



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

**LARA DIAS LIMA**

**PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE DE UMA  
NOVA LECTINA DAS SEMENTES DE *Bauhinia rufa* (BONG.) STEUD**

**FORTALEZA**

**2021**

LARA DIAS LIMA

PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE DE UMA  
NOVA LECTINA DAS SEMENTES DE *Bauhinia rufa* (BONG.) STEUD

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada.

Coorientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Kyria Santiago do Nascimento

FORTALEZA

2021

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)

---

- L698p Lima, Lara Dias.  
Purificação, caracterização e avaliação de toxicidade de uma nova lectina das sementes de Bauhinia rufa (Bong.) Steud / Lara Dias Lima. – 2021.  
61 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2021.  
Orientação: Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada.
1. Bauhinia rufa. 2. Lectina específica a lactose. 3. Cercidoideae. I. Título.

CDD 572

---

LARA DIAS LIMA

PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE DE UMA  
NOVA LECTINA DAS SEMENTES DE *Bauhinia rufa* (BONG.) STEUD

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada.

Coorientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Kyria Santiago do Nascimento

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

BANCA EXAMINADORA

---

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

---

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

---

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

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, pelo cuidado, força e saúde.

À minha família por todo o apoio, incentivo e amor durante essa jornada.

Aos professores Dr. Benildo Sousa Cavada e Dr<sup>a</sup>. Kyria Santiago do Nascimento, pela orientação e aprendizado repassado, bem como pela oportunidade de fazer parte da equipe do BioMol-Lab.

Aos professores participantes da banca examinadora Dr. Benildo Sousa Cavada, Dr<sup>a</sup> Kyria Santiago do Nascimento e Dr. João Batista, bem como os suplentes Dr. Vanir Reis e Dr. Vinícius Osterne, pela disponibilidade, colaborações e sugestões.

Aos meus amigos próximos, especialmente Davi, Cristine, Juliana e Tiago, que me acompanham desde a graduação e também me acompanharam durante toda essa etapa do mestrado.

A todos meus colegas do BioMol-Lab, dos alunos de iniciação científica aos bolsistas de pós-doc, pela companhia, aprendizado, esclarecimento de dúvidas e colaboração em geral, os quais foram indispensáveis para que esse trabalho pudesse ser desenvolvido.

A todos os meus amigos e colegas da turma 2019.1 de mestrado em Bioquímica pelo apoio e companhia durante todo o período dessa etapa.

Às agências de fomento pelo apoio financeiro, permitindo a manutenção dos projetos e da bolsa de auxílio. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Por fim, agradeço a todos que direta ou indiretamente possibilitaram a conclusão dessa etapa acadêmica.

We all change, when you think about it. We're all different people all through our lives. And that's ok, [...] you gotta keep moving, so long as you remember all the people that you used to be. (Steven Moffat, 2014).

## RESUMO

A interação entre glicanos da superfície celular com proteínas tem papel fundamental em inúmeras funções vitais dos sistemas biológicos, sendo as lectinas consideradas excelentes ferramentas para os estudos de interação e especificidade entre proteínas-carboidratos. As lectinas vegetais destacam-se como um dos maiores campos de estudo, com foco especial para a família *Leguminosae* (*Fabaceae*), apresentando diversas proteínas já purificadas e caracterizadas. Esta família também compreende a subfamília *Cercidoideae* a qual apresenta o gênero *Bauhinia*, também conhecida como “pé de vaca” ou “unha de vaca”. Em relação às lectinas de *Bauhinia*, inúmeras atividades biológicas têm sido relatadas, como inibição do crescimento de células cancerígenas, atividade antinociceptiva, anti e pró-inflamatória, inseticida e antifúngica. Neste estudo, uma nova lectina ligante a lactose, denominada BRL, foi purificada de sementes de *Bauhinia rufa* (Bong.) Steud por cromatografia de afinidade usando uma coluna de agarose-lactose. BRL aglutinou eritrócitos de coelho (nativos e tratados com enzimas proteolíticas) e foi inibida fortemente por  $\alpha$ -lactose, seguida de GalNAc, D-galactose, melibiose e ramnose. Análises de SDS-PAGE evidenciaram BRL com perfil eletroforético de banda única com massa molecular aparente de 35 kDa (na presença e ausência de  $\beta$ -mercaptoetanol). BRL apresentou-se como uma glicoproteína estável (9,34% de conteúdo de carboidratos) mantendo sua atividade após exposição a 60°C por uma hora e atividade ótima entre pH 5,0 e 6,0. A lectina também apresenta dependência a metais divalentes ( $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ ) e não apresentou toxicidade contra náuplios de *Artemia* nas concentrações testadas. O presente trabalho teve como objetivo a purificação, estudo da especificidade e propriedades físico-químicas de uma nova lectina de *Bauhinia rufa*, bem como avaliar seu efeito tóxico contra náuplios de *Artemia* sp.

**Palavras-chave:** *Bauhinia rufa*. Lectina específica a lactose. *Cercidoideae*.

## ABSTRACT

The interaction of cell-surface glycans with proteins has an important role in numerous vital functions to biological systems and lectins present themselves as an excellent tool for establishing studies of protein-carbohydrate interaction and specificity. Plant lectins stand out as one of the largest fields of study, given a special focus for the *Leguminosae* (*Fabaceae*) family, which presents several proteins already purified and characterized. This family also comprises the *Cercidoideae* subfamily, which presents the genus *Bauhinia*, also known as “cow's foot” or “cow's claw”. Regarding the *Bauhinia* lectins numerous biological activities have been reported such as inhibition of cancer cell growth, antinociceptive, anti and pro-inflammatory, insecticide, and antifungal activity. In this study, a new lactose-binding lectin, named BRL, has been purified from seeds of *Bauhinia rufa* (Bong.) Steud by affinity chromatography using an agarose-lactose column. BRL hemagglutinated rabbit erythrocytes (native and treated with proteolytic enzymes) and was strongly inhibited by  $\alpha$ -lactose, followed by GalNAc, D-galactose, melibiose and rhamnose. By SDS-PAGE analysis, BRL profile is presented as a single band with an apparent molecular mass of 35 kDa (in the presence and absence of  $\beta$ -mercaptoethanol). BRL was shown to be a stable glycoprotein (9.34% carbohydrate content) maintaining its activity after exposure at 60°C for one hour and optimum activity in pH between 5.0 and 6.0. The lectin also presents a metal dependence ( $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$ ) and showed no toxicity against *Artemia* nauplii. The present work aimed to purify, study the specificity and physicochemical properties of a new lectin from *Bauhinia rufa*, as well as evaluate its toxicity effect against *Artemia* sp. nauplii.

**Keywords:** *Bauhinia rufa*. Lactose-specific lectin. *Cercidoideae*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Imagem ilustrativa de <i>N</i> - e <i>O</i> - glicosilações, bem como de processos gerais de modificações pós-traducionais .....	18
Figura 2 – Classificação estrutural das lectinas vegetais .....	23
Figura 3 – Esquemas representativos dos monômeros no motivo <i>jelly roll</i> em lectinas de leguminosas .....	30
Figura 4 – Exemplo dos cinco principais tipos de interfaces em lectinas de leguminosas	31
Figura 5 – Imagem representativa da estrutura tridimensional da lectina de <i>B. forficata</i> e sua sobreposição com as lectinas de <i>Griffonia simplicifolia</i> .....	34
Figura 6 – Imagem representativa da <i>Bauhinia rufa</i> (Bong.) Steud .....	37
Figura 7 – Perfil cromatográfico da BRL em coluna de afinidade agarose-lactose .....	45
Figura 8 – Perfil eletroforético da BRL em gel de poliacrilamida na presença de SDS .....	47
Figura 9 – Caracterização físico-química da BRL .....	50

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Famílias de lectinas vegetais classificadas de acordo com suas relações evolutivas e estruturas de seus motivos proteicos .....	25
Tabela 2	– Atividade hemaglutinante da BRL em diferentes eritrócitos, sem tratamento e tratados com enzimas .....	44
Tabela 3	– Tabela de purificação da lectina de sementes de <i>Bauhinia rufa</i> .....	46
Tabela 4	– Efeito inibitório de carboidratos na atividade hemaglutinante da BRL .....	48

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABA	Aglutinina de <i>Agaricus bisporus</i>
Asn	Asparagina
Asp	Ácido aspártico
BBL	Lectina extraída de <i>Bauhinia bauhinoides</i>
BfL-I	Lectina extraída de <i>Bauhinia forficata</i>
BfL-II	Lectina recombinante extraída de <i>Bauhinia forficata</i>
BmoLL	Lectina extraída das folhas de <i>Bauhinia monandra</i>
Bmorol	Lectina extraída da raiz de <i>Bauhinia monandra</i>
BPH	Lectina extraída de <i>Bauhinia purpurea</i>
BPL	Lectina extraída de <i>Bauhinia pentandra</i>
BRL	Lectina extraída de <i>Bauhinia rufa</i>
BSA	Proteína albumina sérica bovina
BUL	Lectina extraída de <i>Bauhinia unguolata</i>
Bvcl	Lectina extraída de <i>Bauhinia variegata</i> var. cândida
BVL	Isoformas de <i>Bauhinia variegata</i>
BvvL	Lectina extraída de <i>Bauhinia</i> var. <i>variegata</i>
CL <sub>50</sub>	Concentração letal média
ConA	Lectina extraída de <i>Canavalia ensiformis</i>
ConBr	Lectina extraída de <i>Canavalia brasiliensis</i>
CRA	Aglutininas relacionadas à quitinase
CRD	Domínio de reconhecimento a carboidratos
Da	Unidade de medida Daltons
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
EUL	Lectina extraída de <i>Euonymus europaeus</i>
GalNAc	<i>N</i> -acetil-D-galactosamina
GlcNAc	<i>N</i> -acetil-D-glicosamina
GNA	Aglutinina de <i>Galanthus nivalis</i>
GSL	Lectina de <i>Griffonia simplicifolia</i>
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência

MBS	Sítio de ligação a metais
MIC	Concentração inibitória mínima
MTT	Brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio
PDB	Protein Data Bank
PHA	Lectina extraída de <i>Phaseolus vulgaris</i>
PLG	Proteínas ligantes a glicanos
PNA	Lectina extraída de <i>Arachis hypogaea</i>
PPL-2	Lectina extraída de <i>Parkia platycephala 2</i>
RIP	Proteína Inativadora de Ribossomos
SDS-PAGE	Eletroforese em condição desnaturante ou na presença de SDS
Ser	Serina
TEMED	Tetrametiletlenodiamina
Thr	Treonina
TxLCI	Lectina extraída do bulbo de tulipa
UFC	Universidade Federal do Ceará
UH	Unidade de Hemaglutinação
WGA	Lectina extraída do gérmen de trigo

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	17
<b>2.1</b>	<b>Carboidratos</b> .....	17
<b>2.2</b>	<b>Lectinas</b> .....	20
<b>2.2.1</b>	<i>Histórico e definições</i> .....	20
<b>2.2.2</b>	<i>Funcionalidades e classificação das lectinas vegetais</i> .....	22
<b>2.2.2.1</b>	<i>Subdivisão baseada na organização estrutural</i> .....	23
<b>2.2.2.2</b>	<i>Subdivisão baseada nas relações evolutivas</i> .....	24
<b>2.2.3</b>	<i>Noções gerais de lectinas de leguminosas</i> .....	28
<b>2.2.4</b>	<i>Atividades biológicas relacionadas a lectinas</i> .....	32
<b>2.3</b>	<b>Lectinas do gênero <i>Bauhinia</i></b> .....	32
<b>2.4</b>	<i><b>Bauhinia rufa</b> (Bong.) Steud.</i> .....	37
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	38
<b>3.1</b>	<b>Objetivo Geral</b> .....	38
<b>3.2</b>	<b>Objetivos Específicos</b> .....	38
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	39
<b>4.1</b>	<b>Reagentes</b> .....	39
<b>4.2</b>	<b>Materiais Biológicos</b> .....	39
<b>4.2.1</b>	<i>Eritrócitos</i> .....	39
<b>4.2.2</b>	<i>Sementes de <b>Bauhinia rufa</b></i> .....	39
<b>4.3</b>	<b>Detecção da lectina de sementes de <i>Bauhinia rufa</i></b> .....	39
<b>4.4</b>	<b>Ensaio de atividade hemaglutinante e quantificação de proteínas solúveis totais</b> .....	40
<b>4.5</b>	<b>Ensaio de inibição de atividade hemaglutinante por açúcares</b> .....	40
<b>4.6</b>	<b>Purificação da lectina de sementes de <i>Bauhinia rufa</i></b> .....	41
<b>4.7</b>	<b>Quantificação de carboidratos</b> .....	41
<b>4.8</b>	<b>Determinação do grau de pureza e peso molecular aparente por SDS-PAGE</b> .....	42
<b>4.9</b>	<b>Efeito da temperatura e pH sobre a atividade hemaglutinante</b> .....	43
<b>4.10</b>	<b>Efeito de íons divalentes sobre a atividade hemaglutinante</b> .....	43

4.11	Ensaio de toxicidade contra <i>Artemia</i> sp. ....	43
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	44
5.1	Purificação da lectina de sementes de <i>Bauhinia rufa</i> .....	44
5.2	Caracterização físico-química de BRL .....	47
5.3	Teste de toxicidade contra <i>Artemia</i> sp. ....	51
6	CONCLUSÃO .....	53
	REFERÊNCIAS .....	54