



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

JEFFERSON VASCONCELOS SAMPAIO

AMPLIFICAÇÃO DE GENE DE LECTINA A PARTIR DE FOLHAS DE *Bauhinia*
pentandra (Bong.) D.Dietr.

FORTALEZA

2025

JEFFERSON VASCONCELOS SAMPAIO

AMPLIFICAÇÃO DE GENE DE LECTINA A PARTIR DE FOLHAS DE *Bauhinia*
pentandra (Bong.) D.Dietr.

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

Orientadora: Prof.^a Dra. Kyria Santiago do
Nascimento
Coorientador: Dr. Messias Vital de Oliveira

FORTALEZA

2025

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

S183a Sampaio, Jefferson Vasconcelos.

Amplificação de gene de lectina a partir de folhas de Bauhinia pentandra (Bong.) D.Dietr / Jefferson Vasconcelos Sampaio. – 2025.

43 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2025.

Orientação: Profa. Dra. Kyria Santiago do Nascimento,.

Coorientação: Profa. Dra. Messias Vital de Oliveira.

1. Bauhinia pentandra . 2. PCR convencional . 3. Gene. 4. Lectina. I. Título.

CDD 661

JEFFERSON VASCONCELOS SAMPAIO

AMPLIFICAÇÃO DE GENE DE LECTINA A PARTIR DE FOLHAS DE *Bauhinia*
pentandra (Bong.) D.Dietr.

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
título de Bacharel em Biotecnologia.

Aprovado em 09/10/25.

BANCA EXAMINADORA

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

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

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

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo obter o amplicon do gene de lectina a partir de folhas de *Bauhinia pentandra* (Bong.) D.Dietr. As plantas do gênero *Bauhinia*, conhecidas popularmente como pata-de-vaca em razão do formato de suas folhas, são utilizadas na medicina popular devido às suas propriedades hipoglicemiantes e diuréticas. Assim, torna-se de grande interesse investigar os potenciais biotecnológicos de suas lectinas, especialmente, considerando que apenas uma espécie desse gênero possui estrutura definida experimentalmente. Após a coleta de folhas jovens e saudáveis, o material foi imediatamente armazenado a -80°C e, em seguida, submetido à maceração em nitrogênio líquido (lise celular). A extração dos ácidos nucleicos foi realizada pelo método do CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio), seguida da remoção de RNA por tratamento com a enzima RNase A. Posteriormente, procedeu-se ao desenho dos primers e à otimização dos parâmetros da PCR convencional. A qualidade, integridade e quantidade do DNA obtido foram avaliadas por meio de eletroforese em gel de agarose e espectrofotometria. O amplicon gerado foi purificado com o uso de kit específico para produtos de PCR. Foi obtido material com parâmetros aceitáveis pelo método do CTAB, apresentando banda intacta em alto peso molecular, concentração de 2144 ng/ μL , razão 260/280 = 2,034 e razão 260/230 = 2,191. Após o tratamento com RNase A, os resultados foram 394 ng/ μL , 260/280 = 1,807 e 260/230 = 1,361. Obteve-se um amplicon entre 750 pb e 1000 pb, em conformidade com as lectinas depositadas em banco de dados.

Palavras-chave: *Bauhinia pentandra*; PCR convencional; Gene; Lectina

ABSTRACT

The present study aimed to obtain the amplicon of the lectin gene from leaves of *Bauhinia pentandra* (Bong.) D.Dietr. Plants of the genus *Bauhinia*, popularly known as cow's paw due to the shape of their leaves, are widely used in folk medicine because of their hypoglycemic and diuretic properties. Therefore, investigating the biotechnological potential of its lectins is of great interest, particularly given that only one species within this genus has had its structure experimentally determined. After collecting young and healthy leaves, the material was immediately stored at -80°C and subsequently subjected to maceration in liquid nitrogen (cell lysis). Nucleic acid extraction was carried out using the CTAB method (cetyltrimethylammonium bromide), followed by RNA removal with RNase A treatment. Primer design and optimization of conventional PCR parameters were then performed. The quality, integrity, and quantity of the DNA obtained were evaluated by agarose gel electrophoresis and spectrophotometry. The resulting amplicon was purified using a specific kit for PCR products. Material with acceptable parameters was obtained through the CTAB method, showing an intact high-molecular-weight band, concentration of 2144 ng/ μL , 260/280 ratio = 2.034, and 260/230 ratio = 2.191. After RNase A treatment, the results were 394 ng/ μL , 260/280 = 1.807, and 260/230 = 1.361. An amplicon between 750 bp and 1000 bp was obtained, consistent with lectins deposited in sequence databases.

Keywords: *Bauhinia pentandra*; conventional PCR; Gene; Lectin

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Representação esquemática de Célula vegetal, suas organelas e onde se compartmentalizam as lectinas clássicas (em vermelho) e as lectinas induzíveis (em amarelo)	15
Figura 2 –	Classificação de lectinas segundo sua estrutura molecular	16
Figura 3 –	Distribuição taxonômica e magnitude de domínios de lectinas de plantas na árvore da vida	17
Figura 4 –	Extração de DNA genômico. Etapas da esquerda para a direita: incubação com CTAB, seguido pela primeira e segunda purificação com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1, v/v).....	21
Figura 5 –	Representação esquemática de aplicações de lectinas em diferentes áreas....	24
Figura 6 –	Fotos de plantas do gênero <i>Bauhinia</i> . a) Folha bifoliolada de <i>Bauhinia forficata</i> Link. b) Folhas coriáceas de <i>Bauhinia coulteri</i> Macbride com porte arbóreo	25
Figura 7 –	Distribuição geográfica de <i>Bauhinia pentandra</i>	27
Figura 8 –	<i>Bauhinia pentandra</i> (Bong.) D.Dietr. a) Folha unifoliada, bilobada; b) Fruto plurisseminado; c) Fruto plano, linear; d) Estames heterodínamos, anteras rimosas; e) Flor. Pétalas brancas, estreito-oblongo	28
Figura 9 –	Imagen capturada em transiluminador UV. Eletroforese em gel de agarose: a) Antes do uso de RNase A. b) Após o uso de RNase A	35
Figura 10 –	Figura 10 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR convencional. Amplificado na condição 1 (56 °C, 5 ng) entre 750 e 1000 pb, respectivamente, seta azul e seta verde. Imagen capturada por fotodocumentador. Numeração em azul de acordo com as condições da PCR convencional	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Análise comparativa entre lectinas clássicas e lectinas induzíveis.....	18
Tabela 2 –	Aplicações de lectinas de diferentes espécies de <i>Bauhinia</i>	26
Tabela 3 –	Protocolo básico de amplificação (composição)	33
Tabela 4 –	Protocolo básico de amplificação (programação do termociclador)	33
Tabela 5 –	Temperatura no range 56-62 °C, feito pelo software do termociclador	33
Tabela 6 –	Relacionando DNaG (em ng) e temperatura (em °C) e nomeando as condições de 1 a 9 (condições abreviadas em C#, onde # = 1-9)	33
Tabela 7 –	Quantificação e parâmetros de pureza de <i>B. pentandra</i> obtidos por espectrofotometria, antes e após o tratamento com RNase A.....	34

"The most exciting phrase to hear in science,
the one that heralds new discoveries, is not
'Eureka!' but 'That's funny...'"

- Isaac Asimov

AGRADECIMENTOS

À minha mãe e ao meu pai, que sempre acreditaram no meu potencial, oferecendo apoio incondicional, nutriram em mim a curiosidade, o amor ao próximo e à natureza. Sem eles, eu não chegaria onde hoje estou. Aos meus irmãos, Stephânia e Alex, por me oferecerem apoio e momentos de descontração. Aos meus sobrinhos, João e Iago, que me trouxeram novas perspectivas e amadurecimento ao vê-los crescer.

Às forças responsáveis pela união de tantos eventos improváveis que, em conjunto, me ofereceram oportunidades únicas na vida.

À Prof.^a Dra. Kyria, que, dentre todos os docentes, foi a que teve mais impacto em minha carreira acadêmica, onde, em suas aulas, não havia dúvidas bobas; sempre oferecia espaço para tirar dúvidas, não importando o quão mirabolantes eram minhas ideias. Que viu em mim potencial e me deu a oportunidade de participar do grupo BioMol-Lab, e sempre me orientou com paciência e gentileza, proporcionando um ambiente onde me senti livre para questionar e aprender. Ao Prof. Dr. Benildo, que igualmente me permitiu participar do grupo BioMol-Lab e sempre dividiu suas experiências conosco, seja através de seu vasto conhecimento acadêmico ou por suas lições de vida. Foi no BioMol-Lab onde tive um intenso amadurecimento e ganho de conhecimento, que levarei para minha vida.

Aos pós-docs do BioMol-Lab, Dr. Messias e Dr. Vanir, e à doutoranda M.^a Valéria, pela amizade, paciência e mentoria que tornaram meu aprendizado muito mais rico, tanto no âmbito acadêmico quanto na vida pessoal, os quais geraram memórias que não esquecerei. Ao pós-doc Dr. Vinícius Osterne, o qual contribuiu para minha formação acadêmica; apesar de ter tido contato por pouco tempo, pude presenciar sua excelência e cordialidade.

Ao Neto, técnico do BioMol-Lab, que prontamente resolia os desafios do cotidiano nas tarefas do dia a dia. Aos demais colegas do BioMol-Lab, doutoranda M.^a Jardna, mestrandona Luana, mestrando José Carlos, companheiros ICs, Vanderson, Clara, Ana Beatriz e Maria Eduarda, que contribuíram para o meu crescimento e tornaram os dias mais fáceis. À doutoranda M.^a Sarah, que sempre organizou os seminários e facilitou atividades no laboratório. Aos ex-alunos do BioMol-Lab: Dr. William, M.^a Rebeca, Vinícius e Paula, que me acolheram inicialmente no laboratório.

À Prof.^a Dra. Dani, coordenadora do curso de Biotecnologia, sempre solícita, que me deu todo o suporte nos desafios que encontrei na finalização desse percurso, considerando a urgência do meu caso.

À Prof.^a Dra. Cristina, que notou meu crescimento acadêmico e contribuiu com conhecimento na área de cultura de tecidos, o qual foi determinante em uma conquista que mudará minha vida.

Aos meus amigos, Matheus, Eduardo e Primo, pelos momentos de descontração, por tornarem os momentos desafiadores em risadas e me alinharem com as coisas que realmente importam. Também a todos os amigos que estiveram em minha vida ao longo dos anos.

Aos meus colegas que contribuíram de forma significativa para meus anseios: Gabriel, Carol, Paulo, Rennó, Roberto, Karol e Nico.

À minha companheira, Marcela, que, nesses últimos meses, tornou-se uma pessoa muito especial, que trouxe à minha vida uma tranquilidade e equilíbrio que nem eu mesmo sabia que precisava.

Aos colegas de graduação após 2022: Júlia, que me ofereceu oportunidades, amizade, risadas e conselhos; Pierre, pelas conversas com temáticas que me levaram a reflexões e crescimento pessoal; Elayne, pelas conversas, auxílio nos estudos e disciplinas; e, por fim, Lewi, que me ofereceu suporte de forma inusitada. E aos demais colegas com quem tive contato, com quem trabalhei em seminários e projetos ou com quem sentei para trocar ideias ao acaso.

Aos meus amigos do início da graduação em 2016, dos quais sempre guardarei com muito carinho as memórias criadas: Igor Studart, Luisa de Vasconcelos, Marcela Torres, Andrielly Henriques, Guilherme Veloso, Camila Andrade, Thaís de Oliveira e Igor (da Física).

À instituição de ensino e pesquisa, Universidade Federal do Ceará (UFC), e aos financiadores de pesquisa, Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento (FUNCAP) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela oportunidade de ter grande aprendizado acadêmico, profissional e científico.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo Geral:	14
2.2 Objetivos Específicos:.....	14
3 REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1 Definições.....	15
3.2 Espectrofotometria	18
3.3 Métodos de extração de DNA genômico a partir de tecidos de plantas.....	18
3.4 Breve história da lectinologia	21
3.5 Contextualizando biologia molecular na lectinologia.....	22
3.6 Lectinas de Leguminosae	24
3.7 <i>Bauhinia</i>, gênero, lectinas e genes	25
3.8 <i>Bauhinia pentandra</i>, espécie e lectina.....	27
4 MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1 Reagentes	30
4.2 Material Biológico	30
4.3 Lise celular	30
4.4 Extração do DNA genômico.....	30
4.5 Tratamento enzimático com RNase A.....	31
4.6 Quantificação por espectrofotometria	31
4.7 Eletroforese em gel de agarose	31
4.8 Desenho dos oligonucleotídeos sintéticos (Primers)	32
4.9 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) convencional	32
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1 Extração de DNA pelo método do CTAB e tratamento com RNase A	34

5.2 PCR convencional	35
6 CONCLUSÕES	37
REFERÊNCIAS.....	38

1 INTRODUÇÃO

Lectinas são proteínas que possuem ao menos um domínio que se ligam reversivelmente a carboidratos sem alterá-los, estão presentes em todos os táxons, sendo então responsáveis por uma infinidade de funções. Graças as suas diversas capacidades de interações biológicas, possuem grande relevância para a biotecnologia, desde suas possíveis atividades biológicas até ferramentas de investigação como triagem de perfis de carboidratos.

As lectinas mais bem exploradas são às pertencentes à família Fabaceae, à qual inclui o gênero *Bauhinia*, em razão da alta abundância dessas proteínas em suas sementes, que possibilitou elevado rendimento em suas purificações e, consequentemente, facilitou o processo de caracterização, ao mesmo tempo em que novas técnicas para o isolamento dessas proteínas eram desenvolvidas.

As plantas conhecidas como “pata-de-vaca”, pertencentes ao gênero *Bauhinia*, possuem mais de 300 espécies identificadas em zonas tropicais sazonalmente secas. São utilizadas na cultura popular (centro e sul-americana) como fitoterápicos, sendo seu uso feito, principalmente, devido a sua ação hipoglicemiante, mas também é recomendada como agente antimicrobiano, anti-inflamatório, antifúngico, diurético e antioxidante. O que desperta o interesse tanto da pesquisa de base quanto da pesquisa aplicada devido aos seus potenciais biotecnológicos.

Na abordagem clássica do estudo de proteínas, é necessário primeiro obter a proteína de interesse para, em seguida, estudá-la. A química de proteínas oferece uma série de estratégias para purificar e isolar proteínas. No entanto, estabelecer protocolo de purificação costuma demandar tempo considerável, seja pela presença de moléculas que interferem em seu isolamento ou seja por sua baixa abundância. Assim, a biologia molecular surge como uma ferramenta complementar ou alternativa à química de proteínas, permitindo a obtenção de sequências gênicas que codificam proteínas de interesse, consequentemente, oferecendo tanto validação de sequências obtidas a partir de proteínas quanto uma maior riqueza de informações envolvendo a síntese e as modificações que ocorrem na proteína.

O presente trabalho teve como objetivo isolar o DNA genômico (DNAg) a partir de folhas de *B. pentandra*, com a finalidade de obter DNAg com parâmetros aceitáveis de pureza que permitam a amplificação de gene de lectina por meio de PCR convencional.

O método estabelecido por Doyle & Doyle (1987) para a extração de DNA genômico é conhecido por oferecer o isolamento de DNA genômico de forma rápida, econômica e de relativo alto rendimento, considerando a baixa quantidade de material biológico necessário.

Apesar da utilidade do método do CTAB para extração de DNA, é comum que algumas espécies exijam adaptações no protocolo de extração. Isso pode ocorrer devido a presença de polissacarídeos e metabólitos secundários na planta, como também pode ser devido a sua própria parede celular, caso a lise celular seja insuficiente.

O método de CTAB, na literatura, foi adaptado diversas vezes por pesquisadores diferentes, essas modificações foram feitas em todas as etapas do processo de extração, sendo então necessário validar as possíveis adaptações ao método de acordo com a necessidade da amostra com que se trabalha.

Apesar das limitações do método, onde ocorre a coprecipitação de compostos fenólicos e polissacarídeos que impactam negativamente nas aplicações posteriores como sequenciamento, amplificação de genes, dentre outros; O método do CTAB ainda é a técnica mais aplicada na extração de DNA genômico (possuindo mais de 26500 citações no Google Acadêmico, verificado em 26 de julho de 2025), sendo então a melhor candidata como técnica de extração de DNA a partir de folhas em uma nova espécie de interesse.

A obtenção da sequência de um gene que codifica lectina em uma planta possibilita diversas abordagens, como a elaboração de árvores filogenéticas, a anotação genética, a detecção de polimorfismos, além do desenvolvimento de novos experimentos em biologia molecular, incluindo edição gênica, estudos de expressão gênica e novos primers. Análises de bioinformática estrutural possuem maior relevância para as lectinas do gênero *Bauhinia* uma vez que existe apenas uma proteína com estrutura, obtida a partir de dados experimentais, depositada no RCSB PDB (RCSB Protein Data Bank, verificado em 13 de outubro de 2025), sendo assim, poderá contribuir para os estudos futuros envolvendo sua estrutura, como análise de funcionalidade, modelagem, docking. A obtenção da sequência gênica dessas lectinas irá, então, abrir o caminho para novos estudos, seja permitindo novas abordagens ou direcionando as pesquisas, tornando-as mais eficiente.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

Amplificar gene de lectina a partir de folhas da espécie *Bauhinia pentandra* (Bong.) D.Dietr.

2.2 Objetivos Específicos:

1. Coletar folhas e imediatamente armazená-las à - 80 °C.
2. Macerar com pistilo e cadinho as folhas com o uso de nitrogênio líquido.
3. Extrair ácidos nucleicos através do método CTAB.
4. Degradar RNA com o uso de RNase A.
5. Verificar pureza e quantidade por espectrofotometria.
6. Verificar integridade e tamanho por eletroforese em gel de agarose.
7. Desenhar primers para PCR convencional.
8. Amplificar gene de lectina

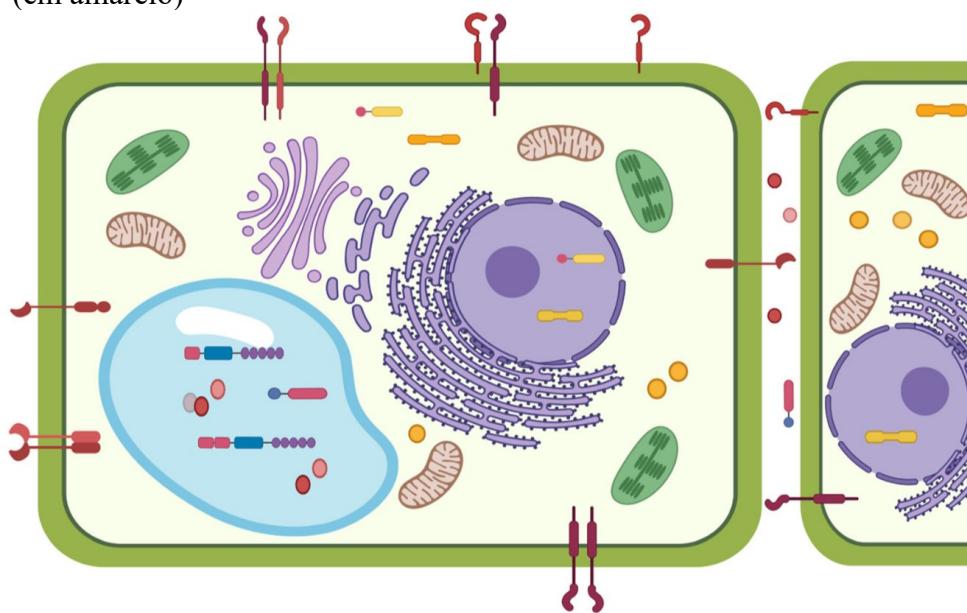
3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Definições

Segundo Tsaneva e Van Damme (2020) lectinas são uma denominação coletiva para uma família heterogênea de proteínas ligantes de carboidratos, que apresentam diferentes estruturas moleculares, propriedades bioquímicas e biofísicas e, consequentemente, provavelmente também desempenham funções biológicas diversas. Elas são classificadas com base nas seguintes características:

- (1) Quanto à localização subcelular: As lectinas clássicas são sintetizadas nos ribossomos do retículo endoplasmático, logo, elas podem ser transportadas ao vacúolo, às paredes celulares ou até ao meio extra celular. Já as lectinas induzíveis não possuem peptídeo sinal, são sintetizadas no citosol, onde permanecem, ou são translocadas para o núcleo (Figura 1).

Figura 1 – Representação esquemática de Célula vegetal, suas organelas e onde se compartmentalizam as lectinas clássicas (em vermelho) e as lectinas induzíveis (em amarelo)

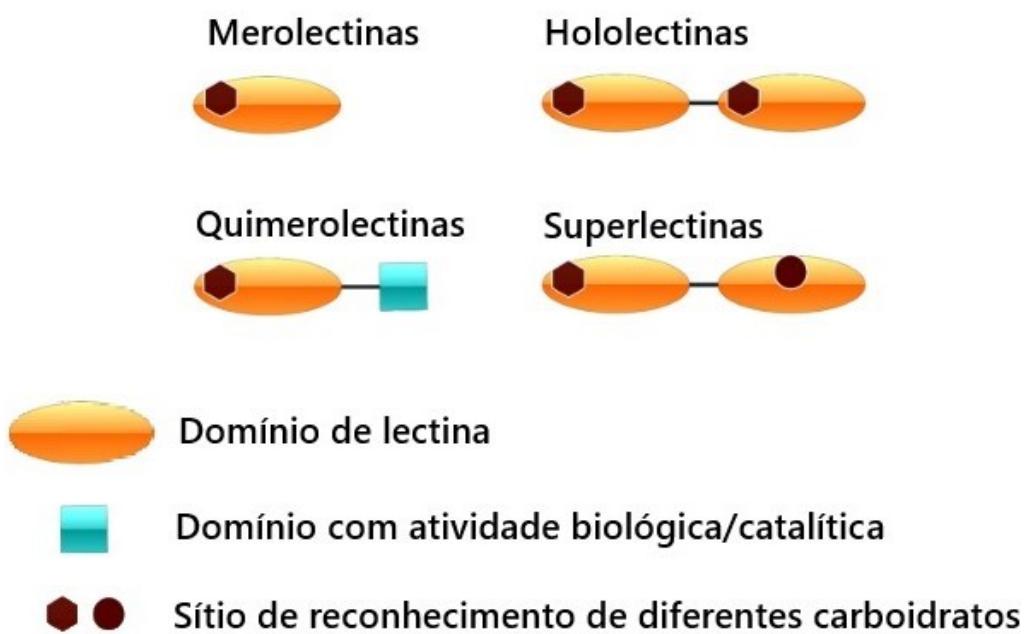


Fonte: Tsaneva, Van Damme, 2020.

- (2) Quanto à estrutura molecular: As lectinas de planta que possuem apenas 1 domínio são chamadas de merolectinas. Quando a lectina possui 2 ou mais domínios, são chamadas de hololectinas. Se essas possuírem diferentes especificidades, são

chamadas de superlectinas. Se possuírem um domínio que não seja lectina e que exerça atividade biológica ou catalítica, trata-se de uma quimerolectina. Representadas a seguir (Figura 2).

Figura 2 – Classificação de lectinas segundo sua estrutura molecular



Fonte: Tsaneva, Van Damme, 2020.

(3) Quanto à sequência: Através de análises de sequências de lectinas a partir de genômica e transcriptômica, pode-se perceber padrões de sequências que se repetem, os quais são chamados de motivos. As lectinas foram separadas em famílias de acordo com esses padrões esperados. Van Holle e Van Damme (2019) realizaram uma análise funcional utilizando a ferramenta InterPro 71.0 que pode classificar proteínas em famílias realizando predição de seus domínios (Figura 3), entre diversos táxons, incluindo outros que não fossem apenas plantas. Isso demonstra ambos a existência dos motivos e padrões como também a presença ubíqua das lectinas entre os seres vivos.

Figura 3 – Distribuição taxonômica e magnitude de domínios de lectinas de plantas na árvore da vida



	Agaricus bisporus agglutinin	Amaranthin	Cyanovirin	Euonymus europaeus agglutinin	Galanthus nivalis agglutinin	Hevein	Jacalin	Legume lectin	LysM	Nictaba	Malectin	Ricin B
Bacteria (8895)	197	1824	13	497	240	114	518	1	1857	21565		
Archaea (438)		28		5	3	115		42	128			
Amoebozoa (9)	2	38	53		6	44	1		121			
Fungi (597)	205	1604	343	4816	1092	1	6280	35		2891		
Metazoa (336)	2	144	136	383		2487	3	540	9394			
Archaeplastida (112)	17	273	43	69	15006	1983	2548	6925	3782	3431	11302	711
Alveolata (62)				12	23	3		57		36	516	
Stramenopiles (29)				20	29	649	14	96		2	659	
Rhizaria (2)				8	29	1	1	4	1	1	53	

Fonte: Van Holle, Van Damme, 2019.

(4) Quanto à abundância: As lectinas estão presente em todas as partes das plantas, apesar de que é encontrado menor presença de lectinas em flores, folhas, raízes e brotos (Peumans, Van Damme, 1995). As lectinas que são expressas com maior intensidade (de 0,1% até 10% das proteínas totais) se encontram em tecidos vegetativos ou em sementes, conhecidas como lectinas clássicas. As lectinas encontradas no citoplasma possuem baixa abundância quando não estão sob estresse, sendo, então, conhecidas como lectinas induzíveis. Quando expostas ao estresse, sua expressão é acentuada, dando origem ao seu nome (Lanno, Van Damme, 2010; Van Damme, 2014).

É possível notar correlações nas classificações das lectinas, como por exemplo a classificação de localização subcelular (Figura 1) já citada sendo relevante na classificação de abundância, sendo assim possível fazer uma análise comparativa nessa categoria (Tabela 1). Considerando a grande abundância das lectinas clássicas, elas foram as primeiras a serem descobertas, especialmente de sementes

de leguminosas (família Fabaceae), sendo então mais fáceis de serem purificadas. Já as lectinas induzíveis só foram descobertas na década de 1990 (Lanno, Van Damme, 2010; Van Damme, 2014).

Tabela 1 – Análise comparativa entre lectinas clássicas e lectinas induzíveis

	Lectinas clássicas	Lectinas induzíveis
Level de expressão	Alta, 0,1-10% de proteínas totais	Baixa, às vezes indetectável
Biossíntese	Ribossomos atrelados ao RE	Ribossomos livres no citoplasma
Localização subcelular	Vacúolo e espaço extracelular	Núcleo e/ou citoplasma
Localização em tecido	Sementes, cascas, bulbos, rizomas, cormos	Raiz, broto, folhas, flores
Expressão	Regulada pelo desenvolvimento	Regulada pelo estresse
Função	Proteínas de reserva, defesa de planta	Imunidade inata, transdução de sinal
Estrutura do carbono reconhecido	Estruturas de carbono exógena	Pouco explorada, provavelmente exógena e endógena

Fonte: Elaborado pelo autor, 2025. Adaptado a partir de Tsaneva, Van Damme, 2020.

3.2 Espectrofotometria

Os parâmetros de qualidade ideais para DNA é de razão 260/280 = 1,8 e de razão 260/230 de 2,0-2,2 (Matlock, 2015). Considerando que nucleosídeos e nucleotídeos são fortemente dependentes do pH, devido ao grau de ionização das bases em diferentes pH (Chirgwin et al., 1979). Deve-se considerar, então, uma variação nas leituras das razões 260/280 e razões 260/230, por causa de uma leve mudança no pico da leitura dos ácidos nucléicos, sendo de 0,2-0,3 a mais, para soluções mais básicas e de 0,2-0,3 a menos para soluções mais ácidas (Wilfinger, Mackey, Chomczynski, 1997). Altor teor de RNA na amostra também irá afetar a leitura, uma vez que uracilas possuem o seu pico mais alinhado com 260 nm do que timinas (Nelson, Cox, 2022), resultando, então, em maior coeficiente de extinção molar para RNA (em média).

3.3 Métodos de extração de DNA genômico a partir de tecidos de plantas

As características que são específicas de planta, como, por exemplo, a riqueza de metabólitos secundários encontrados nas mais diversas espécies de plantas, a heterogeneidade das moléculas presentes, pigmentos, parede celular, etc., exigem consideração especial e habilidade durante o processo de isolamento (Varma, Padh, Srivastava, 2007).

Extrações de DNA que deixam a desejar são causadas pelas mesmas propriedades que permitem que uma planta sobreviva em seu habitat. Paredes celulares, por exemplo, são rígidas, proporcionando um suporte estrutural, mas prendendo o DNA dentro da célula e seus polissacarídeos são capazes de inibir aplicações a jusante, como PCR convencional e reações enzimáticas em geral (Do, Adams, 1991; Pandey et al., 1996; Varma et al., 2007). Deve-se considerar também que os metabólitos secundários liberados após a lise celular, que protegem as plantas de estresses abióticos (Pratyusha, 2022), servirão como empecilho no processo de isolamento do DNA, sendo os piores deles: polissacarídeos e compostos fenólicos que coprecipitam com o DNA (Scott and Playford, 1996; Sharma et al., 2002).

Considerando os vários fatores que influenciam nos desafios de isolamento de DNA a partir de tecidos de planta, deve ser selecionado aquilo que funcionar. Os pesquisadores costumam realizar uma triagem com os 3 métodos mais conhecidos: Murray & Thompson (1980); Doyle & Doyle (1987) e Rogers & Bendich (1988), onde, dessa forma, o protocolo escolhido deve ser adaptado com o objetivo de melhorar os parâmetros de qualidade do DNA obtido (Varma et al., 2007).

Sobre a coleta, as folhas jovens são as favoritas quando o foco é maior rendimento e pureza de DNA, uma vez que possuem melhor rendimento quando comparadas a caules, raízes, frutas e folhas maduradas (Jobes et al., 1995; Japelaghi et al., 2011; Abubakar et al., 2018). Ademais, deve-se evitar folhas que sofreram estresse, como herbivoria, pois, em resposta ao estresse biótico (seja ele qualquer tipo de estresse), terão alta quantidade de metabólitos secundários devido aos seus mecanismos de defesa (Usha Rani, Jyothsna, 2010) que poderão prejudicar o processo de isolamento do DNA, assim como aplicações posteriores.

A etapa de lise tem como função romper as barreiras celulares e liberar o material genético. O processo inicia-se com a maceração do tecido vegetal, geralmente realizada sob nitrogênio líquido para evitar a degradação do DNA por ação de nucleases ou compostos fenólicos (Lodhi et al., 1994; Kasem et al., 2008). A Trituração pode ser feita em cadiño e pistilo ou com o auxílio de esferas mecânicas magnéticas (Hale et al.,

2020). Em seguida, o material é incubado em tampão de lise, cuja composição típica inclui CTAB, Tris, NaCl, EDTA e β -mercaptoetanol, como descrito em Doyle & Doyle (1987). O CTAB atua rompendo as membranas e complexando polissacarídeos, enquanto o EDTA inativa as nucleases ao quelar íons divalentes. A incubação costuma ocorrer a cerca de 60 °C por aproximadamente uma hora, permitindo a completa desestruturação celular e a liberação do DNA para o meio (Schenk et al., 2023).

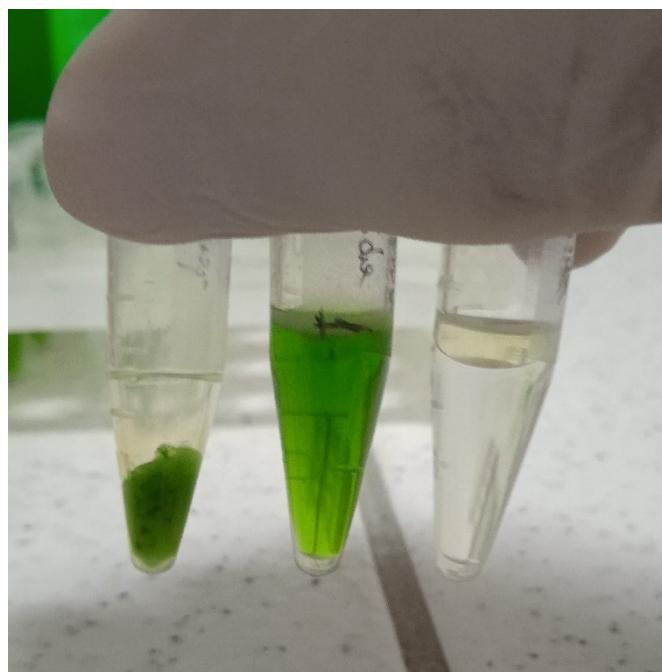
Na etapa de isolamento, busca-se separar o DNA das demais moléculas presentes no lisado, como proteínas, lipídios e resíduos celulares. Essa separação é obtida com a adição da mistura orgânica clorofórmio:álcool isoamílico (24:1, v/v), que promove a formação de duas fases após centrifugação: a fase aquosa, contendo DNA e RNA, e a fase orgânica, onde permanecem proteínas e outros componentes indesejáveis (Schenk et al., 2023). A fase superior é cuidadosamente transferida para um novo tubo, evitando o contato com a interface entre as duas camadas, que contém impurezas. Quando o sobrenadante apresenta coloração opaca, o procedimento pode ser repetido para melhorar a pureza da amostra. A etapa de isolamento é repetida caso a fase aquosa não esteja translúcida ou ao menos clara (Porebski et al., 1997; Aboul-Maaty, Oraby, 2019).

A etapa de limpeza tem como objetivo eliminar traços de CTAB, sais e outros contaminantes. O DNA é precipitado com etanol ou isopropanol, geralmente resfriados, podendo ser adicionados sais como acetato de sódio ou cloreto de sódio para favorecer a precipitação (Schenk et al., 2023). Após centrifugação, forma-se um pellet de DNA, que é lavado uma ou duas vezes com etanol a 70–80% (Maguire et al., 1994; Štorchová et al., 2000), assegurando a remoção de resíduos de detergentes e sais. O pellet é então seco à temperatura ambiente ou sob leve aquecimento, garantindo a completa evaporação do álcool, que poderia interferir em reações enzimáticas posteriores, como a PCR. A remoção de etanol é de extrema importância, uma vez que pode inibir reações de PCR (Demeke, Jenkins, 2010).

Na etapa final, de eluição, o DNA seco é ressuspensos em água livre de nucleases (Moreira, Oliveira, 2011) ou em tampão TE (Tris-EDTA), o qual mantém o pH estável e previne degradações (Schenk et al., 2023). O volume de eluição varia conforme o rendimento desejado, mas normalmente situa-se entre 50 μ L e 100 μ L (Schenk et al., 2023). Em alguns protocolos, recomenda-se um aquecimento leve (50–60 °C) por 5-120 minutos para facilitar a dissolução do DNA (Rogers, Bendich, 1985; Aboul-Maaty, Oraby, 2019). O produto obtido ao final do processo corresponde ao DNA purificado, adequado

para análises de integridade, quantificação e amplificações subsequentes. Figura 4 a seguir ilustra partes da extração.

Figura 4 – Extração de DNA genômico. Etapas da esquerda para a direita: incubação com CTAB, seguido pela primeira e segunda purificação com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1, v/v)



Fonte: Elaborado pelo autor, 2025.

3.4 Breve história da lectinologia

O estudo das lectinas vegetais começou com Peter Hermann Stillmark que descreveu a ricina em 1888, que foi uma proteína extraída das sementes de *Ricinus communis*. Essa proteína chamou atenção por apresentar atividade hemaglutinante, o que acabou dando origem ao campo de pesquisa que hoje chamamos de lectinologia (Tsaneva, Van Damme, 2020)

Em 1919, Sumner conseguiu purificar a Concanavalina A (*ConA*) a partir de sementes de *Canavalia ensiformis*, observando sua capacidade de aglutinar células e interagir com polissacarídeos como glicogênio e dextrans (Sharon, Lis, 2004). Em 1960, Peter G. Nowell descobriu que lectinas (fitohemaglutininas como conhecidas na época) de *Phaseolus vulgaris* era capaz de induzir divisão celular em linfócitos, o que aumentou a visibilidade da lectinologia (Sharon, Lis, 2007).

Antes de 1954, essas proteínas eram conhecidas como hemaglutininas ou fitohemaglutininas, então, Boyd e Shapleigh sugeriram o nome “Lectina”, que em latim, significa “Selecionar”, a inspiração estaria em sua capacidade de selecionar especificamente carboidratos (Sharon, Lis, 2004). Em 1980, Goldstein descreveu essas moléculas como proteínas não imunológicas capazes de aglutinar células ou precipitar glicoconjungados. Então, em 1995, Peumans e Van Damme apresentaram uma definição mais precisa: lectinas são proteínas que possuem ao menos um domínio não catalítico capaz de se ligar, de forma reversível, a mono ou oligossacarídeos, sem alterar a estrutura covalente do ligante. Por fim, em 2020, Tsaneva e Van Damme cunharam a definição mais aceita atualmente para lectinas, descrita no início desta seção.

Com o avanço das técnicas laboratoriais, a pesquisa sobre lectinas se tornou muito mais detalhada. Métodos modernos como cromatografia de afinidade (Agrawal e Goldstein, 1965), expressão heteróloga (Vodkin, 1983), sequenciamento genômico e ferramentas de bioinformática passaram a ser empregados para compreender a diversidade estrutural e funcional dessas proteínas. Hoje, além da estrutura e da especificidade por carboidratos, investiga-se também a regulação, a localização celular e o papel fisiológico das lectinas, inclusive sob condições de estresse e em diferentes estágios do desenvolvimento vegetal (Tsaneva, Van Damme, 2020).

3.5 Contextualizando biologia molecular na lectinologia

A caracterização de lectinas de planta usualmente seguiu as técnicas tradicionais como: atividade hemaglutinante, ensaio de inibição com açucares e cromatografia de afinidade (Nascimento et al., 2012), o que acabou deixando de lado isoformas menos expressas ou induzíveis, que hoje se mostram igualmente relevantes (Tsaneva, Van Damme, 2020). O que ocorre é que, hoje, técnicas como atividade hemaglutinante (técnicas tradicionais) são insuficientes, devido às limitações em sensibilidade e especificidade, o que dificulta descobertas de lectinas de baixa abundância ou de baixa capacidade de interação (Osterne et al., 2025), como saponinas que são capazes de lisar as hemácias do ensaio de atividade hemaglutinante, ou mesmo lectinas que são compostas apenas de 1 domínio (merolectinas) que não são capazes de promover hemaglutinação.

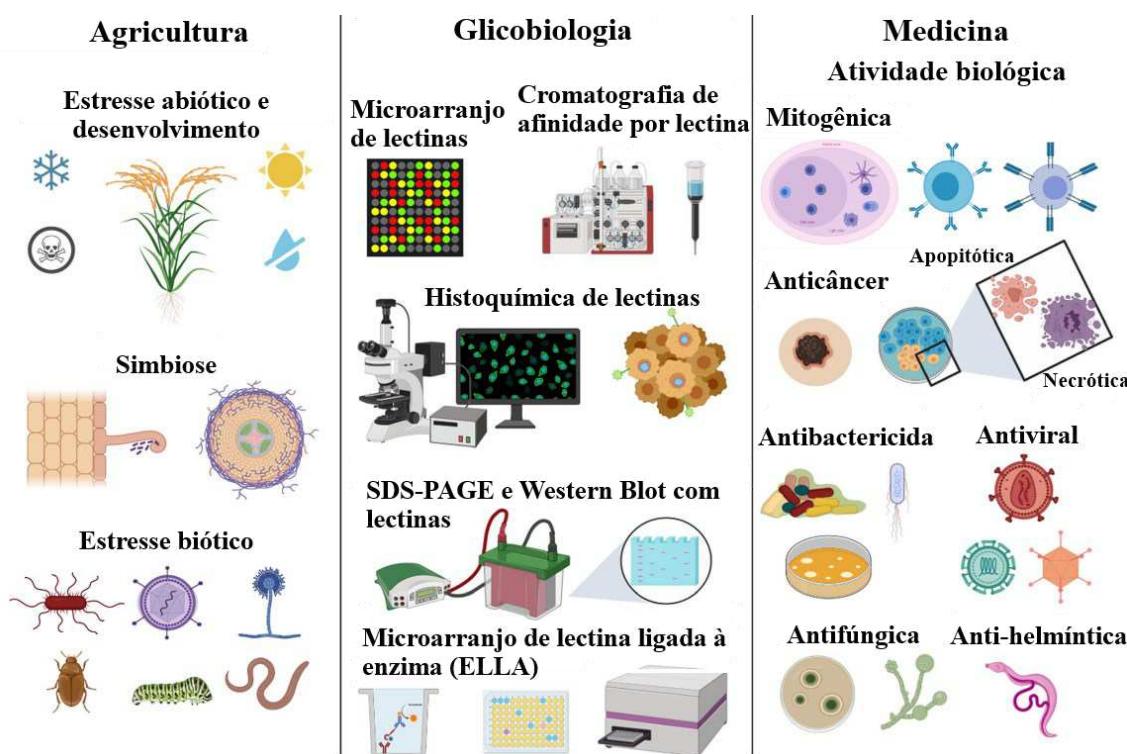
Sendo assim, por um longo período de tempo, a maior parte da pesquisa com lectinas tinha como alvo a caracterização bioquímica e funcional de plantas de lectina,

enquanto a sua relevância na colonização da terra por plantas e na evolução de angiospermas foi negligenciada (Van Holle, Van Damme, 2019), tópicos esses que poderão beneficiar tanto a pesquisa aplicada quanto a pesquisa de base. É de grande interesse buscar novas tecnologias que permitam explorar as lectinas sem as limitações usuais dos métodos clássicos.

O isolamento de gene de lectinas e o seu sequenciamento, permitem que cada vez mais os bancos de dados tenham mais informações que poderão ser correlacionadas entre si, fortalecendo, por exemplo, as abordagens genômicas e transcriptômicas que têm se mostrado particularmente vantajosas, principalmente pela eficiência que oferecem. O uso de ferramentas de bioinformática agiliza bastante o processo de descoberta de novas lectinas, permitindo rastrear rapidamente grandes bancos de dados genéticos de diferentes espécies vegetais. Dessa forma, torna-se possível identificar genes de interesse com base na conservação de domínios e na similaridade de sequência, o que facilita a construção de catálogos amplos de lectinas e até mesmo algumas previsões iniciais sobre suas possíveis estruturas e funções. Por outro lado, vale lembrar que essas estratégias têm suas limitações. Elas se baseiam, essencialmente, em previsões derivadas de sequência, o que faz com que algumas características importantes acabem passando despercebidas, como modificações pós-traducionais, alterações conformacionais e, principalmente, as interações específicas com glicanos, que são cruciais para a função biológica das lectinas. Outro ponto é que nem sempre a presença de um domínio de lectina em uma sequência garante que aquela proteína seja de fato funcional (Osterne et al., 2025).

Desta forma, a biologia molecular veio para complementar a abordagem clássica de química de proteínas, como também dar suporte para novas abordagens in silico. Figura 5 mostra aplicações relevantes em diferentes áreas que serão cada vez mais beneficiadas com o desenvolvimento dessas abordagens in silico como modelagem computacional, abordagens ômicas e machine learning.

Figura 5 – Representação esquemática de aplicações de lectinas em diferentes áreas



Fonte: Elaborado pelo autor, 2025. Adaptado a partir de Tsaneva, Van Damme, 2020.

Os avanços nas últimas décadas na biologia molecular e na biotecnologia permitiram o sequenciamento de genomas de uma infinidade de espécies, expandindo, assim, os dados de proteômica e genômica disponíveis em repositórios públicos (. Há mais de 50000 genomas de eucariotos, vírus, plasmídeos e organelas depositadas no NCBI genome database (Silva, Gonçalves, Lopes, 2020). Essa grande quantidade de informação disponível levou à melhoria de ferramentas de bioinformática, que são úteis para caracterizar proteínas e suas isoformas presentes em uma célula específica ou tecido, como também permite predizer suas funções, fornecendo informações cruciais para estudos futuros, seja *in vivo* ou *in vitro* (Sivashankari, 2006; Mallick, 2010; Srinivasa, 2020).

3.6 Lectinas de Leguminosae

Lectinas pertencentes à família Leguminosae são as que mais possuem diversidade de especificidades comparadas aos outros grupos de lectinas. A maioria das lectinas de leguminosas são constituídas por protômeros de 25-30 kDa, entre 220 e 250 aminoácidos e formados por uma ou mais cadeia de polipeptídeos. Também podem ser

N-glicosiladas, contendo uma ou duas cadeias de glicanos. A maioria dessas lectinas são metaloproteínas (salvo exceções incomuns), os protômeros contém um sítio de ligação a metal fortemente ligada à íons cálcio e à manganês responsáveis por manter o sítio de ligação à carboidrato (Cavada et al., 2020).

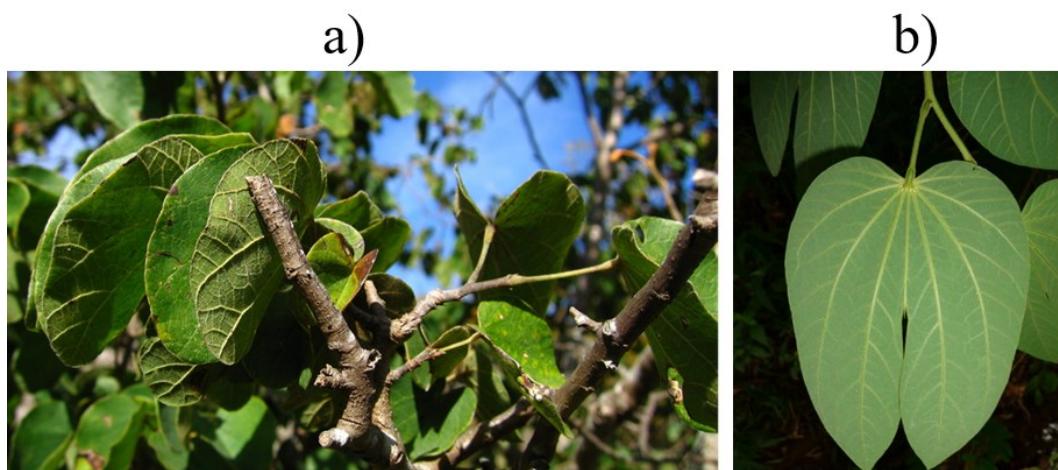
Devido a abundância de lectinas em suas sementes, são a família mais bem exploradas quanto ao isolamento e à caracterização de suas lectinas, onde podem compor de 0.1-10% de proteínas totais (Tsaneva, Van Damme, 2020), tendo ultrapassado mais de 600 espécies onde foram detectado atividade de lectinas, onde muitas também foram aplicadas em atividades biológicas e aplicações biotecnológicas (Lock, 2005; Gautam et al., 2018, Cavada et al., 2020; Tsaneva, Van Damme, 2020; Nascimento et al., 2020).

Essas lectinas podem formar dímeros e/ou tetrâmeros que se ligam especificamente a resíduos de glicose, fucose, galactose e manose e seus derivados (Loris et al., 1998).

3.7 *Bauhinia*, gênero, lectinas e genes

As plantas desse gênero possuem porte arbóreo, arbustivo ou escandente (trepadeiras); folhas geralmente coriáceas (duras e rígidas como um couro), bifolioladas, isto é, apresentam dois folíolos, frequentemente unidos, então denominada folha bifoliolada geminada (Souza et al., 2013). Conforme Figura 6 a seguir.

Figura 6 – Fotos de plantas do gênero *Bauhinia*. a) Folha bifoliolada de *Bauhinia forficata* Link. b) Folhas coriáceas de *Bauhinia coulteri* Macbride com porte arbóreo



Fonte: a) María Eugenia Mendiola González; b) Daniel Grasel

Pertencente à família Leguminosae, a subfamília Cercidoideae, o gênero *Bauhinia* é conhecida popularmente como pata-de-vaca contando com mais de 300 espécies, sendo 200 ao menos encontrada no Brasil (Az, Tozzi, 2005; Domingos, Capellari, 2016). O gênero está presente em todo o Brasil, com algumas espécies de concentrado em regiões específicas (Vaz, 2025), entretanto, as espécies deste gênero se distribuem bem em todas as regiões tropicais, em sua maioria na África, Ásia e América do Sul, e fazem parte da medicina popular nessas regiões (Filho, 2009). Extratos obtidos a partir de sua casca e de suas folhas são utilizados para vários sintomas e doenças, como diabetes, inflamação, infecções e dor (Negi, Sharma, Singh, 2012). Apesar de a maioria dos efeitos benéficos não são oriundos de lectinas, mas sim de metabólitos secundários como esteroides, ácidos aromáticos, terpenos, alcaloides, lactonas e quinonas (Singh, Singh, Singh, 2016); foi relatado que a sua atividade anticâncer, que é de extrema relevância para aplicações na medicina, ocorre devido a presença de lectina (Pandey, Agrawal, 2009). Dentre outras possíveis aplicações na tabela 2. É importante notar que que lectinas de *B. rufa* e de *B. bauhinioides* apresentaram baixa toxicidade em *A. salina* e em células humanas, demonstrando o seu potencial biotecnológico (Osterne et al., 2025).

Tabela 2 – Aplicações de lectinas de diferentes espécies de *Bauhinia*

Atividade biológica ou função	Espécie
Marcador celular	<i>B. purpurea</i>
Antibacteriana	<i>B. variegata</i>
Antifúngica	<i>B. ungulata</i>
Antiviral	<i>B. variegata</i> , <i>B. purpurea</i> e <i>B. monandra</i>
Inseticida	<i>B. monandra</i>
Antiproliferativa/anticâncer	<i>B. variegata</i> , <i>B. variegata</i> var. <i>variegata</i> , <i>B. forficata</i>
Inflamatória/nociceptiva	<i>B. monandra</i>
Anticoagulante	<i>B. forficata</i> (1)

Fonte: Cagliari, Kremer, Pinto, 2018

(1) Não depende de seu sítio de reconhecimento à carboidrato.

De um modo geral, as lectinas do gênero *Bauhinia* possuem especificidade à D-galactose, mas frequentemente também à D-glicose. Apesar de na maioria das leguminosas, os metais divalentes são requisitos para a manutenção do sítio de reconhecimento à carboidrato, nas espécies do gênero *Bauhinia* isso não é

necessariamente verdade, assim como glicosilações não estão sempre presentes em suas lectinas (Cagliari et al., 2018).

A primeira lectina explorada de *Bauhinia* pertenceu à *Bauhinia purpurea* em 1978 por Osawa et al. E até 2018 um total de 10 lectinas haviam sido isoladas a partir de 7 espécies diferentes de *Bauhinia* (Cagliari et al., 2018). Entretanto, em 2024, outras 2 foram isoladas, *B. holophylla* através de bioinformática (material genômico) e *B. catingae* através de técnicas clássicas de química de proteínas (Camargos, Lopes, Castro, 2024; Nascimento et al., 2024). Suas estruturas primárias foram largamente elucidadas, realizando BLAST, é possível observar alta conservação (80-89% de identidade) entre as lectinas do gênero, tornando-as ótimos alvos para amplificação seguida de sequenciamento. Já as estruturas secundárias obtidas a partir de dicroísmo circular de BFL BvvL, BPA e BUL não inspiram muita confiança, uma vez que apresentaram alta incidência de α -hélice, o que não é comum em leguminosas (Cagliari et al., 2018). Com a obtenção da estrutura terciária de BFL, foi possível afirmar que não há α -hélice em sua estrutura, logo, desvalidando, como esperado, os resultados prévios (Cagliari et al., 2018). Desta forma, são necessárias mais sequências de lectinas diferentes para modelar estruturas e buscar compreender melhor as lectinas do gênero *Bauhinia*.

3.8 *Bauhinia pentandra*, espécie e lectina

Figura 7 – Distribuição geográfica de *Bauhinia pentandra*

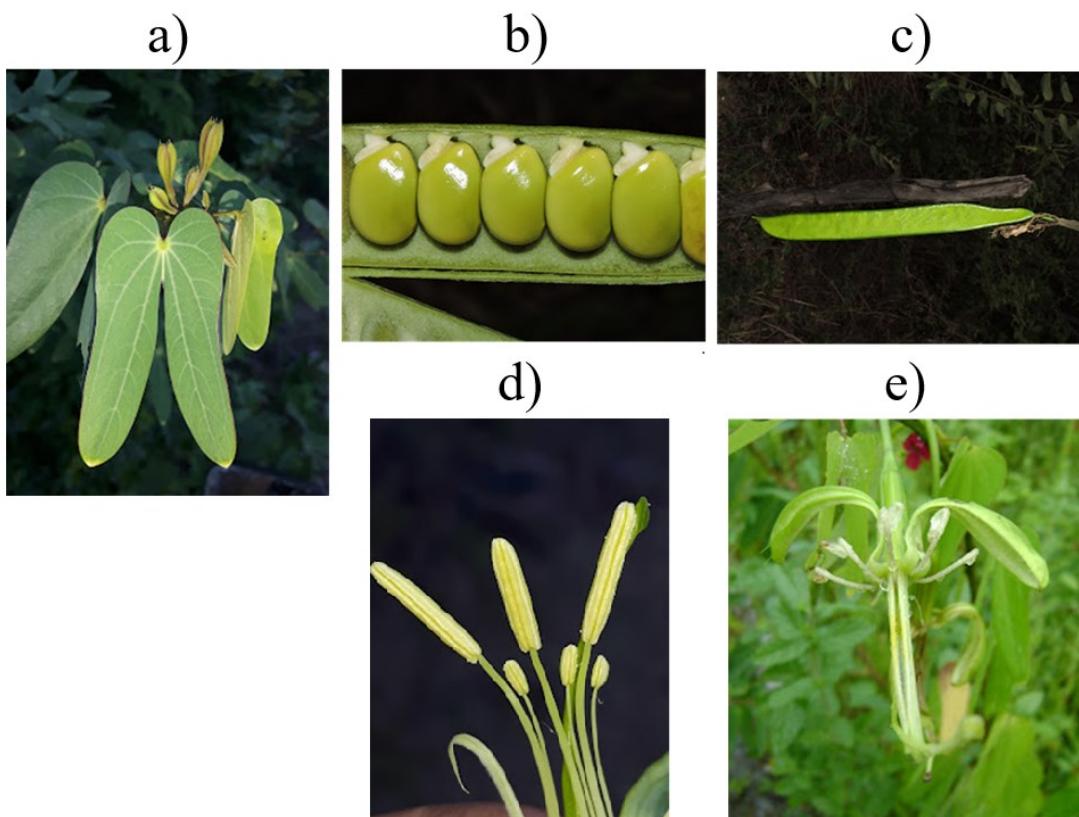


Fonte: Vaz, 2025.

A *Bauhinia pentandra* (Bong.) D.Dietr. é nativa do Brasil, concentrada nas regiões do Nordeste, Centro-Oeste (Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso) e Sudeste (Minas Gerais e São Paulo) e do Norte, apenas Tocantins; conforme a Figura 7.

Bauhinia pentandra (Figura 8) é uma árvore de pequeno porte, atingindo até 4 m de altura, escandente com ramos contendo acúleos rígidos em direção ao ápice, inflorescências parciais com pétalas lineares e com folhas bifoliadas. Seu legume apresenta contorno estreitamente oblongo, sem divisões internas, portanto sem câmaras que alojam as sementes as quais não possuem apêndice unciforme encobrindo o hilo, e sem linhas em leque. (Vaz, Tozzi, 2005; Crisóstomo, 2008).

Figura 8 – *Bauhinia pentandra* (Bong.) D.Dietr. a) Folha unifoliada, bilobada; b) Fruto plurisseminado; c) Fruto plano, linear; d) Estames heterodínamos, anteras rimosas; e) Flor. Pétalas brancas, estreito-oblongo



Fotos: Rubens Teixeira de Queiroz, Serrinha do Canto, Serrinha dos Pintos, Rio Grande do Norte (f. 1-2) Fortaleza, Ceará (f. 3-8), Brasil.

A lectina de *B. pentandra* foi isolada pela primeira vez em 2001 por Silva et al. e parcialmente caracterizada. A lectina possui afinidade a D-Galactose; requer metais divalentes para atingir atividade máxima; reteve metade de sua atividade original após 60

min em 70 °C; em SDS-PAGE foi observado apenas 1 banda de 30 kDa, o que está dentro do esperado para lectinas de leguminosas (Cavada et al., 2020).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes

Agarose, Ácido clorídrico, Ácido Etilenodiaminotetracético, Álcool isoamílico, Borato, Brometo de Cetiltrimetilamônio, Clorofórmio, Cloreto de Sódio, Etanol, Isopropanol, Polivinilpolipirrolidona (PVPP), Tris(hidroximetil)aminometano, β -mercaptoetanol. Nitrogênio líquido, RNase A de pâncreas bovino (Sigma-Aldrich, 10109142001), Corante de ácidos nucleicos GelRed® 10000X Água (Sigma-Aldrich, SCT123), Easy Taq DNA Polimerase (recombinante, 13-10500), Marcador de Peso molecular 1 Kb DNA Ladder LGC Biotecnologia (13-4004-01). Foi utilizado água ultrapura tipo 2 nas soluções. Com exceção do PVPP, todos os reagentes possuem grau de pureza analítica.

4.2 Material Biológico

Folhas de *Bauhinia pentandra* foram coletadas e armazenadas a - 80 °C com a finalidade de preservar a integridade do DNA, reduzir oxidação e atividade de nucleases.

4.3 Lise celular

As folhas foram higienizadas com água e com etanol 70%. Então, as folhas foram colocadas dentro do cadinho, onde o nitrogênio líquido foi despejado cuidadosamente com quantidade suficiente apenas para submergir as folhas, com o auxílio do pistilo, as folhas foram maceradas repetidamente até a obtenção de um material fino e homogêneo. Foi obtido 19,5 g de pó de folhas de *B. pentandra*.

4.4 Extração do DNA genômico

As etapas do protocolo de extração de DNA pelo método do CTAB foram adaptadas a partir de Doyle & Doyle 1987. Inicialmente, procedeu-se à maceração de folhas em nitrogênio líquido, visando à lise celular e à liberação do material genético. Em

seguida, o extrato foi incubado com tampão CTAB, o que promoveu a solubilização de membranas e a remoção parcial de polissacarídeos e compostos fenólicos.

A seguir, realizaram-se duas purificações consecutivas com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1, v/v), com o objetivo de eliminar proteínas, lipídios residuais e pigmentos. O DNA presente na fase aquosa foi transferido para novo tubo, onde então foi precipitado com isopropanol. O sobrenadante foi descartado e o pellet resultante lavado com etanol 70%, removendo sais e solventes (recuperação e purificação).

Após a secagem, o DNA foi ressuspenso em tampão TE (Tris-HCl 10mM, pH 8,0, EDTA 1 mM) e submetido ao tratamento com RNase A, para eliminação de RNA contaminante. A integridade, pureza e concentração do DNA foram verificadas por eletroforese em gel de agarose e espectrofotometria (razões 260/280, 260/230 e quantificação) e uma nova extração de DNA pelo método de CTAB foi realizada a partir da etapa de purificação com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1, v/v).

4.5 Tratamento enzimático com RNase A

O pool de ácidos nucleicos isolados na etapa de extração foi levado a um microtubo, onde foi adicionado 1 μ L de RNase A na concentração de 100 μ g/mL para cada 10 μ L de pool de ácidos nucleicos. O microtubo foi deixado no Termobloco a 37 °C por 1 hora, sob agitação de 300 RPM. Onde então foi repetido as etapas de isolamento de DNA genômico, a partir da etapa de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1).

4.6 Quantificação por espectrofotometria

Essa etapa foi realizada antes e após o tratamento com RNase A, como também após a PCR. As leituras de parâmetros de qualidade e de quantificação foram realizadas no equipamento GE Healthcare NanoVue Plus UV-Vis Spectrophotometer. A referência (0A) foi feita com água ultrapura tipo 2. Foi utilizado 1,25 μ L de amostra por leitura, sendo realizado limpeza rigorosa e cuidadosa na lente do equipamento entre as leituras.

4.7 Eletroforese em gel de agarose

Essa etapa foi realizada antes e após o tratamento com RNase A, como também após a PCR. O gel de agarose para extração foi feito com 0,5% (0,1 g de agarose para cada 20 mL) para o DNA (antes e após uso de RNase A) e com 1,5% para os amplificados obtidos a partir da PCR convencional. TBE 1x, GelRed 1x. A corrida de eletroforese ocorreu a 100 V. Tampão de corrida 0,5x TBE.

4.8 Desenho dos oligonucleotídeos sintéticos (Primers)

Foi feito a coleta das sequências de lectinas do gênero Bauhinia, como também espécies pertencentes a outros gêneros, como Griffonia, com o auxílio do blastn. As sequências foram coletadas do NCBI e alinhadas pela ferramenta Clustal Omega, as sequências que não possuam regiões conservadas nas regiões iniciais e finais foram descartadas.

Uma das sequências foi escolhida para realizar o desenho do primer através do Primer-BLAST, onde foram escolhidos os primers com parâmetros mais adequados. A temperatura de anelamento utilizada foi a que foi obtida na análise com IDT's OligoAnalyzer™.

4.9 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) convencional

A reação foi otimizada variando-se a temperatura e a concentração de gDNA inicial. Foram feitas reações com as temperaturas de 56, 59,2 e 62 °C e concentrações de DNA de 5, 25 e 75 ng.

Foi utilizado protocolo básico de amplificação (Tabela 3 e 4, disponibilizado pelo próprio fabricante: LGC Biotecnologia) da Easy Taq DNA Polimerase (Recombinante) Código N°: 13-10500, sendo modificado o volume de reação para 25 µL, a temperatura de anelamento foi definida através da ferramenta IDT's OligoAnalyzer™.

Tabela 3 – Protocolo básico de amplificação (composição)

Componentes	Volume	Concentração final
Tampão 10x (livre de MgCl ²)	2,5 µL	1x
dNTP mix (10mM)	0,5 µL	0,2 mM
MgCl ² (50mM)	0,75 µL	1,5 mM
Primer forward (10 µM)	1,25 µL	0,5 µM
Primer reverse (10 µM)	1,25 µL	0,5 µM
DNAg (1)	1 µL	5-75 ng
Água livre de RNase	17,5 µL	..
Easy-Taq polimerase (2)	0,25 µL	..

Fonte: Elaborado pelo autor, 2025.

- (1) A concentração do DNAg inicial dependerá da concentração final desejada.
 (2) Equivalente a 1,25 U.

Tabela 4 – Protocolo básico de amplificação (programação do termociclador)

	1 Temp	3 Temp – 35 Ciclos	2 Temp – 1 Ciclo	
Temp (°C)	94	94	56-62	72
Time (min:seg)	5:00	0:30	0:30	1:00

Fonte: Elaborado pelo autor, 2025.

O termociclador foi programado com as temperaturas dispostas na Tabela 4. A divisão da temperatura é feita pelo próprio software (Tabela 5). Devido a essa limitação não foi possível garantir um intervalo padronizado para as amostras. As amostras foram dispostas assim como é exemplificado na Tabela 6.

Tabela 5 – Temperatura no range 56-62 °C, feito pelo software do termociclador

ROW	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
°C	56	56,3	56,6	57,4	58,3	59,2	59,6	60,3	61	61,6	61,8	62

Fonte: Elaborado pelo autor, 2025.

Tabela 6 – Relacionando DNAg (em ng) e temperatura (em °C) e nomeando as condições de 1 a 9 (condições abreviadas em C#, onde # = 1-9)

	5ng	25ng	75ng
56 °C (ROW1)	C1	C4	C7
59,2 °C (ROW6)	C2	C5	C8
62 °C (ROW12)	C3	C6	C9

Fonte: Elaborado pelo autor, 2025.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Extração de DNAg pelo método do CTAB e tratamento com RNase A

O DNA genômico, ainda com RNA, obtido após ter sido isolado apresentou boa concentração ($3137 \text{ ng}/\mu\text{L}$) e boa pureza ($260/280 = 2,025$, $260/230 = 2,146$). Após o uso de RNase A para a remoção de RNA indesejado, foi obtido concentração ($620 \text{ ng}/\mu\text{L}$) e parâmetros de pureza ($260/280 = 1,826$, $260/230 = 1,503$) esperados diante do uso de RNase A e subsequente purificação necessária. Os resultados podem ser visualizados na Tabela 7. Foi possível observar DNA genômico integro antes e após o uso de RNase A (Figura 9). A queda no parâmetro $260/280$ é esperada, uma vez que o RNA foi removido; entretanto, a queda no parâmetro $260/230$ é multifatorial, podendo ser causada por resíduos de tampões, detergentes (CTAB e/ou SDS), etanol, isopropanol e sais.

Tabela 7 – Quantificação e parâmetros de pureza de *B. pentandra* obtidos por espectrofotometria, antes e após o tratamento com RNase A

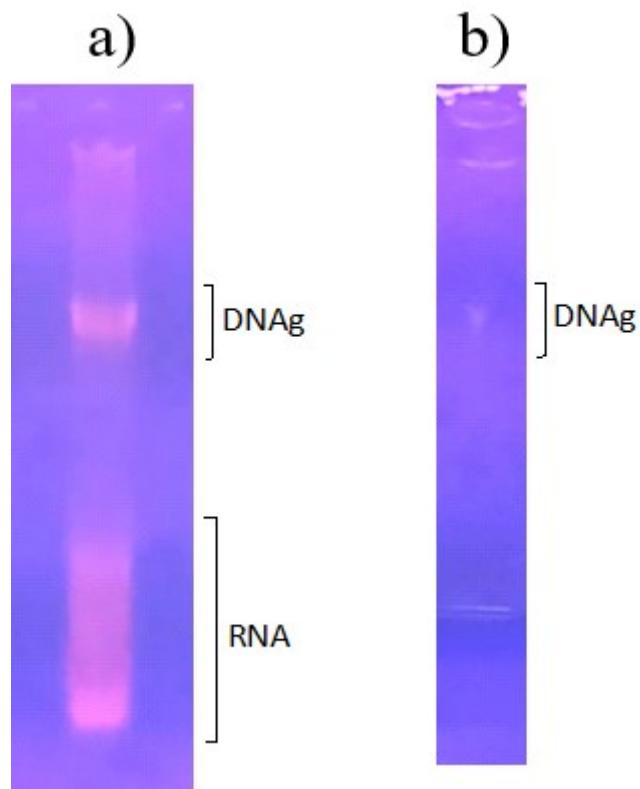
<i>B. pentandra</i>	Concentração (ng/μL)	260/280	260/230
Pré-RNase A	3137	2,025	2,146
Pós-RNase A	620	1,826	1,503

Fonte: Elaborado pelo autor, 2025.

Carmagos et al., 2024 conseguiu obter DNaG de *B. holophylla* na concentração de 1565,8 ng/ μL ; onde extraíram o DNA de plantas que cultivaram in vitro por 60 dias, como também utilizaram microesferas de vidro no processo de extração com CTAB 2%. Não foi detalhado qual protocolo foi utilizado. Os parâmetros de qualidade não foram disponibilizados no artigo.

Considerando que no presente trabalho, as folhas coletadas foram de árvores maduras que estavam em ambiente com possíveis estresses, é esperado que o rendimento e os parâmetros de qualidade sejam menos previsíveis.

Figura 9 – Imagem capturada em transiluminador UV. Eletroforese em gel de agarose: a) Antes do uso de RNase A. b) Após o uso de RNase A.



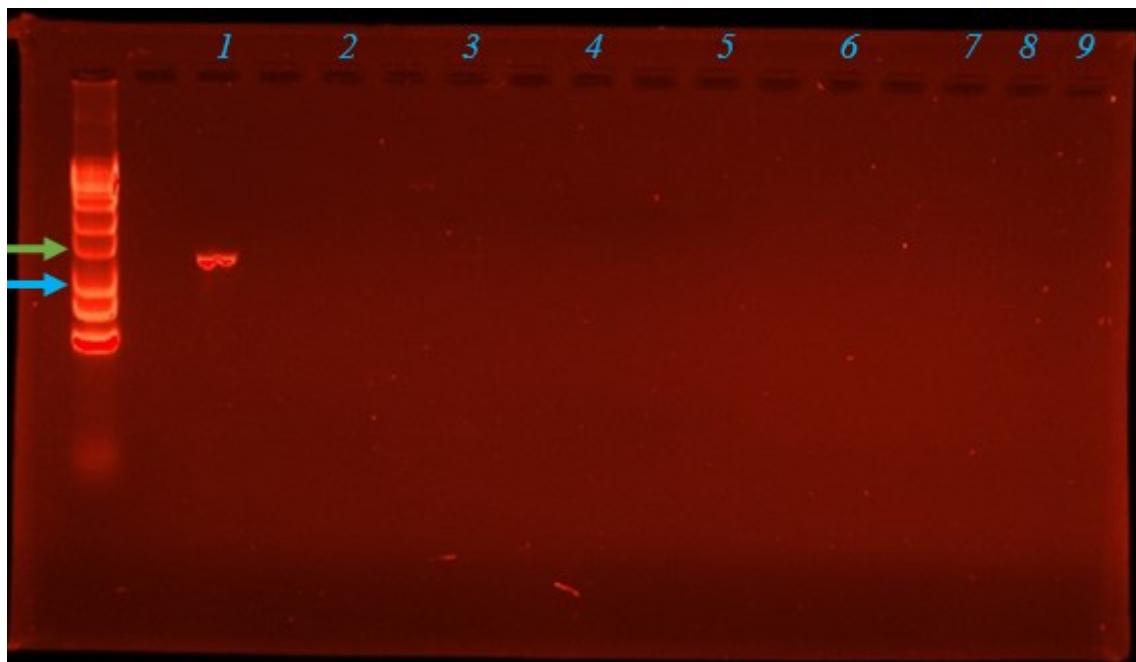
Fonte: Elaborada pelo autor, 2025.

5.2 PCR convencional

Foi observado amplificado apenas na condição 1 (Figura 10) com temperatura de 56 °C e concentração de DAg de 5 ng. Considerado o marcador utilizado, o amplicon deve ter entre 750-1000 pb. O que está dentro do padrão esperado, uma vez que a lectina de Bauhinia forficata (bfl), GenBank: KX027277.1 possui 873 pb. Feito BLASTN com a sequência de bfl; database core_nt e organismo Leguminosae (taxid: 3803) foi obtido 4 (não contando com a própria bfl, sendo então: KX907616.1, PP501329.1, EU596376.1 e EF558621.1) alinhamentos com query cover de 100% onde seus tamanhos variam de 867 a 882. E os que fogem do padrão: B. purpurea (D12481.1) possui 1122 pb e B. unguata (DQ372702.1).

O produto de PCR obtido foi quantificado por espectrofotometria, com 498,5 ng/µL, e os parâmetros de qualidade foram $260/230 = 1,698$, $260/280 = 2,53$. A. É necessário purificar e isolar o amplicon a partir do produto de PCR.

Figura 10 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR convencional. Amplificado na condição 1 (56 °C, 5 ng) entre 750 e 1000 pb, respectivamente, seta azul e seta verde. Imagem capturada por fotodocumentador. Numeração em azul de acordo com as condições da PCR convencional.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2025.

6 CONCLUSÕES

Nesse trabalho foi inicialmente realizado o isolamento de DNA genômico livre de RNA a partir de folhas de *Bauhinia pentandra*., com parâmetros aceitáveis para aplicações posteriores, constatando-se a validade do método de CTAB (adaptado a partir de Doyle & Doyle, 1987) para *B. pentandra*.

Os parâmetros de qualidade obtidos do amplicon C1 (56 °C, 5 ng) de gene de lectina de *B. pentandra* só poderão ser analisados após o uso de kits especializados na purificação e no isolamento de DNA.

Em trabalhos futuros, novas modificações poderão ser feitas ao protocolo, com a finalidade de melhorar o parâmetro de pureza 260/230 e 260/280, caso aplicações a jusante não ocorram como desejado.

Caso o sequenciamento seja possível após a purificação e o gene esteja incompleto, poderá ser feito RACE (Amplificação rápida de extremidades de cDNA) para obter as regiões codantes faltantes e os UTRs.

Uma vez com o gene da lectina sequenciado, pode ser feito caracterização in silico, com o uso de ferramentas de bioinformática para análise de propriedades físicas e características de aminoácidos, realizar alinhamento global entre sequências homólogas, fazer previsões com modificações pós-traducionais, predizer os domínios transmembranares, realizar caracterização estrutural e procurar por peptídeos sinais. Por fim, predizer estruturas secundárias e/ou terciárias descritas em Camargos et al., 2024.

REFERÊNCIAS

- ABOUL-MAATY, Nadia Aboul-Ftooh; ORABY, Hanaa Abdel-Sadek. Extraction of high-quality genomic DNA from different plant orders applying a modified CTAB-based method. **Bulletin of the National Research Centre**, v. 43, n. 1, p. 1-10, 2019.
- ABUBAKAR, Bashir Mohammed et al. Comparison of different DNA extraction methods from leaves and roots of *Eurycoma longifolia* plant. **Advanced Science Letters**, v. 24, n. 5, p. 3641-3645, 2018.
- BOYD, William C.; SHAPLEIGH, Elizabeth. Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). **Science**, v. 119, n. 3091, p. 419-419, 1954.
- CAGLIARI, Rafael; KREMER, Frederico Schmitt; DA SILVA PINTO, Luciano. *Bauhinia* lectins: Biochemical properties and biotechnological applications. **International journal of biological macromolecules**, v. 119, p. 811-820, 2018.
- CAMARGOS, Ludmila Maria Gonçalves Godoi de; LOPES, Débora de Oliveira; CASTRO, Ana Hortência Fonseca. Characterization of Lectin from *Bauhinia holophylla* using bioinformatics tools. **Horticulturae**, v. 10, n. 7, p. 682, 2024.
- CAVADA, Benildo Sousa et al. Comprehensive review on Caelsalpinoideae lectins: From purification to biological activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 162, p. 333-348, 2020.
- CAVADA, Benildo Sousa et al. Reviewing Mimosoideae lectins: A group of under explored legume lectins. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 154, p. 159-165, 2020.
- CAVADA, Benildo Sousa et al. Reviewing Mimosoideae lectins: A group of under explored legume lectins. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 154, p. 159-165, 2020.
- CRISÓSTOMO, Clébia Vieira. Polissacarídeo endospérmico de *Bauhinia pentandra*: caracterização e estudo de interação com lectinas. 2008.
- DE CONINCK, Tibo; VAN DAMME, Els JM. The multiple roles of plant lectins. **Plant Science**, v. 313, p. 111096, 2021.
- DE VASCONCELOS, Mayron Alves et al. Lectin from *Canavalia brasiliensis* seeds (ConBr) is a valuable biotechnological tool to stimulate the growth of *Rhizobium tropici* in vitro. **Molecules**, v. 17, n. 5, p. 5244-5254, 2012.
- DEMEKE, Tigst; JENKINS, G. Ronald. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 396, n. 6, p. 1977-1990, 2010.
- DOMINGOS, Alisson Henrique; CAPELLARI JÚNIOR, Lindolpho. Plantas medicinais: patas-de-vaca. 2016.

DOYLE, Jeff J.; DOYLE, Jane L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical bulletin**, 1987.

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

GAUTAM, Ajay Kumar et al. Current scenario of legume lectins and their practical applications. **Journal of Crop Science and Biotechnology**, v. 21, n. 3, p. 217-227, 2018.

GREEN, Michael R.; SAMBROOK, Joseph. Molecular cloning. **A Laboratory Manual 4th**, v. 448, 2012.

HALE, Haley et al. Strategies for reducing per-sample costs in target capture sequencing for phylogenomics and population genomics in plants. **Applications in plant sciences**, v. 8, n. 4, p. e11337, 2020.

JAPELAGHI, Reza Heidari; HADDAD, Raheem; GAROOSI, Ghasem-Ali. Rapid and efficient isolation of high quality nucleic acids from plant tissues rich in polyphenols and polysaccharides. **Molecular biotechnology**, v. 49, n. 2, p. 129-137, 2011.

JOBES, David V.; HURLEY, David L.; THIEN, Leonard B. Plant DNA isolation: a method to efficiently remove polyphenolics, polysaccharides, and RNA. **TAXON**, v. 44, n. 3, p. 379-386, 1995.

KASEM, Shabana; RICE, Nicole; HENRY, Robert J. DNA extraction from plant tissue. In: **Plant genotyping II: SNP technology**. Wallingford UK: CABI, 2008. p. 219-271.

KOETSIER, Giron; CANTOR, Eric. A practical guide to analyzing nucleic acid concentration and purity with microvolume spectrophotometers. **New England Biolabs Inc**, v. 1, n. 8, 2019.

LANNOO, Nausicaä; VAN DAMME, Els JM. Nucleocytoplasmic plant lectins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1800, n. 2, p. 190-201, 2010.

LOCK, Mike. **Legumes of the World**. Kew: Royal Botanic Gardens, 2005.

LODHI, Muhammad A. et al. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and Vitis species. **Plant molecular biology Reporter**, v. 12, n. 1, p. 6-13, 1994.

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

MAGUIRE, Tina L.; COLLINS, Graham G.; SEDGLEY, Margaret. A modified CTAB DNA extraction procedure for plants belonging to the family Proteaceae. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 12, n. 2, p. 106-109, 1994.

MALLICK, Parag; KUSTER, Bernhard. Proteomics: a pragmatic perspective. **Nature biotechnology**, v. 28, n. 7, p. 695-709, 2010.

MOREIRA, P. A.; OLIVEIRA, D. A. Leaf age affects the quality of DNA extracted from *Dimorphandra mollis* (Fabaceae), a tropical tree species from the Cerrado region of Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 10, n. 1, p. 353-358, 2011.

MURRAY, M. G.; THOMPSON, WF324241. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic acids research**, v. 8, n. 19, p. 4321-4326, 1980.

NASCIMENTO, Kyria S. et al. Purification and partial characterization of a new melibiose-specific lectin from *Bauhinia catingae* Harms. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 282, p. 136564, 2024.

NASCIMENTO, Kyria Santiago et al. Dalbergieae lectins: A review of lectins from species of a primitive Papilionoideae (leguminous) tribe. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 144, p. 509-526, 2020.

NEGI, Arvind; SHARMA, Nimisha; SINGH, Mamta F. Spectrum of pharmacological activities from *Bauhinia variegata*: a review. **Journal of Pharmacy Research**, v. 5, n. 2, p. 792-797, 2012.

NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Artmed Editora, 2022.

OSTERNE, Vinicius JS et al. Novel Lectins from *Bauhinia* with Differential N-Glycan Binding Profiles. **ACS omega**, v. 10, n. 15, p. 15637-15645, 2025.

OSTERNE, Vinicius JS et al. The future of plant lectinology: Advanced technologies and computational tools. **BBA advances**, p. 100145, 2025.

OWCZARZY, Richard et al. IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. **Nucleic acids research**, v. 36, n. suppl_2, p. W163-W169, 2008.

PANDEY, Ram Naresh; ADAMS, Robert P.; FLOURNOY, Lori E. Inhibition of random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) by plant polysaccharides. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 14, n. 1, p. 17-22, 1996.

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

PINTO-JUNIOR, Vanir Reis; CAVADA, Benildo Sousa; NASCIMENTO, Kyria Santiago. Chimerolectins: Classification, structural architecture, and functional perspectives. **Protein Science**, v. 34, n. 9, p. e70261, 2025.

POREBSKI, Sue; BAILEY, L. Grant; BAUM, Bernard R. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. **Plant molecular biology reporter**, v. 15, n. 1, p. 8-15, 1997.

PRATYUSHA, Sambangi. Phenolic compounds in the plant development and defense. **Plant stress physiology: Perspectives in agriculture**, p. 125, 2022.

ROGERS, Scott O.; BENDICH, Arnold J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. **Plant molecular biology**, v. 5, n. 2, p. 69-76, 1985.

ROGERS, Scott O.; BENDICH, Arnold J. Extraction of DNA from plant tissues. In: **Plant molecular biology manual**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1988. p. 73-83.

SCHENK, John J. et al. What is the “modified” CTAB protocol? Characterizing modifications to the CTAB DNA extraction protocol. **Applications in Plant Sciences**, v. 11, n. 3, p. e11517, 2023.

SCOTT, Kirsten D.; PLAYFORD, Julia. DNA extraction technique for PCR in rain forest plant species. **Biotechniques**, v. 20, n. 6, p. 974-978, 1996.

SHARMA, Arun Dev; GILL, Prabhjot Kaur; SINGH, Prabhjeet. DNA isolation from dry and fresh samples of polysaccharide-rich plants. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 20, n. 4, p. 415-415, 2002.

SHARON, Nathan; LIS, Halina. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v. 14, n. 11, p. 53R-62R, 2004.

SHARON, Nathan; LIS, Halina. **Lectins**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2007.

SILVA, Andre Luis Coelho da; HORTA, Ana Cecilia Goes; MOREIRA, Renato de Azevedo. Isolation and partial characterization of a lectin from Bauhinia pentandra (bong) vog. Ex. Steua. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, p. 262-269, 2001.

SILVA, F. F.; GONÇALVES, D.; LOPES, D. The use of bioinformatics tools to characterize a hypothetical protein from Penicillium rubens. **Genet Mol Res**, v. 19, n. 2, p. 1-18, 2020.

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

SIVASHANKARI, Selvarajan; SHANMUGHAVEL, Piramanayagam. Functional annotation of hypothetical proteins—A review. **Bioinformation**, v. 1, n. 8, p. 335, 2006.

SRINIVASA, Krishnarajanagar Gopalalyengar; SIDDESH, Gaddadevara Matt; MANISEKHAR, S. R. (Ed.). **Statistical modelling and machine learning principles for bioinformatics techniques, tools, and applications**. Springer Nature, 2020.

ŠTORCHOVÁ, Helena et al. An improved method of DNA isolation from plants collected in the field and conserved in saturated NaCl/CTAB solution. **TAXON**, v. 49, n. 1, p. 79-84, 2000.

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

USHA RANI, Pathipati; JYOTHSNA, Yasur. Biochemical and enzymatic changes in rice plants as a mechanism of defense. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 32, n. 4, p. 695-701, 2010.

VAN DAMME, Els JM. 35 years in plant lectin research: a journey from basic science to applications in agriculture and medicine. **Glycoconjugate journal**, v. 39, n. 1, p. 83-97, 2022.

VAN DAMME, Els JM. History of plant lectin research. **Lectins: methods and protocols**, p. 3-13, 2014.

VAN HOLLE, Sofie; VAN DAMME, Els JM. Messages from the past: New insights in plant lectin evolution. **Frontiers in plant science**, v. 10, p. 36, 2019.

VARMA, Astha; PADH, Harish; SHRIVASTAVA, Neeta. Plant genomic DNA isolation: an art or a science. **Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology**, v. 2, n. 3, p. 386-392, 2007.

Vaz, A.M.S.F.; Santos, A.C.B. *Bauhinia in Flora e Funga do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB22811>>. Acesso em: 13 out. 2025

YE, Jian et al. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. **BMC bioinformatics**, v. 13, n. 1, p. 134, 2012.

ZHU, Hanliang et al. PCR past, present and future. **Biotechniques**, v. 69, n. 4, p. 317-325, 2020.