeds. **FEBS Letters**, v. 425, p. 286-292, 1998.

CARVALHO, A. M. de. A Synopsis of the Genus *Dalbergia* (Fabaceae: Dalbergieae) in Brazil. **Brittonia**, [s.l.], v. 49, n. 1, p.87-97, jan. 1997. Springer Science and Business Media LLC.

CAVADA, B. S.; SANTOS, C. F.; GRANGEIRO, T. B.; NUNES, E. P.; SALES, P. V. P.; RAMOS, R. L. Purification and characterization of a lectin from seeds of *Vatairea macrocarpa* Ducke. **Phytochemistry**, v. 49, p. 675-680, 1998.

CAVADA, B. *et al.* Revisiting proteus: Do Minor Changes in Lectin Structure Matter in Biological Activity? Lessons from and Potential Biotechnological Uses of the

Diocleinae Subtribe Lectins. **Current Protein & Peptide Science**, [s.l.], v. 2, n. 2, p.123-135, 1 jun. 2001. Bentham Science Publishers Ltd.

COELHO, L.C. B. B. *et al.* Lectins as antimicrobial agents. **Journal Of Applied Microbiology**, [s.l.], v. 125, n. 5, p.1238-1252, 26 ago. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jam.14055>.

COLLINGE, D. B. *et al.* Plant chitinases. **The Plant Journal**, [s.l.], v. 3, n. 1, p.31-40, jan. 1993. Wiley.

CORRÊA, A. C. *et al.* Liposomal Taro Lectin Nanocapsules Control Human Glioblastoma and Mammary Adenocarcinoma Cell Proliferation. **Molecules**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 3, p.471-481, 29 jan. 2019.

DAMME, E. J. M. *et al.* Molecular Cloning of Two Different Mannose-Binding Lectins from Tulip Bulbs. **European Journal Of Biochemistry**, [s.l.], v. 236, n. 2, p.419-427, mar. 1996. Wiley.

DAUGSCH, Andreas. **A própolis vermelha do nordeste do Brasil e suas características químicas e biológicas**. 2007. 133 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

DONNELLY, D. M. X.; KEENAN, P. J.; PRENDERGAST, J. P.. Isoflavonoids of *Dalbergia ecastophyllum*. **Phytochemistry**, [s.l.], v. 12, n. 5, p.1157-1161, maio 1973. Elsevier BV.

ECHEMENDIA-BLANCO D, VAN DRIESSCHE E, NCUBE I, READ JS, BEECKMANS S. Stability, subunit interactions and carbohydrate-binding of the seed lectin from *Pterocarpus angolensis*. **Protein Pept Lett**, v. 16(9), p. 1120-1134, 2009.

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



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

GRANGEIRO, T.b et al. Atividade hemaglutinante em sementes de *Dioclea rostrata* Benth. **Acta Botanica Brasilica**, [s.l.], v. 4, n. 21, p.61-68, 1990. FapUNIFESP (SciELO).

IBEROQUIMICA. **N-Acetil-D-Glucosamina**: Saúde das articulações Combate o envelhecimento e manchas cutâneas. 2018. Disponível em: <<https://www.iberquimica.com.br/Arquivos/Insumo/LAMINA-165648.pdf>>. Acesso em: 20 jul. 2018.

LAEMMLI, U. K.. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, [s.l.], v. 227, n. 5259, p.680-685, ago. 1970. Springer Science and Business Media LLC.

LORIS, Remy *et al.* Legume lectin structure. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Protein Structure And Molecular Enzymology**, [s.l.], v. 1383, n. 1, p.9-36, mar. 1998. Elsevier BV.

MARTINS, Francisco William Viana. **Caracterização físico-química parcial de uma lectina isolada de sementes de *Machaerium acutifolium* Vogel**. 2017. 66 f. TCC (Graduação) - Curso de Agronomia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

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

PARK, Yong Kun et al. ESTUDO DA PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS E SUAS APLICAÇÕES. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [s.l.], v. 18, n. 3, p.313-318, ago. 1998. FapUNIFESP (SciELO).

NOBRE, C. B. **Caracterização físico-química e efeito sobre bactérias orais de uma lectina de sementes de *Andira surinamensis* (Bondt) Splitg. Ex Amshoff.**

Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

PEREIRA-JÚNIOR, F. N. **Purificação, caracterização parcial e cristalização de uma lectina ligante de manose/N-acetil-D-glicosamina das sementes de *Platymiscium floribundum* VOGEL.** 2011. 78 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

PEREIRA-JÚNIOR, F. N.; Purification and characterization of a mannose/N-acetyl Dglucosamine-specific lectin from the seeds *Platymiscium floribundum* Vogel. **Journal of Molecular Recognition**, v.25, p. 443-449, 2014.

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

PEUMANS, W. J. *et al.* Classification of Plant Lectins in Families Of Structurally and Evolutionary Related Proteins. **The Molecular Immunology Of Complex Carbohydrates —2**, [s.l.], p.27-54, 2001. Springer US.

PIRES, A. F. *et al.* Lectin purified from Lonchocarpus campestris seeds inhibits inflammatory nociception. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 125, p.53-60, mar. 2019. Elsevier BV.

PINTO, L. S. *et al.* Caracterização química e bioquímica de sementes de Bauhinia variegata L. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, [s.l.], v. 9, n. 3, p.385-390, set. 2005. FapUNIFESP (SciELO).

ROBYT, John F.. **Essentials of Carbohydrate Chemistry**. New York: Springer, 1998.

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

SIGMA-ALDRICH. **L-Rhamnose monohydrate**. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/r3875?lang=pt@ion=BR>>. Acesso em: 10 dez. 2019.

SILVA, H. C.; NAGANO, C.S.; SOUZA, L.A.G.; NASCIMENTO, K.S.; ISÍDRO, R.; DELATORRE, P.; ROCHA, B.A.M.; SAMPAIO, A.H.; ASSREUY, A.M.S.; PIRES, A.F.; DAMASCENO, L.E.A.; MARQUES-DOMINGOS, G.F.O.; CAVADA, B.S. Purification and primary structure determination of a galactose-specific lectin from *Vatairea guianensis* Aublet seeds that exhibits vasorlaxant effect. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 2347-2355, 2012.

SOL, Francisca Gallego del et al. Lectinas Encargadas de descifrar los códigos relativos a los glúcidos, estas proteínas se caracterizan por su exquisita selectividad, lo que las convierte en valiosas herramientas bioquímicas. **Investigación y Ciencia**, Espanha, v. 1, n. 361, p.58-67, out. 2006. Mensal.

VAN DAMME, E.J.M.; BRIKÉ, F.; WINTER, H.C.; VAN LEUVEN, F.; GOLDSTEIN, I.J. AND PEUMANS, W.J. Molecular cloning of two different mannose-binding lectins from tulip bulbs. **European journal of biochemistry**, v. 236, p. 419-427, 1996.

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

VANHAECKE, Paul et al. Proposal for a short-term toxicity test with *Artemia nauplii*. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, [s.l.], v. 5, n. 3, p.382-387, set. 1981. Elsevier BV.

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

VASCONCELOS, M.A.; ALVES, A.C.; CARNEIRO, R.F.; DIAS, A.H.S.; MARTINS, F.W.V.; CAJAZEIRAS, J.B.; NAGANO, C.S.; TEIXEIRA, E.H.; DO NASCIMENTO, K.S.; CAVADA, B.S. Purification and primary structure of a novel mannose-specific lectin from *Centrolobium microchaete* Mart seeds. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 81, p. 600-607, 2015.

ZANETTI, Gilberto Dolejal. **Lectina dos rizomas de Arundo Donax L.: purificação, caracterização, propriedades, imuno-histoquímica e separação das isoformas.** 2007. 262 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2007.

ZAPPI, D. C. *et al.* Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, [s.l.], v. 66, n. 4, p.1085-1113, 2015. FapUNIFESP (SciELO).