

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ – *CAMPUS* DE FRANCISCO BELTRÃO, CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE, PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE – NÍVEL MESTRADO

ADRIANO FAVERO

**Isolamento, caracterização da lectina das sementes de *Eugenia pyriformis* e potencial antimicrobiano**

FRANCISCO BELTRÃO – PR  
SETEMBRO/2019

**ADRIANO FAVERO**

**Isolamento, caracterização da lectina das sementes de *Eugenia pyriformis* e potencial antimicrobiano**

DISSERTAÇÃO apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Ciências Aplicadas à Saúde, nível Mestrado, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Aplicadas à Saúde.

Área de concentração: Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Rosemeire Aparecida da Silva de Lucca

FRANCISCO BELTRÃO – PR  
SETEMBRO/2019

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Favero, Adriano

Isolamento, caracterização da lectina das sementes de *Eugenia pyriformis* e potencial antimicrobiano / Adriano Favero; orientador(a), Rosemeire Aparecida da Silva de Lucca, 2019.

83 f.

Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Francisco Beltrão, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde, 2019.

1. Antimicrobianos. 2. Lectinas. 3. Biotecnologia. I. Aparecida da Silva de Lucca, Rosemeire. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

**ADRIANO FAVERO**

**Isolamento, caracterização de lectina de semente de *Eugenia pyriformis* e potencial antimicrobiano**

Essa dissertação foi julgada adequada para obtenção do título de Mestre em Ciências Aplicadas à Saúde e aprovada em sua forma final pelo(a) Orientador(a) e pela Banca Examinadora.

**BANCA EXAMINADORA**

Orientadora: Dra. Rosemeire Aparecida da Silva de Lucca  
UNIOESTE

Membro da banca: Profa. Dra. Franciele Ani Caovilla Follador  
UNIOESTE

Membro da banca: Prof. Dr. Alexandre Carvalho de Moura  
UFFS-Realeza

FRANCISCO BELTRÃO, PR  
Setembro/2019

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a Deus por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos, me dando forças apesar das adversidades.

Agradeço a meus pais e minhas irmãs por todo amor e apoio durante toda minha formação, sempre me motivando a crescer tanto como profissional, quanto como pessoa. A pessoa que sou hoje eu devo a vocês.

A minha esposa pelo seu amor, amizade, companheirismo, cumplicidade, confiança, incentivo e por entender meus momentos de reclusão, mal humor e afastamento. Aos meus dogs, pelo amor incondicional e fidelidade.

Agradeço à minha orientadora Profa. Rosemeire Aparecida da Silva de Lucca pela confiança e oportunidade de desenvolver esse trabalho, pela sua disponibilidade, conhecimentos e incentivo. Dedico a ela o crescimento intelectual e profissional que obtive no período em sua tutela.

Aos meus colegas de trabalho e programa, pela amizade, por me aturarem nos momentos de stress e pela ajuda em algumas metodologias por mim até então desconhecidas.

Aos meus amigos por todo apoio, incentivo e confiança, tornando os fardos a serem carregados sempre mais leves.

À toda UNIOESTE, onde estudo desde minha graduação, que está sempre contribuindo com meu crescimento intelectual.

À UFFS, onde trabalho há alguns anos, pelo meu desenvolvimento profissional.

Faltam páginas e palavras para nominar e agradecer todos que tornam minha vida melhor, mas sobram adjetivos. Por isso concluo deixando um singelo OBRIGADO às pessoas que agregam positivamente a minha vida.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Seletividade de ligação de lectinas em vegetais .....	19
Figura 2 – Classificação da estrutura global de lectina .....	20
Figura 3 – Esquema de detecção da atividade hemaglutinante.....	23
Figura 4 – Interações da lectina com carboidrato na superfície celular.....	27
Figura 5 – Teste de hemaglutinação – diluições seriadas.....	40

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Aplicações biotecnológicas das lectinas .....	27
Quadro 1- Atividade antimicrobiana de lectinas.....	36

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AH – Atividade Hemaglutinante

AHE – Atividade Hemaglutinante Específica

ANVISA-Agência nacional de vigilância sanitária

ATCC-*American Type Culture Collection*

BSA-*Bovine serum albumin*/ albumina de soro bovina

CasuL – *Calliandra surinamensis lectin*

CLSI – *Clinical and Laboratory Standard Institute*

ConA – Concanavalina A

CN-Controle negativo

CRD – *Carbohydrate-Recognition Domain*

EB – Extrato Bruto

EmaL-*Eugenia malaccensis Lectin*

EuniSL-*Eugenia uniflora Lectin*

FICI-*Fractional Inhibitory Concentration Indices*

FP-Fração Precipitada

FPD-Fração Precipitada Dialisada

Gal/GalNAc – *galactose/N-acetilgalactosamina*

GlcNAc – *ácido N-acetilneuramínico e N-acetilglicosamina*

GNA– *Galanthus nivalis Agglutinin*

GP – Gel Peritrófico

kDa – kilodalton

Man – manose

MEC – Matriz Extracelular

MIC ou CIM-*Minimum inhibitory concentration*/ Concentração Inibitória Mínima

MP – Membrana Peritrófica

MUL– *Myracrodruon urundeva Lectin*

MurNAc – ácido N-acetilmurâmico

PBS-*Phosphate buffered saline*/ Tampão fosfato-salino

pH– Potencial Hidrogeniônico

PHA – *Phaeseolus vulgaris Agglutinin*

QS – *Quorum Sensing*

SBA – *Soybean Agglutinin/ Aglutina de soja*

UFC-*Unidade formadora de colônia*

WGA – *Wheat germen Agglutinin/ Lectina do germe de trigo*

## **Isolamento, caracterização da lectinas das sementes de *Eugenia pyriformis* e potencial antimicrobiano**

### **Resumo**

Lectinas são proteínas de origem não imune, que despertam interesse biotecnológico na área da saúde, devido à sua capacidade de ligação seletiva e reversível aos carboidratos, mediando processos de reconhecimento celular. O objetivo deste trabalho foi extrair lectinas, determinar sua especificidade aos carboidratos e avaliar o potencial antibacteriano no extrato e frações precipitadas e dialisadas das sementes de *Eugenia pyriformis*. A extração aquosa foi realizada em tampão fosfato pH 7,0, 50 mM com NaCl 0,15 M, seguida de fracionamento com sulfato de amônio nas saturações de 0-40 (FPD 0-40) e 40-80% (FPD 40-80). As dosagens fenólicas e proteicas foram realizadas pelos métodos de Folin-Cicalteau e Bradford, respectivamente. Para a detecção das lectinas, as amostras nativas e termicamente desnaturadas foram submetidas a testes de atividade hemaglutinante (AH) em eritrócitos humanos (ABO), pelo método de diluição seriada. A inibição da AH das lectinas foi ensaiada com a pré-incubação das amostras nativas com os carboidratos D(+)galactose, D(+)glicose, D(+)maltose, D(+)manose, D(+) sacarose, D(+) ribose, D(+) fucose, D(+) arabinose, D(+) glicosamina, D(+) lactose monohidratada, D(+) galactosamina, N-acetil D-glicosamina, D(+) trealose di-hidratada, D(+) ramnose e D(-)-raffinose penta-hidratada. Os ensaios antibacterianos foram realizados por meio de disco-difusão para as cepas: *Staphylococcus aureus*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri*, *Escherichia coli*, *Klebsiella sp.*, *Morganella sp.*, *Serratia sp.*, *Proteus Mirabilis*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus pyogenes* e *Streptococcus agalactiae*. As dosagens revelaram que as sementes contêm baixo teor de proteínas (1%) e fenóis (0,1%). Os ensaios de AH das amostras nativas resultaram positivos para hemácias ABO, com preferência para o tipo A e maior AH (1024) para a FPD 40-80. Após a desnaturação térmica das amostras, as atividades sofreram considerável diminuição (de 1024 para 16), mostrando que a maior parte da AH é devida à presença de lectinas, que

apresentaram afinidade principalmente por D (+) -galactose, D (+) -arabinose, D(+)-lactose e D(+)-galactosamina. Os testes antibacterianos das amostras nativas apresentaram formação de halos de inibição para as cepas *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *Enterococcus faecalis*, *Shigella flexneri*, *Escherichia coli*, *Klebsiella sp.* e *Serratia sp.*, para todas as frações testadas. A perda da atividade antibacteriana nas amostras desnaturadas mostra a natureza proteica dos compostos responsáveis pelo efeito. A diversidade da especificidade dos carboidratos em cada amostra sugere a presença de no mínimo duas lectinas nas sementes.

**Palavras-chave:** antibacteriano, antifúngico, hemaglutinação, Myrtaceae, uvaia.

## Isolation, characterization of the lectin of *Eugenia pyriformis* seeds and antimicrobial potential

### Abstract

Lectins are proteins of non-immune origin, which arouse biotechnological interest in the health area, due to their selective and reversible carbohydrate binding capacity, mediating cellular recognition processes. The objective of this work was to extract lectins, determine their specificity to carbohydrates and evaluate the antibacterial potential in the extract and precipitated and dialysated fractions of the seeds of *Eugenia pyriformis*. The aqueous extraction was performed in phosphate Buffer pH 7.0, 50 mM with NaCl 0.15 M, followed by fractionation with ammonium sulfate in the saturations of 0-40 (FPD 0-40) and 40-80% (FPD 40-80). The phenolic and proteic dosages were performed by the Folin-Cicalteau and Bradford methods, respectively. For the detection of lectins, the native and thermally denatured samples were subjected to hemagglutinating activity (HA) tests in Human erythrocytes (ABO), by the serial dilution method. The inhibition of the HA of the lectins was rehearsed with the pre-incubation of the native samples with the carbohydrates D (+)-glucose, D(+)-galactose, D(+)-glucose, D(+)-maltose, D(+)-mannose, D(+)-sucrose, D(+)-ribose, D(+)-fucose, D(+)-arabinose, D(+)-glucosamina, D(+)-lactose monohydrate, D(+)-galactosamine, N-Acetyl-D-glucosamine, D(+)-Trehalose dihydrate, D(+)-rhamnose e D(+)-raffinose pentahydrate. The antibacterial assays were performed by means of disc diffusion for the strains: *Staphylococcus aureus*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri*, *Escherichia coli*, *Klebsiella sp.*, *Morganella Sp.*, *Serratia sp.*, *Proteus Mirabilis*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus agalactiae*. The dosages revealed that the seeds contain low protein content (1%) and phenols (0.1%). The HA assays of the

native samples resulted positive for ABO erythrocytes, with preference for type A and higher HA (1024) for FPD 40-80. After the thermal denaturation of the samples, the activities suffered a considerable decrease, showing that most of the HA is due to the presence of lectins, which presented affinity mainly for D (+)-galactose, D (+)-arabinose, D (+)- lactose monohydrate and D (+)- galactosamine. The antibacterial tests of the native samples obtained formation of inhibition halos for the strains *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *Enterococcus faecalis*, *Shigella flexneri*, *Escherichia coli*, *Klebsiella sp.* and *Serratia sp.*, for all tested fractions. The loss of antibacterial activity in denatures samples shows the proteic nature of the compounds responsible for the effect. The diversity of the specificity of carbohydrates in each sample suggests the presence of at least two lectins in the seeds.

**Keywords:** antibacterial, antifungal, hemagglutination, Myrtacea, uvaia.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>16</b>
1.1 Histórico e definição das lectinas	17
1.2 Classificação das Lectinas	19
1.3 Fontes, localização e suas funções nos vegetais	21
1.4 Detecção e Especificidade	23
1.5 Métodos para Isolamento e Caracterização de Lectinas	24
1.6 Aplicações das Lectinas	26
1.6.1 Aplicações na identificação e combate ao câncer	28
1.6.2 Atividade inseticida	29
1.6.3 Atividade antimicrobiana	31
1.6.3.1 Atividade antifúngica	32
1.6.3.2 Atividade antibacteriana	33
1.7 <i>Eugenia pyriformis</i>	37
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>37</b>
2.1 Geral	37
2.1 Específicos	37
<b>3. METODOLOGIA</b>	<b>38</b>
3.1 Coleta de material e Identificação	38
3.2 Preparação da Farinha e Obtenção do Extrato Bruto (EB)	38
3.3 Fracionamento do Extrato Bruto por precipitação com sulfato de amônio	38
3.4 Diálise das Frações Precipitadas (FPD)	39
3.5 Detecção da atividade Hemaglutinante	39
3.5.1 Coleta do sangue	39
3.5.2 Retirada do Plasma e Preparo do CH 2%	39
3.5.3 Determinação da AH em amostras nativas	39
3.5.4 Ensaio de especificidade aos carboidratos	41
3.6 Dosagem de Proteínas	41

3.6.1	Preparo do Reagente de Bradford .....	41
3.6.2	Curva Padrão BSA .....	42
3.6.3	Concentração de Proteínas.....	42
3.7	Dosagem de Fenóis .....	42
3.8	Ensaio Antimicrobiano por meio de testes de disco-difusão .....	43
3.8.1	Ensaio Antibacteriano .....	43
3.8.2	Ensaio Antifúngico.....	44
<b>4.</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>45</b>
<b>5.</b>	<b>ARTIGO .....</b>	<b>58</b>

# 1. INTRODUÇÃO GERAL

Estudos sobre as propriedades terapêuticas, como atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e antitumoral, de extratos e óleos vegetais, oriundos de diversas partes das plantas como folhas, sementes frutos, cascas, caules e raízes, têm sido amplamente desenvolvidos em todo mundo (NAZZARO et al., 2013; FIGUEIREDO et al., 2014).

A grande diversidade da flora brasileira é mundialmente reconhecida, e representa 20% da biodiversidade vegetal do planeta, despertando crescente interesse em pesquisadores, principalmente pelo potencial farmacológico como fonte de substâncias bioativas (GARCEZ et al., 2016). O projeto “Lista de Espécies da Flora Brasileira” (2015) reuniu esforços de mais de 500 taxonomistas nacionais e internacionais que reconheceram 40.385 espécies vegetais. Entretanto, apenas cerca de 10% dessas espécies foram avaliados em relação às atividades biológicas, e 5% em relação aos seus constituintes químicos. O metabolismo das plantas produz basicamente duas classes de princípios ativos: os metabólitos primários e os secundários.

No metabolismo primário são sintetizados os carboidratos, os peptídeos e as proteínas, os quais desempenham funções vitais às plantas promovendo resistência com funções estruturais, plástica e de armazenamento de energia. Dentre os metabólitos primários, as proteínas são as mais abundantemente expressas nos vegetais atuando em diversificadas funções, como reserva, transporte, estruturais e regulatórias (TAN-WILSON & WILSON, 2012). A partir das rotas do metabolismo primário são sintetizados os metabólitos secundários (alcaloides, terpenoides e substâncias fenólicas) conhecidos por atuar no mecanismo de defesa vegetal reduzindo a infecção por patógenos, promovendo a manutenção da integridade estrutural.

Além dos metabólitos secundários, algumas classes de proteínas foram relacionadas aos mecanismos de defesa nas plantas, como as lectinas, que dentre as várias funções endógenas participam da defesa contra patógenos e predadores (LANNON & VAN DAMME, 2014).

A principal característica das lectinas é possuir, pelo menos, um domínio não catalítico, com a capacidade de ligar-se seletivamente e reversivelmente a carboidratos (LANNON & VAN DAMME, 2010; LAM & NG, 2011). Desse modo, interagem com as

glicoproteínas e glicolipídios das células, bem como a glicanos que flutuam livremente, como os monossacarídeos (RABINOVICH et al., 2007; GHAZARIAN et al., 2011).

A capacidade seletiva de ligação das lectinas aos carboidratos mostra que essas proteínas são importantes em mediar fenômenos de reconhecimento molecular e sinalização celular, como a fertilização e a infecção, tornando-as aptas para inúmeras aplicações biológicas e biotecnológicas (GHAZARIAN et al., 2011; IORDACHE et al., 2015). Essas biomoléculas estão presentes em todos os organismos desde os vírus até os mamíferos, porém foram detectadas e estudadas em maior número no reino vegetal, onde muitas dessas proteínas, já foram isoladas e testadas para atividades, como aglutinação de células e mitogenicidade, toxicidade *in vivo* e *in vitro*, atividade insulino-mimética, inibição do crescimento de fungos e bactérias, ação inseticida, atividade anti-inflamatória, ação antiviral, anti-nematóide e efeito anti-tumorigênico (PAIVA et al., 2010, LAM & NG, 2011; SAHA et al., 2014;)

Por outro lado, existe uma carência de estudos de investigação das lectinas de espécies vegetais nativas da região sul, que explorem e avaliem o potencial farmacológico de plantas utilizadas na medicina popular, por exemplo, a *Eugenia pyriformis*, conhecida como uvaia, utilizada no tratamento da gota humana (SCHMEDA-HIRSCHMANN et al., 1987; THEODULOZ et al., 1988) e pelos seus efeitos bactericidas (STIEVEN et al., 2009; CHAVASCO et al., 2014; SOUZA et al., 2014).

Devido à importância biológica das lectinas, e a ausência de estudos dos metabólitos primários da *Eugenia pyriformis*, neste trabalho pretendeu-se detectar e purificar parcialmente as lectinas das sementes dessa espécie, bem como investigar o potencial antimicrobiano dos extratos e frações aquosas.

## 1.1 Histórico e definição das lectinas

Esse grupo de proteínas foi descrito pela primeira vez em 1888, por Hermann Stillmark, enquanto estudante de medicina, que desenvolvia ensaios de toxicidade da mamona (*Ricinus communis*). Quando foi observado que a ricina (proteína do extrato da planta) aglutinava eritrócitos de diferentes animais (PEUMANS & VAN DAMME, 1998; SHARON & LIS, 2004). Em 1889, Hellin, percebeu que o extrato tóxico de *Abrus precatorius* também tinha a capacidade de aglutinar células sanguíneas devido à presença da proteína abrina (SHARON & LIS, 2004). Por essa característica, esse grupo de proteínas foi primeiramente denominado aglutinina ou hemaglutinina até 1954, quando

Boyd e Shapleigh alteraram o nome para lectinas (palavra derivada do latim, onde “lectus” significa escolhido, selecionado), por sua capacidade de distinguir eritrócitos de diferentes grupos sanguíneos (SHARON & LIS, 1988). Vários pesquisadores seguiram investigando aglutininas tóxicas, até que em 1907, Landsteiner e Raubitschek descobriram aglutininas não tóxicas em sementes de *Phaseolus vulgaris* (feijão), *Pisum sativum* (ervilha), *Lens culinaris* (lentilha), demonstrando que as lectinas são comuns no reino vegetal (SOL et al., 2006).

Os anos 60 foram fundamentais para colocar as lectinas no centro das atenções científicas. Peter C. Nowell (1960) descobriu que a fitohemaglutina do *Phaseolus vulgaris* (PHA) possui a capacidade de estimular a mitose em linfócitos. Hoje muitas lectinas são descritas como possuidoras dessa capacidade (SHARON & LIS, 2004). Joseph C. Aub (1963), descobriu que a lectina do germe de trigo (WGA) tem a capacidade de aglutinar preferencialmente células malignas, posteriormente descobriu-se que outras lectinas como a Concanavalina A (ConA) e a aglutina de soja (SBA) possuem a mesma capacidade. Finalizando a década, em 1970, Robert C. Gallo e associados descobriram que o fator de crescimento de células-T (interleucina-2) em meio condicionado de linfócitos humanos normais eram estimulados por PHA (MORGAN et al.; 1976).

Drickamer (1988) propôs que a atividade de ligação de carboidratos da maioria dos aminoácidos reside em um segmento polipeptídico chamado de domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD – *Carbohydrate-Recognition Domain*). Com base nesse conceito foi possível dividir a maioria das lectinas em famílias e superfamílias estruturalmente relacionadas (SHARON & LIS, 2004).

Inicialmente, um dos requisitos para uma proteína ser classificada como lectina era a sua capacidade de aglutinar células e precipitar glicoconjugados, e conseqüentemente ter dois sítios de reconhecimento ao carboidrato. Peumans e Van Damme (1995), determinaram três critérios para a classificação de proteínas como lectinas.

O primeiro critério é que a proteína deve conter ao menos um domínio não-catalítico de ligação a mono ou oligossacarídeos de forma reversível e sem alterar as propriedades glicosídicas. A ligação ocorre por ligações de hidrogênio e interações de Van der Waals entre os grupos hidroxilas e os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da lectina. Da mesma forma que as lectinas, outros compostos, como taninos, substâncias catiônicas, carboidratos cognatos, alguns lipídios e cátions divalentes são capazes de aglutinar ou precipitar células (GOLDSTEIN, 2002; TRINDADE, 2005; IORDACHE et al., 2015).

O segundo critério é não serem imunoglobulinas, pois as lectinas podem ser

induzidas por um estímulo externo, divergindo de uma mudança antigênica. Nos vegetais, por exemplo, a expressão da lectina pode aumentar em decorrência de stress causado por infecções, secas e concentrações de sal. Adicionalmente, as lectinas podem ser encontradas em todos os grupos de animais e plantas, mesmo os mais simples e sem sistema imune. O fato de possuírem origem não imune ajuda a distingui-las de outras células com capacidade aglutinante, como os anticorpos anticarboídratos. (MOREIRA et al., 1991). Finalmente, o terceiro critério, é não alterar a estrutura covalente do carboídrato em que a mesma se liga – excluindo assim do grupo as glicotransferases, glicosídates, grupos sulfatos e fosfatos (SINGH et al., 1999, VAN DAMME et al., 2004).

## 1.2 Classificação das Lectinas

Várias lectinas com especificidade a carboídratos já foram purificadas em diversos organismos. Sua classificação se dá de três formas: conforme sua ligação ao carboídrato, pela análise de sua estrutura global ou são agrupadas em famílias de acordo com a evolução e domínio de reconhecimento ao carboídrato (CRD) (LAM & NG, 2011; IORDACHE et al., 2015).

Essas proteínas foram divididas, por Lis e Sharon (1998), em cinco grupos de acordo com o carboídrato que tem maior afinidade: fucose, galactose/N-acetilgalactosamina (Gal/GalNAc), manose (Man), ácido N-acetilneuramínico e N-acetilglicosamina (GlcNAc) (Figura 1).

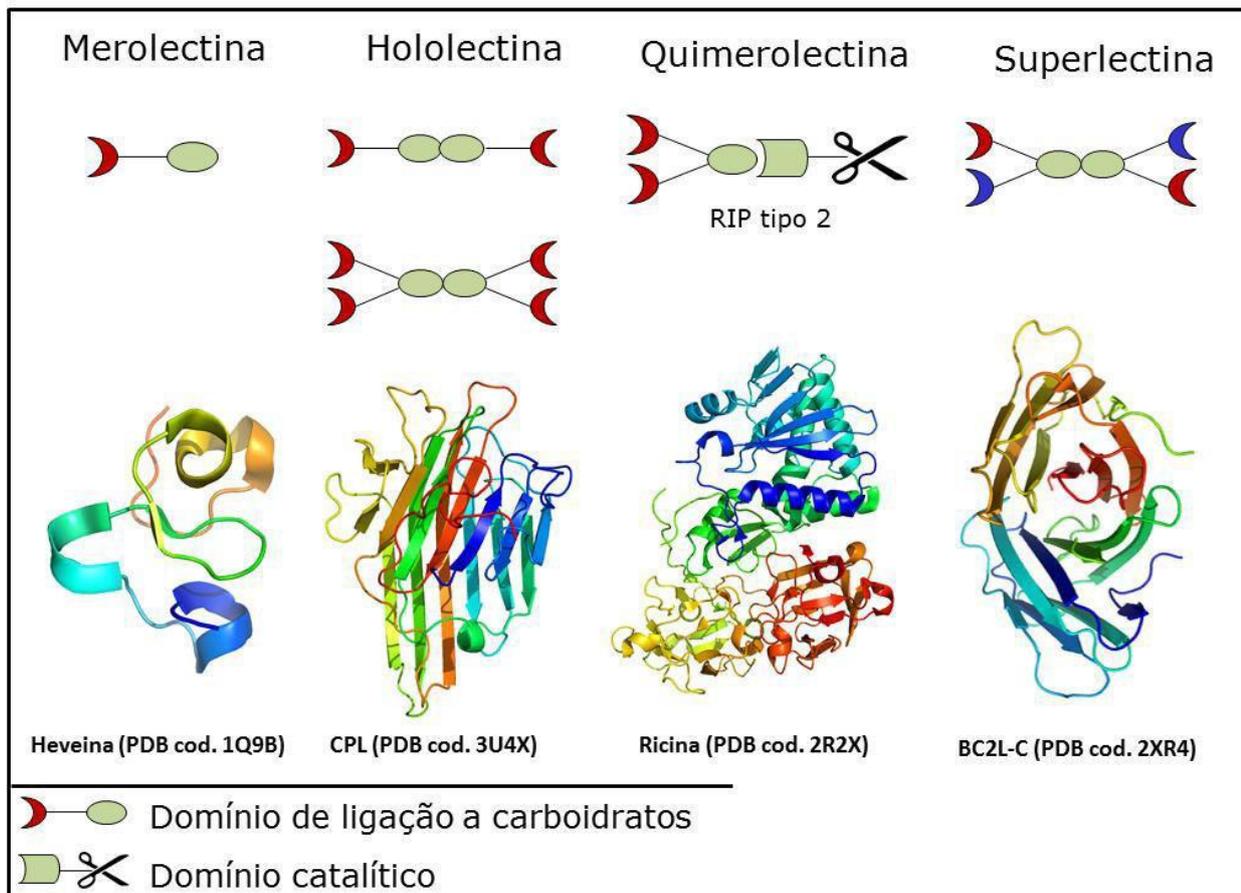


**Figura 1-**Seletividade de ligação de lectinas em vegetais (BERG, 2002)

A capacidade das lectinas de ligação a carboídratos foi descrita por Peumans e Van Damme (1998) como sendo muito ampla, tendo afinidade maior por oligossacarídeos do que pelos açúcares simples e mesmo possuindo diferenças estruturais, membros de diferentes famílias de lectinas podem reconhecer o mesmo açúcar. A especificidade da maioria das lectinas se dá em carboídratos diferentes ao organismo onde a lectina foi isolada, como exemplo temos as lectinas ligantes de quitina que reconhecem um

polissacarídeo inexistente em plantas, mas comum em fungos e insetos.

Em relação à sua estrutura global, as lectinas podem ser divididas em quatro classes, como mostra a Figura 2. As merolectinas são as mais simples, monovalentes, de cadeia única e apresentam um único domínio de reconhecimento ao carboidrato (CRD). Por serem muito pequenas e monovalentes, são incapazes de aglutinar células. A classe das hololectinas compreende a maioria das lectinas, são divalentes ou multivalentes (apresentam dois ou mais domínios de ligação aos carboidratos), possuem a capacidade de precipitar glicoconjugados e aglutinar células. A terceira classe trata-se das quimerolectinas que além de um domínio de ligação a carboidrato, possui um domínio adicional com atividade catalítica ou biológica adicional, reagindo independente do domínio de ligação ao carboidrato. Por fim, temos as superlectinas, capazes de reconhecer dois ou mais domínios de carboidratos multivalentes que são capazes de reconhecer açúcares estruturalmente não relacionados (VAN DAMME et al., 1998; IORDACHE et al., 2015).



**Figura 2:** estrutura global de lectinas em: merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas (Adaptado de CAVADA et al., 2001)

Através dos recentes avanços nas áreas da biologia molecular e bioquímica vegetal, as lectinas foram classificadas em 12 famílias, com base em seus domínios de ligação ao carboidrato (CRD). Estes domínios são classificados de acordo com a sequência e enovelamentos polipeptídicos, bem como, com a estrutura do sítio de ligação. Desse modo, cada família tem em comum, características evolucionárias baseadas na similaridade das sequências polipeptídicas.

As famílias são: aglutininas homólogas a *Agaricus bisporus*, *Amarantinas*, homólogas de quitinase classe V, família de aglutinina *Euonymus europaeus*, família de aglutinina *Galanthus nivalis*, proteínas com domínios heveínicos, jacalinas, proteínas com domínios de lectina de leguminosas, proteínas do domínio LysM (*Lysin motif*), a família de aglutininas *Nicotiana tabacum* e família ricina-B. As lectinas com as sequências polipeptídicas descritas até o momento, quase em sua totalidade pertencem a essas 12 famílias. Uma exceção é a lectina DB3L isolada de *Dioscorea batatas*, ligante exclusiva de maltose, a qual não se encaixa em nenhuma dessas famílias de lectinas vegetais conhecidas, tanto em estrutura quanto na especificidade ao açúcar (GAIDAMASHVILI, 2004; ATTA-UR-RAHMAN, 2018).

### **1.3 Fontes, localização e suas funções nos vegetais**

As lectinas estão presentes em todas as classes de famílias e organismos, sendo encontradas nas mais variadas formas de vida, desde procariotos até animais e nas plantas (YAU et al., 2015). As espécies vegetais são ricas em lectinas, servindo como principais fontes de análises e isolamento dessas moléculas.

Essas biomoléculas se localizam em diversas partes dos vegetais, devido a isso, os estudos com lectinas em plantas podem ser realizados em sementes, raízes, folhas, tubérculos e cerne (CRUZ, 2015). Além da ampla distribuição nos tecidos vegetais, variam em quantidades acumuladas em cada espécie e tecido. Geralmente, as lectinas correspondem de 0,1 a 10% das proteínas totais dos tecidos.

As sementes geralmente são as estruturas mais ricas dessa classe de biomoléculas, sendo que constituem aproximadamente 10% das proteínas solúveis, por isso grande parte das lectinas é detectada, isolada e purificada nas mesmas (SINGHA; ADHYA; CHATTERJEESINGHA, 2007). As lectinas de sementes pertencem a um grupo de proteínas altamente homólogas, aproximadamente 50 sequências de lectinas de leguminosas que foram estudadas mostram uma similaridade de sequência de pares

superiores a 35%. Porém, apresentaram grande variação tanto da sua estrutura quaternária, quanto na especificidade ao carboidrato (LORIS et al, 1998; HAMID et al. 2013; LARGADA-DIAZ et al, 2017).

Alguns trabalhos como Coelho & Silva (2000) purificaram a lectina das folhas da *Bauhinia monandra*. Rameshwaram & Nadimpalli (2008) também pesquisaram lectinas em folhas, mas outros tecidos como o cerne (SÁ et al. 2009), os bulbos (PARISI et al., 2008), rizomas (CHU & NG, 2006; KAUR et al., 2005), frutos (WANG & NG, 2006) podem ser utilizados.

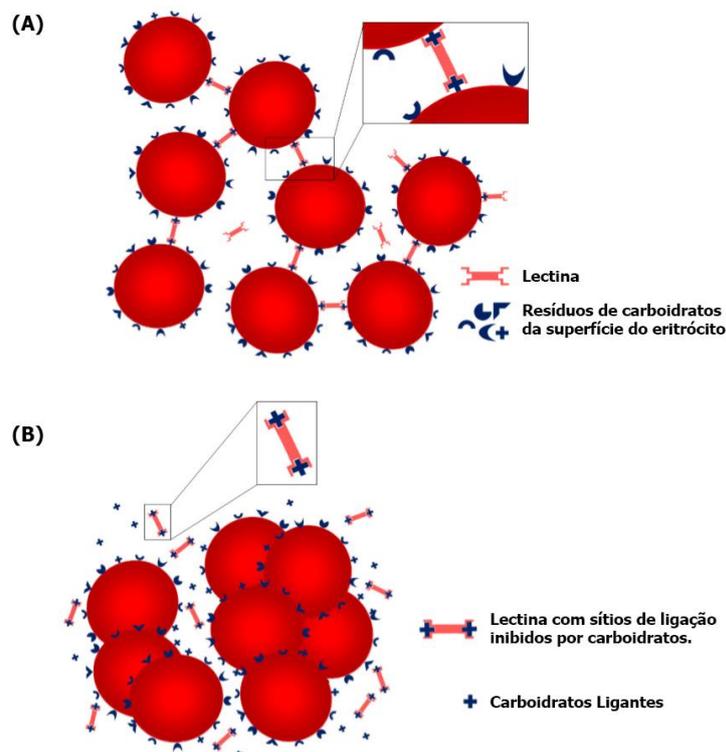
O papel fisiológico das lectinas vegetais endógenas está diretamente relacionado aos tecidos onde estão localizadas, às suas características gerais e aos sítios ligantes aos carboidratos específicos (VAN DAMME et al., 2008; VANDENBORRE; et al., 2011; LANNOO & VAN DAMME, 2014).

Para entender melhor a função das lectinas nas plantas, precisamos dividi-las em atividades externas, como os efeitos prejudiciais aos agressores, e internas, como a montagem e transporte de ligantes apropriados e direcionamento de atividade enzimática (RUDIGER & GABIUS, 2001). Podem atuar no controle de germinação de sementes, reconhecimento célula, interação célula matriz extracelular (MEC), fertilização gamética, desenvolvimento embrionário, diferenciação celular, indução mitogênica, armazenamento e transporte de carboidratos e sua fixação na planta, regulação do crescimento e alongação da parede celular, mitose, proteção celular, reserva, entre outras (WORMALD & SHARON, 2004; MACEDO et al., 2015). Também agem na defesa contra vírus, insetos, nematoides, microrganismos e até animais herbívoros, interferindo diretamente no crescimento, desenvolvimento e fisiologia dos mesmos, pela interação com os glicoconjugados desses organismos (WANG & NG, 2006; PEUMANS & VAN DAMME, 1995).

Essas biomoléculas foram detectadas e isoladas em diversas famílias no reino vegetal, principalmente em leguminosas, que possuem proteínas em maior quantidade, facilitando a purificação (LAM & NG, 2011). A forma de detecção mais simples das lectinas extraídas dos tecidos vegetais leva em consideração a propriedade destas aglutinarem determinadas células. Após a detecção, a utilização de técnicas biofísicas e bioquímicas modernas permitem o isolamento e a purificação das lectinas e a biologia molecular tem contribuído para a identificação e aplicação de suas propriedades (IORDACHE et al., 2015).

## 1.4 Detecção e Especificidade

As lectinas são geralmente detectadas através de ensaios de aglutinação, onde existe a interação com as células, por meio de seus sítios de ligação aos carboidratos, formando diversas ligações reversíveis entre estas. Isso se deve ao fato de grande parte das lectinas serem di ou polivalentes formando pontes entre carboidratos ou glicoproteínas em solução ou ligadas à membrana celular (CORREIA et al, 2008). O ensaio de hemaglutinação (Figura 3a) é o mais comumente utilizado para possibilitar a visualização desta propriedade aglutinante dos eritrócitos pelas lectinas, podendo ser utilizados para o ensaio hemácias humanas ou de animais, tratadas quimicamente (formaldeído ou glutaraldeído), enzimaticamente (papaína, tripsina) ou não tratados (JUNG et al. 2007; COELHO et al., 2007; SANO & OGAWA, 2014).



**Figura 3** – Esquema de detecção da atividade hemaglutinante (AH) das lectinas de uma amostra. (a) AH induzida pela interação da lectina com carboidrato específico da superfície do eritrócito e (b) inibição da AH pela incubação da amostra com o carboidrato específico, impedindo a formação da rede reticular. (Santos et al, 2014).

Um indicativo que a atividade hemaglutinante (AH) seja devida às proteínas é a perda dessa atividade após a desnaturação térmica das amostras, pois o número de lectinas resistentes às temperaturas altas é reduzido. No entanto, a inibição da AH pela

incubação da amostra na presença de carboidratos é o teste mais eficiente na confirmação da presença de lectinas (Figura 3b), pois lipídeos, cátions divalentes, taninos e fenóis, quando em grandes concentrações podem promover a dispersão dos eritrócitos mostrando um falso positivo para a atividade (CORREIA et al., 2008).

A especificidade de uma lectina a um carboidrato é determinada pelo monossacarídeo que necessita de uma menor concentração para inibir a sua atividade hemaglutinante (CORREIA et al, 2008; SANO & OGAWA, 2014). Porém, algumas lectinas só são inibidas por oligossacarídeos, glicoproteínas e/ou polissacarídeos. Essa especificidade é determinada pela estrutura tridimensional dos sítios de ligação das lectinas, que são bastante similares dentro de suas famílias (THAKUR et al. 2007; VAN DAMME et al., 2008; WALTI et al. 2008).

### **1.5 Métodos para Isolamento, Purificação e Caracterização de Lectinas**

O isolamento de lectinas vegetais pode ocorrer em diferentes níveis e por diferentes técnicas, indo desde uma simples extração até uma completa purificação, alguns desses métodos são mais comumente usados para esse fim. O primeiro passo é a extração dessas biomoléculas das células fontes (rizomas, folhas e sementes), utilizando solução salina ou solução tampão adicionada ao triturado vegetal e submetida à temperatura, tempo e agitação controladas. A extração deve ser refrigerada para prevenir a desnaturação proteica. As lectinas, que são proteínas solúveis em água, são liberadas das células para a solução. Esse material é filtrado e após a centrifugação o sobrenadante é denominado extrato bruto (EB) (TRIGUEIROS et al., 2003).

Em seguida, para a remoção de impurezas e uma purificação parcial do EB, é frequentemente empregado o método de precipitação proteica em diferentes concentrações de sulfato de amônio, num fenômeno conhecido como *salting-out*, resultando no fracionamento da amostra. Além de sais, os solventes orgânicos, como a acetona, ou ácidos podem ser utilizados para a precipitação proteica (LAM & NG, 2010).

As frações proteicas parcialmente purificadas passam pelo processo de diálise, onde há a separação das moléculas pela diferença de massa molecular, através de uma membrana seletiva, onde as proteínas são retidas, ao contrário das partículas menores, como sais ou carboidratos, que passarão pela membrana (POHLEVEN et al., 2012).

A purificação das lectinas, como as demais proteínas globulares, é alcançada pela combinação de uma ou mais técnicas de cromatografia líquida em coluna. Essas técnicas

separam as proteínas explorando as suas diferenças em polaridade (cromatografia de troca iônica), massa molecular (filtração molecular) e hidrofobicidade (cromatografia em fase reversa) (COLLINS et al., 2006).

A purificação pode ser simples, como o isolamento da lectina antitumoral, denominada CasuL (*Calliandra surinamensis* lectin), que foi alcançada após o fracionamento por precipitação salina seguida de cromatografia de exclusão molecular, empregando a coluna Sephadex G75 (PROCÓPIO et al., 2017). Entretanto, em outros casos requer duas ou mais etapas cromatográficas como a purificação da lectina antimicrobiana extraída das sementes de *Chenopodium chinosa*, que foi isolada por filtração molecular (Sephadex G100) seguida de cromatografia de fase reversa (coluna Mono-Q) (POMPEU et al., 2015).

Além das cromatografias anteriormente citadas, a afinidade de determinada proteína ao seu ligante pode ser explorada no processo de purificação, como é o caso das interações antígeno-anticorpo, carboidrato-lectina e enzima-substrato (COLLINS et al., 2006).

A cromatografia de afinidade aos carboidratos é particularmente útil na purificação das lectinas, pois utiliza diretamente a principal característica dessas biomoléculas, que é a sua ligação específica e reversível aos carboidratos. Nessa técnica, os ligantes covalentemente imobilizados na matriz (fase estacionária) podem ser monossacarídeos, dissacarídeos, polissacarídeos ou ainda glicoproteínas. A escolha dependerá do carboidrato que inibe a atividade hemaglutinante da lectina de interesse. Recentemente, uma lectina relacionada à família das jacalinas foi purificada de *Ananas comosus* com o auxílio de uma coluna com D-manose imobilizada e filtração molecular (AZARKAN et al., 2018).

Para o acompanhamento das etapas de purificação e determinação do grau de homologia das amostras é empregada a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE, comumente utilizada em procedimentos de isolamento proteico. Esta técnica também permite a estimativa da massa molecular e da estrutura quanto ao número de subunidades (AZARKAN et al., 2018).

Existem vários critérios para avaliar a viabilidade da produção de uma lectina, dentre eles estão o alto teor da lectina no material de partida e o protocolo de purificação. a ser usado, por exemplo, as lectinas recombinantes geralmente têm um alto custo de produção, porém, tem alto rendimento (LAM & NG, 2010).

Além da purificação, a caracterização de lectinas é de extremo interesse para os pesquisadores, pois quanto mais se sabe sobre as suas propriedades, mais aplicações

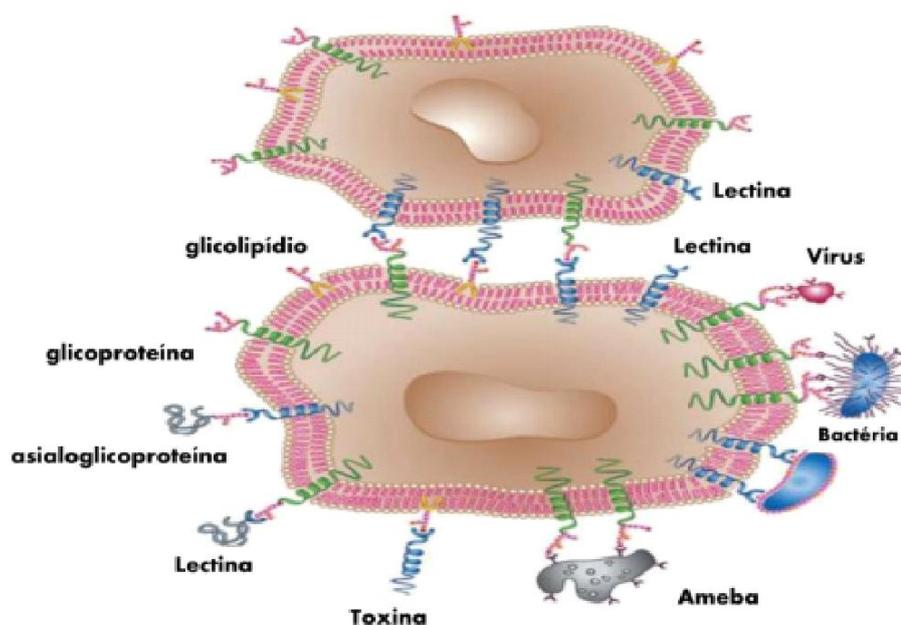
podem ser encontradas. Um conjunto de ensaios comumente é aplicado para caracterizar uma lectina.

O teste de estabilidade térmica da proteína é utilizado para determinar se essa lectina é termossensível ou termoestável, isso implica em uma otimização ou perda da atividade biológica da lectina em temperatura favorável ou desfavorável em comparação à sua estrutura nativa. Algumas lectinas quando submetidas a temperaturas relativamente baixas (pouco acima de 50 °C) tem perda total de suas atividades biológicas (JUNG et al., 2007); enquanto outras suportam temperaturas relativamente altas e em alguns casos até acentuam a sua atividade (CORREIA et al., 2008).

A hemaglutinação pode caracterizá-la quanto a sua especificidade entre eritrócitos de diferentes animais ou dentro do sistema ABO humano, enquanto a inibição dessa atividade determina a sua especificidade (SHARMA et al., 2009; POMPEU et al., 2015). Adicionalmente, na caracterização são avaliados a dependência de diferentes íons, como  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+}$ , e variações de pH na estabilidade da hemaglutinação e consequentemente atividade biológica (SILVA et al., 2010; SILVA et al., 2012, PAULCHAMY et al., 2019).

## **1.6 Aplicações das Lectinas**

Por se tratar de um grupo muito variado de proteínas, as aplicações das lectinas são bastante amplas e a diversidade de suas atividades biológicas está relacionada à capacidade de ligação específica aos carboidratos e glicoconjugados na superfície das células, dessa forma atuam como mediadoras em processos de interação e reconhecimento celular dependente de carboidratos (Figura 4). Dentre esses diversos processos, podemos citar a aglutinação, estimulação mitogênica, imunomodulação, redistribuição de componentes de superfície celular, toxicidade, glicosilação, associada ao desenvolvimento do câncer, e a infecção por bactérias, nematoides, protozoários, vírus entre outros (SHARON & LIS, 2004; TAKAHASHI et al., 2008; LI et al. 2008).



**Figura 4** – Interações da lectina com carboidrato na superfície celular mediam interações célula-célula e/ ou célula-matriz extracelular através do reconhecimento específico de glicoconjugado (SHARON & LIS, 2004).

O estudo dessas atividades biológicas (Tabela 1) tem identificado diversas aplicações em vários campos como na ciência básica, biotecnologia, medicina, bioquímica, biologia celular e molecular. (FERNANDES, 2012; FARIAS, 2013).

**Tabela 1-** Algumas aplicações biotecnológicas das lectinas

Áreas	Aplicações
Bioquímica	Identificação de grupos sanguíneos (ABO humano) (1)(6)
Biomarcador	Marcadores de superfície celular (2)
Antifúngica	Diminuição na absorção de nutrientes e germinação de esporos (3)
Inflamação	Lectinas com capacidades pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (8)(9)(10)
Anticoagulante	Prolongamento do tempo de ativação parcial da protrombina e tromboplastina (5)
Farmacologia	Uso de lectinas como carreadoras de drogas (7)
Antiviral	Interferência na replicação e crescimento do vírus (4)

**Referências:** Rudger et al., 2001(1); RÊGO et al., 2013(2); BAH et al., 2013(3); HAMID et al., 2013(4); LUZ et al., 2013 (5), GORAKSHAKAR & GHOSH, 2016 (6), DANHIER et al., 2010 (7); ALENCAR et al., 2005a (8); ALENCAR et al., 2005b (9); MOVAFAGH et al., 2016 (10).

Dentre as diversas aplicações biológicas das lectinas, algumas apresentaram bons resultados antivirais. Trabalhos in vitro, principalmente com lectinas ligantes de manose ou N-acetilglicosamina, demonstraram atividade anti-HIV, tanto inibindo quanto prevenindo a infecção, ou inibindo a atividade da transcriptase reversa HIV-1 (BALZARINI, 2006; MOLCHANOVA et al., 2007; LI et al., 2008). Algumas lectinas também apresentaram efeito modulador de resposta imune (GAVROVIC-JANKULOVIC et al. 2008). Outras têm sido estudadas na utilização em sistemas de liberação de drogas, pelo fato de poder apresentar a capacidade de mediar citoadesão, mucoadesão e/ou citoinvasão das mesmas (GABOR et al. 2004; DALVINA CORREIA DA SILVA, 2008). Atualmente, os principais estudos relacionados às lectinas são destinados à sua atividade antitumoral, antimicrobiana e inseticida.

### **1.6.1 Aplicações na Identificação e Combate ao Câncer**

Nas células tumorais, a glicosilação é geralmente alterada em comparação às células normais, sendo que algumas dessas modificações são marcadores na progressão dessa patologia. Essas alterações podem ser detectadas por lectinas, que auxiliam no reconhecimento e determinação das células tumorais, pois apresentam alta afinidade aos antígenos relacionados aos diversos tipos de tumores em seus estágios específicos (HASHIM et al., 2017).

Quando utilizadas como sondas na histoquímica podem caracterizar o tipo celular e o estágio de câncer (REGO et al., 2013; SOBRAL et al. 2010), por exemplo, foram isoladas em sementes de *Salvia bogotensis* e demonstraram afinidade por antígenos de células tumorais, podendo assim ser usadas em estudos imuno-histoquímicos e celulares (VEGA & PERES, 2006).

Devido às interações com glicoconjugados específicos, as lectinas geram grande interesse na pesquisa como agentes terapêuticos no combate ao câncer, principalmente, na ligação aos receptores de membrana de células cancerígenas, causando citotoxicidade, indução da apoptose, autofagia celular e inibição do crescimento tumoral (DE MEJIA & PRISECARU, 2005; HAMID et al., 2013, YAU et al, 2015; LAGARDA-DIAZ et al., 2017).

Lectinas isoladas de sementes de *Lotus corniculatus* resultaram em atividade anticarcinogênica (RAFIQ et al., 2013). As lectinas das espécies *Polygonatum odoratum* (OUYANG et al., 2014; WU et al. 2016), *Viscum álbum* (LI et al, 2011, MARVIBAIGI et al, 2014) e a concanavalina A (Con A)(LI et al., 2010; SHI et al., 2014) já foram descritas com

um grande potencial anticâncer. As lectinas dessas plantas afetam tanto a apoptose quanto a autofagia através da modulação de vias de sinalização representativa envolvidas na família Bcl-2, famílias de caspases, p53, PI3K / Akt, ERK, BNIP3, Ras-Raf e ATG, no câncer (JIANG et al., 2015).

Nos últimos anos foram relatadas diversas lectinas de plantas que demonstraram interessantes potenciais atividades carcinogênicas, dentre elas estão as lectinas PSA, e a lectina Eutirucalina. A lectina extraída da espécie *Pisum sativum* (PSA) ervilha, foi primeiramente isolada na década de 70 e era conhecida pela sua potente atividade mitogênica nos linfócitos humanos. EL-AASSAR et al. (2014) relataram seu efeito antitumoral contra as células de câncer hepático (HepG2), via apoptose, devido ao aumento da expressão gênica do P53. Recentemente, o efeito dessa lectina contra as células de câncer colorretal, também via apoptose, teve o mecanismo confirmado pela presença dos inibidores das caspases (ISLAM et al., 2018).

Uma característica interessante de diversas lectinas com atividade antitumoral é causar efeito citotóxico sobre as células malignas, mas serem inócuas para as células normais. Esse é o caso da Eutirucalina, uma lectina isolada do látex da espécie *Euphorbia tirucali*, que possui atividade antiproliferativa para células tumorais HeLa (cervical), PC3 (próstata), MCF-7 (mama), porém não é citotóxica para macrófagos e fibroblastos (PALHARINI et al, 2017).

Ainda existem pontos a serem estudados na utilização de lectinas na terapia anticâncer, principalmente utilizando abordagens genômicas e proteômicas visando pontos como a diminuição da toxicidade, aumento da exposição e melhoria da eficácia do tratamento (LAM & NG, 2011; FERNANDES, 2012).

### **1.6.2 Atividade Inseticida**

O desenvolvimento de plantas resistentes a pragas tem se mostrado um campo promissor para o uso de lectinas. Na agricultura, essas já foram testadas e obtiveram resultados promissores no combate a pragas em várias culturas (trigo, arroz, batata e tabaco) e a utilização de seus genes na produção de plantas transgênicas pode fornecer uma resistência específica a determinadas pragas (MCCAFFERTY et al., 2008; SÁ et al., 2009 KAUR et al., 2009, LAM & NG, 2010).

As lectinas já mostraram efeitos prejudiciais em todos os estágios de desenvolvimento dos insetos, desde larvas até adultos. Elas apresentam várias estratégias no controle de insetos, desde o aumento da mortalidade até o retardo no

desenvolvimento. Na maioria dos casos, esses efeitos são notados após alimentação de insetos adultos e larvas com sementes artificiais contendo lectinas ou com plantas transgênicas que superexpressam a lectina de interesse (MICHIELS et al., 2010). A ingestão dessas lectinas pelo inseto pode levar a diversos efeitos antinutricionais, influenciando diretamente na sobrevivência do mesmo, no peso larval, pupação e fecundidade (LAGARDA-DIAZ et al., 2008). Para que a lectina obtenha o efeito inseticida esperado, independente do mecanismo de sua interação com o inseto, esta não pode ser degradada por suas enzimas digestivas. Algumas lectinas possuem estabilidade em ampla faixa de pH resistindo à proteólise (ZHU-SALZMAN & SALZMAN, 2001; OLIVEIRA et al., 2011; LAGARDA-DIAZ et al., 2017).

Os mecanismos mais prováveis para a atividade inseticida dessas biomoléculas envolvem interações com diferentes glicoproteínas ou estruturas de glicanos nos insetos, o que pode interferir em vários processos fisiológicos nesses organismos. Por exemplo, exercem efeito tóxico por meio da ligação à membrana peritrófica (MP), ao gel peritrófico (GP) ou às vilosidades das células epiteliais (WALSKI et al., 2014). Em insetos não possuidores da MP, a ligação direta da lectina com os glicoconjugados do epitélio celular pode levar a um efeito inseticida (ROY et al., 2014).

O uso de lectinas em dietas artificiais ou sua expressão em plantas transgênicas mostrou-se eficaz em insetos pertencentes às ordens lepidóptera, coleóptera e hemíptera. Culturas transgênicas resistentes a insetos foram inicialmente comercializadas na década de 1990 com a introdução de plantas transgênicas nas culturas de milho, batata e algodão expressando genes que codificam a  $\delta$ -endotoxina inseticida de *Bacillus thuringiensis* (Bt; também conhecida como proteínas Cry). O uso dessa técnica obteve resultados muito positivos, visto que essas culturas passaram a ter resistência a insetos sugadores de seiva (VANDENBORRE et al., 2011).

A lectina GNA (aglutinina de *Galanthus nivalis*) tem recebido particular atenção devido aos seus efeitos tóxicos contra representantes da ordem hemíptera. Essa biomolécula em baixos níveis pode causar efeitos sistêmicos gerais como diminuição na sobrevivência, fecundidade e um atraso no desenvolvimento do inseto. Tais descobertas levaram à expressão da lectina em várias culturas de importância econômica, incluindo tabaco, batata, mamão, trigo, cana-de-açúcar e milho. Na maioria dos casos, a expressão da lectina forneceu alguma medida de controle contra os insetos que foram examinados (MACEDO et al., 2015).

Os diversos estudos realizados já demonstraram que as lectinas podem aumentar a mortalidade ou retardar o desenvolvimento dos insetos, justificando seu uso em

estratégias integradas no combate e controle de pragas (LAM & NG, 2010). Além disso, as lectinas com potencial inseticida podem ter um importante papel indireto no controle de doenças que utilizam insetos como vetores (transmissão) como no caso de alguns vírus, protozoários, fungos e bactérias (PEUMANS & VAN DAMME, 1995; DALVINA CORREIA DA SILVA, 2008).

### **1.6.3 Atividade Antimicrobiana**

As doenças infecciosas sempre foram a principal causa de mortalidade e morbidade nos humanos e animais. A descoberta e uso de antimicrobianos diminuiu significativamente esses índices (WHO, 2014). Mas o uso excessivo de antimicrobianos principalmente em práticas agrícolas, veterinárias e médicas tem colaborado para o surgimento de cepas de microrganismos resistentes às drogas conhecidas e causam infecções graves (NASCIMENTO et al., 2000; GOMES et al. 2013; YIM et al. 2013).

A ascensão desses microrganismos multirresistentes aos fármacos tem gerado enorme interesse no desenvolvimento de novas formas de inibir o crescimento ou eliminar esses patógenos. Uma maneira de conseguir isso é fazer uma triagem de novos compostos com esse potencial e um bom nicho para essa busca é a nossa biodiversidade, visto que boa parte dos antimicrobianos provem de vegetais, onde são extraídos de diversas partes das plantas como folhas, sementes frutos, cascas, caules e raízes (GOMES et al. 2013; CHAVASCO et al.; 2014; DIAS et al.; 2015).

Grande número de proteínas e peptídeos de ocorrência natural com capacidade antimicrobiana tem sido isolado de plantas, principalmente em sementes, rizomas e tubérculos, onde se acumulam em grandes quantidades e podem agir como uma fonte de reserva de aminoácidos e íons metálicos. Essas proteínas têm a capacidade de, por vários mecanismos, prejudicar diretamente o crescimento, a multiplicação e a disseminação de microrganismos (LEHRER & GANZ, 1999; NAWROT et al., 2014; ZHANG et al., 2016).

Devido ao fato de as lectinas endógenas vegetais executarem papéis fundamentais na imunologia das plantas, principalmente no combate a microrganismos nocivos, as torna potenciais candidatos às terapias medicamentosas (LARGADA-DIAZ et al. 2017). Muitas lectinas possuem a capacidade de impedir o crescimento de microrganismos e/ou serem agentes bactericidas ou fungicidas. Essas proteínas têm a capacidade de reconhecer seletivamente microrganismos que ocasionalmente podem causar doenças em animais ou plantas, sendo usadas como agentes antimicrobianos (SILVA et al., 2013).

Geralmente, a ação antimicrobiana das lectinas se dá por aglutinação e/ou imobilização dos microrganismos (LARGADA-DIAZ et al., 2017).

As células microbianas utilizam-se de um sistema de comunicação intracelular e interespecie que permite a regulação coletiva do seu comportamento em resposta a uma variedade de mecanismos como densidade e diversidade de espécies, esse processo é chamado de quorum sensing (QS). Esse mecanismo baseia-se na produção, liberação, detecção e resposta através de moléculas de sinalização chamadas auto-indutoras ou moléculas de QS. Os sistemas de QS já foram identificados em várias espécies de bactérias tanto Gram-negativas quanto Gram-positivas e em fungos de relevância clínica. Esses microrganismos utilizam o QS para regular a expressão de fatores de virulência, bioluminescência, enzimas, fatores tensoativos, pigmentos e etc. (HAWVER, et al., 2016; SILVA et al., 2016; PAPENFORT & BASLER, 2016). A interrupção do sistema de QS pode interferir na patogenicidade microbiana, essa abordagem é conhecida como terapia antivirulência e busca o bloqueio dos mecanismos de QS. Várias lectinas vegetais têm sido testadas com o intuito de perturbar a transdução do sinal do QS de células microbianas patogênicas e interferir diretamente nas funções não essenciais para viabilidade celular, mas inibir sua patogenicidade (DIXON & HALL, 2015; SILVA et al., 2016; JAYANTHI et al., 2017; COELHO et al., 2018).

A atividade antimicrobiana geralmente é medida pelo método de inibição em meio ágar (método de Bauer e Kirb), que além de resultados qualitativos, proporciona diversas vantagens como simplicidade, baixo custo e a possibilidade de testar grande número de microrganismos e agentes antimicrobianos, além da quantificação dos antimicrobianos, distinguindo seus efeitos entre bactericidas e bacteriostáticos (VELAYUTHAN et al., 2017; COELHO et al., 2018).

#### 1.6.3.1 Atividade Antifúngica

Apesar de muitas lectinas já terem sido comprovadas como possuidoras de atividade antimicrobiana em testes realizados *in vitro*, são necessários ensaios *in vivo* para determinar a eficácia terapêutica, aprimorar dosagens, biodisponibilidade e avaliar efeitos colaterais e reações adversas. A identificação dos mecanismos mais eficazes para utilização dessas terapias é um passo importante para estabelecer estratégias para aumentar a eficácia das formulações e ajudará a prever mecanismos de resistência microbiana (VAN HOLLE & VAN DAMME, 2018).

Apesar do grande número de lectinas purificadas, poucas apresentaram atividade antifúngica devido à dificuldade das lectinas se ligarem aos glico-conjugados e penetrar no citoplasma por causa da barreira imposta pela parede celular, isso torna a inibição direta de crescimento um fato improvável (LAGARDA-DIAZ et al. 2017). Porém, indiretamente a interação de lectinas com a parede celular de fungos (composta por quitina, glicanos e outros polímeros), podem afetar diretamente a sobrevivência e outras atividades fisiológicas desses microrganismos (WONG et al., 2010; LAGARDA-DIAZ et al. 2017). A ligação das lectinas com as hifas pode levar a má absorção de nutrientes, o que levaria a inibição de crescimento, também pode prejudicar a síntese e/ou deposição da quitina na parede celular, causar interferência direta na germinação e em outros processos fisiológicos resultando em atividade antifúngica. As lectinas também podem deixar os fungos mais vulneráveis a diferentes condições de stress (LAGARDA-DIAZ et al., 2017; LAM & NG, 2011; BHA et al. 2013; CHARUNGCHITRAK et al., 2011).

As quimerolectinas pertencentes a quitinase classe I, devido ao seu domínio catalítico, são o grupo de lectinas vegetais que mais apresentaram capacidade antifúngica (LAM & NG, 2010). Existem teorias que pequenas lectinas antifúngicas, como a heveína (4.7 kDa) e pouteina (14 kDa) podem penetrar na parede celular de fungos e atingir a membrana plasmática, onde podem bloquear os sítios ativos de enzimas envolvidas na morfogênese da parede celular (BOLETI et al., 2007).

O isolamento de lectinas de *Myracrodruon urundeva* (MUL) levou a descoberta da atividade antifúngica e bactericida contra agentes deteriorantes do cerne da mesma (SÁ et al. 2009). A atividade antifúngica também foi observada na lectina de sementes de *Talisia esculenta* (pitombeira) na qual a interação da lectina com as estruturas dos fungos *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum lindemuthianum* e *Saccharomyces cerevisiae* inibiu o crescimento dos mesmos (FREIRE et al., 2002). A lectina obtida da raiz da leguminosa *Bauhinia monandra* demonstrou atividade contra os fungos fitopatogênicos do gênero *Fusarium* (SOUZA et al., 2011).

### **1.6.3.2 Atividade Antibacteriana**

A atividade antibacteriana das lectinas é resultante da interação com uma ampla variedade de carboidratos complexos presentes na parede celular bacteriana, como é o caso da N-acetilglicosamina, ácido N-acetilmurâmico (MurNAc) e tetrapeptídeos ligados a MurNAc presentes na parede celular de bactérias gram-positivas ou de lipopolissacárideos presentes em paredes celulares de bactérias gram-negativas

(OLIVEIRA et al., 2008; HAMMID et al., 2013; LARGADA-DIAZ et al., 2017). Embora, essa ligação das lectinas com constituintes da parede celular bacteriana aconteça em ensaios *in vitro*, não existem garantias que sempre o mesmo aconteça *in vivo* (KARNCHANATAT, 2012).

A capacidade das lectinas em formar agregados com glicoconjugados microbianos pode bloquear os locais de interação bacteriana e prevenir infecções (CHARUNGCHITRAK et al., 2011). A interação entre a bactéria e a lectina pode levar a geração de poros na parede celular da bactéria resultando na sua morte devido ao extravasamento do conteúdo celular (PAIVA et al, 2010; DZIARSKI et al. 2000).

Estudos com lectinas como agentes antibacterianos não são novidades, em 1936 Sumner e Howell já haviam demonstrado a capacidade da lectina ConA em aglutinar espécies de *Actinomyces* e *Mycobacterium*. Em 1977, Hamada et al., constatou a aglutinação de 13 espécies de *Streptococcus mutans* pela lectina ConA em 15 espécies testadas. As lectinas de *Ricinus communis*, PNA e SBA aglutinaram espécies de *Neisseria gonorrhoeae* (SCHAEFER et al., 1979).

Um dos principais problemas no tratamento de infecções bacterianas é a formação do biofilme, uma comunidade microbiana complexa, relacionada a uma matriz extracelular feita por diversos glicanos. O biofilme pode proporcionar uma forma de resistência a antimicrobianos, pois ele impede a penetração do antibiótico para o seu interior, necessitando de dosagens imensamente maiores que nos tratamentos convencionais. Associado com 80% das infecções microbianas é uma causa significativa de morbidade e mortalidade. Na formação do biofilme, resíduos de carboidratos atuam como mediadores para a ligação entre microrganismo e substrato, então moléculas com a capacidade de se ligar especificamente a um carboidrato podem ser uma solução contra a formação de biofilmes bacterianos. Essa capacidade confere às lectinas um papel importante para investigação da estrutura glicídica desses polímeros de glicanos que as bactérias formam (CAVALCANTE, 2012; IORDACHE et al., 2015).

O estudo das lectinas contra os biofilmes tem como principal objetivo, boquear os locais de ligação da bactéria com a glicoproteína e/ou carboidrato, evitando assim a formação desses (CAVALCANTE et al., 2011; IORDACHE et al., 2015; WONGSUK et al., 2016). A interferência na formação do biofilme com o uso de lectinas foi descrita por Cavalcante et al. (2013) usando a *Canavalia marítima* (ConM) para tratamento em cepas de *S. mutans*, reduzindo a formação de biofilme e a resistência aos antimicrobianos.

Um estudo utilizando a microscopia eletrônica constatou que o tratamento com a lectina de *Araucaria angustifolia*, promoveu diversas alterações morfológicas como a

formação de poros na membrana plasmática de bactérias gram-positivas e a formação de bolhas na parede celular de bactérias gram-negativas (SANTI-GADELHA et al., 2012). As lectinas extraídas de cogumelos *Sparassis latifolia* mostrou atividade antibacteriana contra *E.coli* e cepas resistentes de *S.aureus* e *P. aeruginosa* (CHANDRASEKARAN et al. 2016). A lectina isolada de *Solanum tuberosum* demonstrou atividade antibacteriana contra *L.monocytogenes*, *E.coli* e *S.boydii* e impediu a formação de biofilme em *P. aeruginosa* (HASAN et al. 2014). A purificação de lectinas em sementes de *Apuleia leiocarpa* (ApulSL) mostrou efeitos bacteriostáticos contra estipes bacterianas Gram-positivas de *E. faecalis*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *S. aureus* e *S. pyogenes*, além de promover o mesmo efeito em estirpes Gram-negativas como *K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *X. campestres* e *S. enteritidis* (CARVALHO et al., 2015).

Uma nova lectina (EmaL), pertencente à família Myrtacea, de massa molecular de 14 kDa, foi isolada de *Eugenia malaccensis* usando cromatografia de afinidade Sephadex G-50. Foi detectado efeito antibacteriano da lectina EmaL no tratamento da cicatrização de feridas cutâneas em ratos, das cepas testadas os melhores resultados foram para o *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus* sp., mas demonstrou bom potencial para *Escherichia coli*, *Bacillus* sp., *Corynebacterium* sp., *Klebsiella* sp. e *Pseudomonas aeruginosa* (BRUSTEIN et al, 2012).

Oliveira (2008), obteve a lectina EuniSL em sementes de *Eugenia uniflora*, que demonstrou um grande efeito antibacteriano em de *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *Klebsiella* sp. com concentração inibitória mínima (CIM) de 1,5 µg/mL. e inibiu o crescimento de *B. subtilis*, *Streptococcus* sp. e *E. coli* com uma CIM de 16,5 µg/mL.

A lectina EuniSL também foi testada para os microrganismos *Klebsiella* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, e *Corynebacterium* sp., onde, inibiu fortemente os microrganismos, ao contrário do extrato bruto das sementes de *Eugenia uniflora*, que não apresentou atividade antimicrobiana, indicando que a EuniSL pode ser usada para terapia antibacteriana (OLIVEIRA, 2005). Diversos outros trabalhos têm contribuído para elucidar a atividade antibacteriana das lectinas (Quadro 1).

**Quadro 1-** Atividade antimicrobiana de lectinas

<b>Espécie</b>	<b>Microrganismo</b>	<b>Referência</b>
<i>Moringa oleifera</i>	<i>S. aureus; E. coli</i>	FERREIRA et al., 2011
<i>Halicondria okadaei</i>	<i>Bacillus megaterium; Bacillus subtilis</i>	KAWASAR et al., 2011
<i>Schinus terebinthifolius</i>	<i>E. coli, K. pneumoniae, P. mirabilis, P. aeruginosa, S. enteritidis, S. aureus</i>	GOMES et al. 2013
<i>Lablab purpureus</i>	<i>Salmonella typhi</i>	SAHA et al., 2014
<i>Litchi chinensis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BOSE et al., 2016
<i>Caliandra surinamensis</i>	<i>S. aureus, S. saprophyticus</i>	PROCOPIO et al. 2017
<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>S. aureus, S. mutants, P. aeruginosa, K. pneumoniae</i>	HAMMED et al., 2017

### 1.7 *Eugenia pyriformis*

A abundante biodiversidade da flora brasileira contém muitas plantas com potencial farmacológico, algumas já utilizadas medicinalmente. Porém, uma ampla gama de espécies vegetais ainda carece de estudos (SANTOS et al., 2009).

A família Myrtaceae Juss. pertence à ordem Myrtales que reúne aproximadamente 12 famílias, 130 gêneros e 4000 espécies. Distribuídas pelo mundo, em regiões de clima subtropical e tropical (LORENZI, 2006). Muitas dessas espécies já são utilizadas medicinalmente, das quais o gênero *Eugenia* tem grande destaque (SILVA et al, 2003; STIEVEN et al., 2009). Por exemplo, as folhas de *E. uniflora* e de *E. pyriformis* possuem flavonoides com propriedades inibitórias da xantina-oxidase atuando no tratamento da gota humana (SCHMEDA-HIRSCHMANN et al., 1987; THEODULOZ et al., 1988).

A *Eugenia pyriformis cambess* é uma espécie arbórea nativa da mata atlântica, apresenta na região sul do Brasil (RS até SP), Argentina e Paraguai. Conhecida popularmente como uvaia, uvaieira, uvaia-do-campo, uvalha e uvalha-do-campo produz frutos. Espécie arbórea muito valiosa pela sua madeira dura, resistente a doenças e seus frutos comestíveis, nutricionalmente importantes (LORENZI, 2000).

Diversos trabalhos foram realizados visando conhecer o potencial farmacológico da *Eugenia pyriformis*, dentre eles podemos citar: Stieven (2009) estudou óleos essenciais do fruto da uvaia, e notou que os mesmos possuíam grande atividade bacteriostática na maioria das bactérias analisadas; Chavasco et al (2014) trabalhou com extrato

hidroetanólico de sementes que inibiu o crescimento de 87% dos 15 microrganismos testados: *C. albicans*; *S. cerevisiae*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *M. luteus*, *E. faecalis*, *S. aureus*, *E. coli*, *S. marcescens*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, *S. typhimurium*, *E. cloacae* e Souza (2014), que obteve bons resultados com extrato bruto aquoso e frações do caule e folhas, para as cepas de *E. faecalis*, *C. albicans*, *C. krusei* e *C. Parapsilosis*, com Índice da Concentração Inibitória Fracionária (FICI) abaixo de 0,5.

A purificação e a comprovação da atividade antibacteriana de lectinas das sementes do gênero *Eugenia* desperta o interesse para testar novas espécies (Brunstein, et al, 2012; Oliveira et al, 2008). Devido a isso, nesse estudo usaremos a *Eugenia pyriformis*, uma árvore da região sul, que não possui estudos nos extratos aquosos das sementes e não apresenta lectinas descritas. A busca por novas lectinas justifica-se, pois mesmo quando esses compostos possuem sequências com alto grau de identidade, podem apresentar atividades biológicas muito diversas, tornando cada lectina uma potencial ferramenta biotecnológica.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Investigar o extrato bruto aquoso de sementes de *Eugenia pyriformis* visando isolamento e caracterização parcial da(s) lectina(s), como também avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos aquosos e frações.

### 2.2 Específicos

- Obtenção do extrato bruto salino das sementes de *Eugenia pyriformis*;
- Fracionamento do extrato bruto por precipitação com sulfato de amônio;
- Dosagem de proteínas das amostras pelo método de Bradford;
- Dosagem de fenóis pelo método de Folin-Ciocalteu;
- Determinação da atividade hemaglutinante (AH) das amostras nativas e desnaturadas termicamente;

- Determinação da especificidade ao(s) carboidrato(s) da(s) lectina(s) das amostras por meio de ensaios de inibição da atividade hemaglutinante;
- Detecção de atividade antibacteriana e antifúngica, em ensaios pelo método de disco-difusão de Bauer e Kirby.

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1 Coleta de material e Identificação**

A pesquisa foi desenvolvida na UFFS-Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus de Realeza-PR e UNIOESTE-Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Toledo-PR. O material vegetal (fruto, folha, flor e caule) da *Eugenia pyriformis* foi coletado em janeiro/2018 na cidade de Francisco Beltrão-PR. Após a coleta, ramos e flores foram levados ao herbário Real da UFFS-Realeza, houve a identificação da espécie onde está catalogada sob o número 444.

#### **3.2 Preparação da Farinha e Obtenção do Extrato Bruto (EB)**

Os frutos foram levados ao laboratório da UFFS/Realeza, onde as sementes foram separadas da polpa e secas à temperatura ambiente (25 °C) e posteriormente foram processadas para a obtenção da farinha.

Após processamento, 10 g da farinha de sementes foram adicionadas a 50 mL de tampão fosfato de sódio com NaCl, 0,15 M (PBS – *phosphate buffer saline*), a solução ficou em agitação lenta e refrigerada por 4 horas. A solução obtida foi filtrada com auxílio de gaze e algodão e centrifugada por 30 minutos a 5500 rpm. Retirou-se o sobrenadante da solução, sendo o mesmo denominado Extrato Bruto (EB).

#### **3.3 Fracionamento do Extrato Bruto por precipitação com sulfato de amônio**

Ao EB foi adicionado lentamente sulfato de amônio sólido até 40% de saturação, em agitação refrigerada contínua (5 °C) durante 4 horas. Posteriormente, foi realizada a centrifugação a 5500 rpm, durante 30 minutos. A fração precipitada foi ressuspensa em água (destilada e deionizada) e foi chamada de FP 0-40.

Ao sobrenadante (FP 0-40) foi adicionado sulfato de amônio até atingir 80% de saturação em agitação refrigerada contínua (5° C) durante 4 horas. Em seguida, conteúdo total foi filtrado e rotacionado em uma centrífuga Sigma 3-16L refrigerada a 10 °C, por 30 minutos a 10000 RPM. A fração precipitada foi ressuspensa em água (destilada e deionizada) e chamada de FP 40-80.

### **3.4 Diálise das Frações Precipitadas**

A diálise das frações precipitadas foi realizada para retirada do sulfato de amônio de todas as frações obtidas. As frações precipitadas (FP) foram colocadas em uma membrana filtrante YM 14.000 Dalton. A mesma foi embebida em água (destilada e deionizada) com agitação lenta, contínua e refrigerada durante 16 horas. As amostras obtidas da diálise das FP foram denominadas fração precipitada dialisada 0-40 (FPD 0-40) e fração precipitada dialisada 40-80 (FPD 40-80).

### **3.5 Detecção da atividade Hemaglutinante**

#### **3.5.1 Coleta do sangue**

O sangue utilizado foi proveniente de voluntários na UFFS/Realeza, onde foram coletados 5 mL de sangue dos tipos A+, AB+ e O+ em tubos de ensaios contendo 0,44 mg de citrato de sódio 0,15 mol/L e 0,16 mg de ácido cítrico 0,1 mol/L.

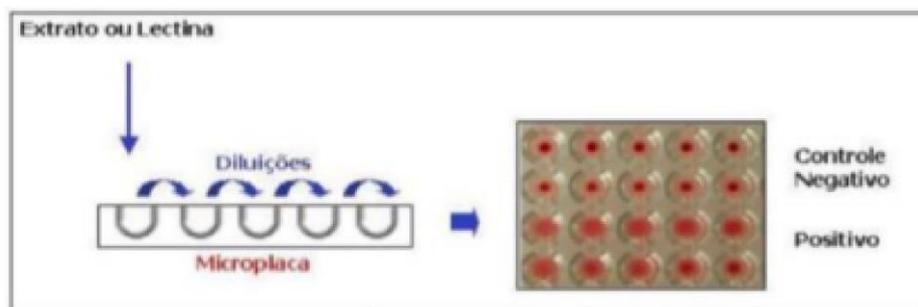
#### **3.5.2 Retirada do Plasma e Preparo do Concentrado de Hemácias a 2% (CH 2%)**

As hemácias foram lavadas com NaCl 0,15 M, por centrifugação a 3400 rpm, por 5-10 min para retirada do plasma e eritrócitos danificados. A operação foi realizada até que o sobrenadante ficasse límpido e as hemácias precipitadas foram diluídas em NaCl 0,15 M, a uma concentração de 2% (m/V).

#### **3.5.3 Determinação da Atividade Hemaglutinante (AH)**

A avaliação da atividade hemaglutinante do EB e das demais frações (FPD 0-40 e FPD 40-80) foi realizada com eritrócitos humanos do grupo ABO (A, AB e O). Esse ensaio foi realizado em microplacas de 96 poços, utilizando a diluição seriada das amostras

(PAIVA & COELHO, 1992; SILVA, 2016). Resumidamente, foram adicionados 50  $\mu$ L de NaCl 0,15 M em todos os poços de interesse. O primeiro poço da esquerda foi considerado o controle negativo (CN) e ao segundo poço foram adicionados 50  $\mu$ L da amostra, procedendo-se a diluição seriada, retirando-se 50  $\mu$ L a partir desse poço e adicionando-se ao poço seguinte, e assim sucessivamente (Figura 05). Desse modo obteve-se as amostras nas diluições de 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 até 1/2048 (títulos). Os testes foram realizados em duplicatas.



**Figura 5** – Teste de hemaglutinação, com um esquema representativo das diluições seriadas e uma foto da microplaca de titulação com resultados negativos e positivos.

A atividade hemaglutinante (AH, inverso do título) foi definida como a diluição de menor concentração das amostras que apresentou nítida aglutinação dos eritrócitos. A comparação entre esses valores permite avaliar qual o tipo sanguíneo apresenta maior especificidade para cada amostra. A atividade hemaglutinante específica (AHE), nas hemácias do tipo A, foi calculada pelo quociente entre AH e a concentração de proteínas (mg/mL) da amostra. Esses dados permitem comparar a concentração de lectinas em diferentes amostras.

Os ensaios de hemaglutinação também foram realizados nas amostras desnaturadas termicamente. Para o preparo dessas amostras, o EB e as frações foram incubados a 100 °C durante 30 min. Após o aquecimento, realizou-se a centrifugação a 5500 rpm, durante 5 min, para a retirada de possíveis precipitados. A atividade hemaglutinante das amostras desnaturadas foi realizada utilizando-se o mesmo procedimento das amostras nativas. Para fins de comparação, os ensaios com as amostras nativas e desnaturadas foram realizados simultaneamente.

### 3.5.4 Ensaios de especificidade aos carboidratos

A especificidade das lectinas aos carboidratos, geralmente é determinada pelo ensaio de inibição da hemaglutinação ou precipitação de glicoproteínas (RUDIGER & GABIUS, 2001). Desse modo, ensaios da atividade hemaglutinante (item 3.5.3) foram realizados na presença dos carboidratos D(+)galactose, D(+)glicose, D(+)maltose, D(+)manose, D(+) sacarose, D(+) ribose, D(+) fucose, D(+) arabinose, D(+) glicosamina, D(+) lactose monohidratada, D(+) galactosamina, N-acetil D-glicosamina, D(+) trealose di-hidratada, D(+) ramnose e D-(+)-raffinose penta-hidratada.

Os carboidratos foram diluídos em NaCl a 0,4 M para que, na diluição seriada obtivessem uma concentração de 0,2 M. Adicionou-se 50 µL de cada amostra a 50 µL de carboidratos (0,2 M), incubando por 30 min. Em seguida, uma suspensão de 50 µL de eritrócitos humanos do tipo A (2%) foi adicionada na placa de microtitulação e incubada por 1:30 h à temperatura ambiente (SILVA *et al.*, 2012). Dois controles negativos foram realizados, sendo o primeiro com 50 µL de NaCl 0,15 M e 50 µL de hemácias O e o segundo, 50 µL dos carboidratos (0,4 M) e 50 µL de hemácias A.

### 3.6 Dosagem de Proteínas

Para determinar a quantidade de proteínas presentes no EB e nas FPD foi utilizado o método de Bradford, baseado na interação entre o corante comassie brilliant blue G-250 e as macromoléculas das proteínas que contêm aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. A interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante provoca um deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica que passa a absorver em 595 nm em vez de 365 nm (BRADFORD, 1976, SPEROTTO, 2014).

#### 3.6.1 Preparo do Reagente de Bradford

Para preparar o reagente de Bradford utilizou-se respectivamente: 10 mg de *Coomassie brilliant blue* G-250 diluído em 5 mL de etanol 99,5%; 10 mL de ácido fosfórico 85% adicionado gota a gota sob agitação magnética; completou-se o volume até atingir 100 mL com água destilada e deionizada; a solução obtida passou 2 horas em agitação magnética constante à temperatura ambiente; procedeu-se filtração dupla utilizando papel-filtro quantitativo (whatman nº1); Manteve-se a solução em refrigeração ao abrigo de luz.

### 3.6.2 Curva Padrão BSA

A proteína albumina de soro bovino (BSA-*Bovine serum albumin*) foi utilizada como padrão na dosagem. Para a construção da curva foi utilizada uma solução estoque da proteína (1,0 mg/mL) em água destilada e, a partir desta, diluições foram realizadas com as concentrações finais de 0,1, 0,2, 0,4, 0,8 e 1,0 mg/mL de BSA. Em 100 µL de cada uma das concentrações de BSA acima citadas, foram adicionados 2,5 mL do reagente de Bradford, incubou-se por 5 min e agitou-se em vórtex. Em seguida, as absorbâncias foram determinadas a 595 nm no espectrofotômetro e a regressão linear desses dados forneceu a curva padrão para a dosagem. O branco foi preparado com 1,0 mL de reagente de Bradford e 100 µL de água destilada. Os ensaios foram realizados em duplicatas.

### 3.6.3 Concentração de Proteínas

Para determinar a concentração de proteínas das amostras adicionou-se 2,5 mL de reagente de Bradford à 100 µL das amostras (EB, FPD 0-40 e FPD 40-80), em duplicatas. Posteriormente, as concentrações de proteínas totais foram determinadas no espectrofotômetro, comparando a sua absorbância média em 595 nm com a curva padrão de BSA.

### 3.7 Dosagem de Fenóis

Para quantificar os fenóis presentes nas amostras foi utilizado o método de Folin Ciocalteu (ALVES & KUBOTA, 2013). Em um tubo de ensaio foram adicionados 0,5 mL da amostra, acompanhado de 2,5 mL de Folin Ciocalteu 10%.

Inicialmente construiu-se uma curva de calibração, reagindo-se o ácido gálico com o reagente de Folin Ciocalteu 10%. As concentrações utilizadas para o ácido gálico foram de 0,1, 0,125, 0,25, 0,5, 1 mg / ml preparadas partindo-se de uma solução estoque de 1 mg/mL. A leitura em espectrofotômetro foi feita no comprimento de onda de 740 nm, ainda utilizando um branco representado pela água (0,5 mL) acompanhado do reagente de Folin Ciocalteu (2,5 mL) para desconsiderar as interferências que podem influenciar a leitura. Os resultados foram expressos em mg equivalentes de ácido gálico (EAG) por grama de farinha das sementes de *E. pyrifomis* (mg EAG/g).

### 3.8 Ensaios Antimicrobianos por meio de testes de disco-difusão

O método de disco-difusão em ágar é um dos métodos mais confiáveis empregados na avaliação de potencial antimicrobiano. O teste fornece resultados qualitativos e seu princípio básico é a difusão de um composto antimicrobiano na superfície de um ágar a partir de um disco impregnado com o antimicrobiano em questão (ANVISA, 2018). Os ensaios foram realizados em amostras nativas e desnaturadas termicamente.

#### 3.8.1 Ensaios Antibacterianos

As cepas Gram Negativas utilizadas como microrganismos testes foram: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Shigella flexneri* NP 0122, *Escherichia coli* NP 0022, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella sp.*, *Morganella sp.*, *Serratia sp.* e *Proteus mirabilis*. E as Gram Positivas foram: *Staphylococcus aureus* Np 0023, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* B24, *Geobacillus stearothermophilus*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis* e *Bacillus cereus*.

O primeiro passo foi o preparo do inóculo das bactérias previamente cultivadas em ágar. Nesse preparo, as colônias foram transferidas para um tubo de ensaio contendo caldo nutriente e incubadas a 35 °C por 24 horas. A turbidez da cultura foi ajustada com solução salina estéril (NaCl 0,9%- 0,15M) até obter uma turbidez compatível com a solução padrão de McFarland a 0,5 (580 – 600 nm/ absorbância de 0,10 a 0,15, o correspondente a 1,5 x 10<sup>8</sup> UFC/mL). Para um ajuste mais refinado foi utilizado o espectrofotômetro.

Posteriormente, placas contendo ágar MH (Muller Hinton) foram inoculadas com a bactéria de interesse com auxílio de um swab estéril preenchendo toda superfície da placa. Nos discos brancos estéreis para antibiograma devem ser pipetados 5 µL das amostras a serem testadas (EB, FPD 0-40 e FPD 40-80). Cada disco contendo a fração foi colocado nas placas dispostas conforme padronizado pela ANVISA. Após 24 h de incubação, a 35 °C, os halos de inibição foram medidos (CLSI, 2009).

Os ensaios antibacterianos foram repetidos pela metodologia de disco-difusão, porém, após as amostras sofrerem desnaturação térmica (100 °C – 30 minutos). Após 24 horas foi realizada a leitura (CLSI, 2009).

### 3.8.2 Ensaio Antifúngico

Analogamente ao item anterior, os testes antifúngicos foram realizados por meio de disco-difusão, com a diferença que para os inóculos utilizaram-se fungos de interesse médico (*Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Cryptococcus gattii* WM178 e *Cryptococcus gattii* WM179) e a incubação da placa foi realizada em ágar Sauboraud Dextrose por 48 horas à temperatura de 28 °C.

#### 4. REFERÊNCIAS

- ALENCAR, N. M. N. et al. Anti-inflammatory and antimicrobial effect of lectin from *Lonchocarpus sericeus* seeds in an experimental rat model of infectious peritonitis. **Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 57, n. 7, p. 919-922, 2005a.
- ALENCAR, Veruska BM et al. Pro-inflammatory effect of *Arum maculatum* lectin and role of resident cells. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 37, n. 9, p. 1805-1814, 2005b.
- ALVES, Elizângela; KUBOTA, Ernesto Hashime. Conteúdo de fenólicos, flavonoides totais e atividade antioxidante de amostras de própolis comerciais. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 1, p. 37-41, 2013.
- ANVISA. **Agência nacional de vigilância sanitária**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/agencia>>. Acesso em: 10 Nov. 2018.
- ATTA-UR-RAHMAN, F. R. S. *Studies in natural products chemistry*. Elsevier, 2018.
- AZARKAN, Mohamed et al. Biochemical and structural characterization of a mannose binding jacalin-related lectin with two-sugar binding sites from pineapple (*Ananas comosus*) stem. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 11508, 2018.
- BAH, Clara Shui Fern; FANG, Evandro Fei; NG, Tzi Bun. Medicinal applications of plant lectins. In: **Antitumor Potential and other Emerging Medicinal Properties of Natural Compounds**. Springer, Dordrecht, 2013. p. 55-74.
- BALZARINI, Jan. Inhibition of HIV entry by carbohydrate-binding proteins. **Antiviral research**, v. 71, n. 2-3, p. 237-247, 2006.
- BERG, Jeremy M.; TYMOCZKO, John L.; STRYER, Lubert. Lectins are specific carbohydrate-binding proteins. *Biochemistry*, p. 1-3, 2002.
- BOLETI, Ana Paula de A. et al. Insecticidal and antifungal activity of a protein from *Pouteria torta* seeds with lectin-like properties. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, n. 7, p. 2653-2658, 2007.
- BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRUSTEIN, V. P. et al. A novel antimicrobial lectin from *Eugenia malaccensis* that stimulates cutaneous healing in mice model. **Inflammopharmacology**, v. 20, n. 6, p. 315-322, 2012.

CARVALHO, Aline de Souza et al. Purification, characterization and antibacterial potential of a lectin isolated from *Apuleia leiocarpa* seeds. **International journal of biological macromolecules**, v. 75, p. 402-408, 2015.

CAVALCANTE, Theodora Thays Arruda et al. A ConA-like lectin isolated from *Canavalia maritima* seeds alters the expression of genes related to virulence and biofilm formation in *Streptococcus mutans*. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 4, n. 12, p. 1073, 2013.

CAVALCANTE, Theodora Thays Arruda et al. Effect of lectins from Diocleinae subtribe against oral *Streptococci*. **Molecules**, v. 16, n. 5, p. 3530-3543, 2011.

CAVALCANTE, Theodora Thays Arruda. Avaliação do potencial antimicrobiano de lectinas e outras substâncias naturais frente a bactérias orais. 2012. 204 f. Tese (Doutorado em bioquímica) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, 2012.

CHANDRASEKARAN, Gayathri et al. Antibacterial and antifungal activities of lectin extracted from fruiting bodies of the Korean cauliflower medicinal mushroom, *Sparassis latifolia* (Agaricomycetes). **International journal of medicinal mushrooms**, v. 18, n. 4, 2016.

CHARUNGCHITRAK, Sarinya et al. Antifungal and antibacterial activities of lectin from the seeds of *Archidendron jiringa* Nielsen. **Food Chemistry**, v. 126, n. 3, p. 1025-1032, 2011.

CHAVASCO, Juliana Moscardini et al. Evaluation of antimicrobial and cytotoxic activities of plant extracts from southern Minas Gerais cerrado. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 1, p. 13-20, 2014.

CHU, K. T.; NG, T. B. Smilaxin, a novel protein with immunostimulatory, antiproliferative, and HIV-1-reverse transcriptase inhibitory activities from fresh *Smilax glabra* rhizomes. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 340, n. 1, p. 118-124, 2006.

Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 20th Informational Supplement**. CLSI document M100-S19. CLSI, Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standard Institute, 2009.

COELHO, Luana CBB; et al. Lectins as antimicrobial agents. **Journal of applied microbiology**, v. 125, n. 5, p. 1238-1252, 2018.

COELHO, Luana CBB; DA SILVA, Maria BR. Simple method to purify milligram quantities of the galactose-specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*. **Phytochemical Analysis: An**

**International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques**, v. 11, n. 5, p. 295-300, 2000.

COLLINS, Carol H.; BRAGA, Gilberto Leite; BONATO, Pierina Sueli. Fundamentos de cromatografia. 2006.

CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G. Lectins, carbohydrate recognition molecules: Are they toxic. **Recent trends in toxicology**, v. 37, p. 47-59, 2008.

CRUZ, D. R. R. Isolamento, purificação e caracterização parcial da lectina de folhas de Bauhinia cheilantha (Bongard) Steudel, nativa do bioma caatinga. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Vale do São Francisco, 2015.

DALVINA CORREIA DA SILVA, Michele. Aplicações biotecnológicas das lectinas ClaveLL (Cladonia verticillaris Lichen Lectin) E BmoLL (Bauhinia monandra Leaf Lectin). 2008.

DANHIER, Fabienne; FERON, Olivier; PRÉAT, Véronique. To exploit the tumor microenvironment: passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. **Journal of controlled release**, v. 148, n. 2, p. 135-146, 2010.

DE MEJÍA, Elvira González; PRISECARU, Valentin I. Lectins as bioactive plant proteins: a potential in cancer treatment. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 45, n. 6, p. 425-445, 2005.

DIAS, Renata et al. Insights into animal and plant lectins with antimicrobial activities. **Molecules**, v. 20, n. 1, p. 519-541, 2015.

DIXON, Emily F.; HALL, Rebecca A. Noisy neighbourhoods: quorum sensing in fungal-polymicrobial infections. **Cellular microbiology**, v. 17, n. 10, p. 1431-1441, 2015.

DZIARSKI, Roman; RASENICK, Mark M.; GUPTA, Dipika. Bacterial peptidoglycan binds to tubulin. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1524, n. 1, p. 17-26, 2000.

EL-AASSAR, M. R. et al. Microencapsulation of lectin anti-cancer agent and controlled release by alginate beads, biosafety approach. **International journal of biological macromolecules**, v. 69, p. 88-94, 2014.

FARIAS, Daniel Lima de et al. Isolamento, purificação e atividades biológicas de uma nova lectina de sementes de feijão da praia (Canavalia Maritima). 2013.

FERNANDES, Andreia Varmes et al. Caracterização bioquímica e avaliação da atividade antifúngica de lectinas de sementes de Fabaceae da Amazônia. 2012.

- FIGUEIREDO, A. Cristina; PEDRO, Luis G.; BARROSO, José G. Plantas aromáticas e medicinais-óleos essenciais e voláteis. **Revista da APH N.º**, v. 114, p. 30, 2014.
- FREIRE Maria das Graças et al. Isolation and partial characterization of a novel lectin from *Talisia esculenta* seeds that interferes with fungal growth. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 61-68, 2002.
- GABOR, Franz et al. The lectin–cell interaction and its implications to intestinal lectin-mediated drug delivery. **Advanced drug delivery reviews**, v. 56, n. 4, p. 459-480, 2004.
- GAIDAMASHVILI, Mariam et al. Characterization of the yam tuber storage proteins from *Dioscorea batatas* exhibiting unique lectin activities. *Journal of Biological Chemistry*, v. 279, n. 25, p. 26028-26035, 2004.
- GARCEZ, Fernanda R. et al. A diversidade dos constituintes químicos da flora de Mato Grosso do Sul e sua relevância como fonte de substâncias bioativas. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 1, p. 97-129, 2016.
- GAVROVIC-JANKULOVIC, Marija et al. A novel recombinantly produced banana lectin isoform is a valuable tool for glycoproteomics and a potent modulator of the proliferation response in CD3+, CD4+, and CD8+ populations of human PBMCs. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 40, n. 5, p. 929-941, 2008.
- GHAZARIAN, Haïke; IDONI, Brian; OPPENHEIMER, Steven B. A glycobiology review: carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. **Acta histochemica**, v. 113, n. 3, p. 236-247, 2011.
- GOLDSTEIN, Irwin J. Lectin Structure– Activity: The Story Is Never Over. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 50, n. 22, p. 6583-6585, 2002.
- GOMES, F. S. et al. Antimicrobial lectin from *S chinus terebinthifolius* leaf. **Journal of applied microbiology**, v. 114, n. 3, p. 672-679, 2013.
- GORAKSHAKAR, Ajit C.; GHOSH, Kanjaksha. Use of lectins in immunohematology. **Asian journal of transfusion science**, v. 10, n. 1, p. 12, 2016.
- HAMADA, Shigeyuki; GILL, Kamal; SLADE, Hutton D. Binding of lectins to *Streptococcus mutans* cells and type-specific polysaccharides, and effect on adherence. **Infection and immunity**, v. 18, n. 3, p. 708-716, 1977.
- HAMID, Rabia et al. Lectins: Proteins with diverse applications. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, v. 3, n. 4, p. S93-S103, 2013.

HASAN, Imtiaj; OZEKI, Yasuhiro; KABIR, Syed Rashel. Purification of a novel chitin-binding lectin with antimicrobial and antibiofilm activities from a Bangladeshi cultivar of potato (*Solanum tuberosum*). 2014.

HASHIM, Onn Haji; JAYAPALAN, Jaime Jacqueline; LEE, Cheng-Siang. Lectins: an effective tool for screening of potential cancer biomarkers. **PeerJ**, v. 5, p. e3784, 2017.

HAWVER, Lisa A.; JUNG, Sarah A.; NG, Wai-Leung. Specificity and complexity in bacterial quorum-sensing systems. **FEMS microbiology reviews**, v. 40, n. 5, p. 738-752, 2016.

IORDACHE, Florin et al. Antimicrobial and antiparasitic activity of lectins. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 152-161, 2015.

ISLAM, Farhadul et al. Pea lectin inhibits cell growth by inducing apoptosis in SW480 and SW48 cell lines. **International journal of biological macromolecules**, v. 117, p. 1050-1057, 2018.

JAYANTHI, Sangily et al. Purification, characterization and functional analysis of the immune molecule lectin from the haemolymph of blue swimmer crab *Portunus pelagicus* and their antibiofilm properties. **Fish & shellfish immunology**, v. 62, p. 227-237, 2017.

JIANG, Q.-L. et al. Plant lectins, from ancient sugar-binding proteins to emerging anti-cancer drugs in apoptosis and autophagy. **Cell proliferation**, v. 48, n. 1, p. 17-28, 2015.

JUNG, Eui Cha et al. A mushroom lectin from ascomycete *Cordyceps militaris*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1770, n. 5, p. 833-838, 2007.

KARNACHANATAT, A. Antimicrobial activity of lectins from antimicrobial activity of lectins from plants. **In Antimicrobial Agents**; Bobbarala, V., Ed.; InTech: Rijeka, Croatia, 2012; pp. 145–177.

KAUR, Amandeep et al. Isolation of an N-acetyl-D-glucosamine specific lectin from the rhizomes of *Arundo donax* with antiproliferative activity. **Phytochemistry**, v. 66, n. 16, p. 1933-1940, 2005.

KAUR, Manpreet et al. Anti-insect potential of lectins from *Arisaema* species towards *Bactrocera cucurbitae*. **J Environ Biol**, v. 30, n. 6, p. 1019-1023, 2009.

LAGARDA-DIAZ, Irlanda et al. Insecticidal action of PF2 lectin from *Olneya tesota* (Palo Fierro) against *Zabrotes subfasciatus* larvae and midgut glycoconjugate binding. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, n. 2, p. 689-694, 2008.

LAGARDA-DIAZ, Irlanda; GUZMAN-PARTIDA, Ana; VAZQUEZ-MORENO, Luz. Legume lectins: proteins with diverse applications. *International journal of molecular sciences*, v. 18, n. 6, p. 1242, 2017.

LAM, S. K.; NG, T. B. Isolation and characterization of a French bean hemagglutinin with antitumor, antifungal, and anti-HIV-1 reverse transcriptase activities and an exceptionally high yield. *Phytomedicine*, v. 17, n. 6, p. 457-462, 2010.

LAM, Sze Kwan; NG, Tzi Bun. Lectins: production and practical applications. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 89, n. 1, p. 45-55, 2011.

LANNOO, N.; VAN DAMME, E. J. **Nucleocytoplasmic plant lectins**. *Biochemistry and Biophysics Acta*, v.1800, p. 190–201, 2010.

LANNOO, Nausicaä; VAN DAMME, Els JM. Lectin domains at the frontiers of plant defense. **Frontiers in plant science**, v. 5, p. 397, 2014.

LEHRER, Robert I.; GANZ, Tomas. Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. **Current opinion in immunology**, v. 11, n. 1, p. 23-27, 1999.

LI, Chun-Yang et al. Concanavalin A, from an old protein to novel candidate anti-neoplastic drug. **Current molecular pharmacology**, v. 3, n. 3, p. 123-128, 2010.

LI, Lin-Na et al. Down-regulation of some miRNAs by degrading their precursors contributes to anti-cancer effect of mistletoe lectin-I. **British journal of pharmacology**, v. 162, n. 2, p. 349-364, 2011.

LI, Y. R. et al. A novel lectin with potent antitumor, mitogenic and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from the edible mushroom *Pleurotus citrinopileatus*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1780, n. 1, p. 51-57, 2008.

LIS, Halina; SHARON, Nathan. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. *Chemical reviews*, v. 98, n. 2, p. 637-674, 1998.

Lista de Espécies da Flora do Brasil (2015). Disponível em <http://dados.gov.br/dataset/floradobrasil>. Acesso em 23 de agosto de 2019.

TAN-WILSON, Anna L.; WILSON, Karl A. Mobilization of seed protein reserves. **Physiologia Plantarum**, v. 145, n. 1, p. 140-153, 2012.

LIU, Bo; BIAN, He-jiao; BAO, Jin-ku. Plant lectins: potential antineoplastic drugs from bench to clinic. *Cancer letters*, v. 287, n. 1, p. 1-12, 2010.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil [Brazilian Trees: manual for identification and cultivation of native tree plants in Brazil]. **Nova Odessa: Editora Plantarum (in portuguese)**, 2000.

LORENZI, Harri et al. Frutas brasileiras e exóticas cultivadas (de consumo in natura). **São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora**, v. 640, 2006.

LUZ, Luciana Andrade et al. Structural characterization of coagulant Moringa oleifera Lectin and its effect on hemostatic parameters. **International journal of biological macromolecules**, v. 58, p. 31-36, 2013.

MACEDO, Maria; OLIVEIRA, Caio; OLIVEIRA, Carolina. Insecticidal activity of plant lectins and potential application in crop protection. *Molecules*, v. 20, n. 2, p. 2014-2033, 2015.

MARVIBAIGI, Mohsen et al. Preclinical and clinical effects of mistletoe against breast cancer. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.

MCCAFFERTY, Heather RK; MOORE, Paul H.; ZHU, Yun J. Papaya transformed with the Galanthus nivalis GNA gene produces a biologically active lectin with spider mite control activity. **Plant science**, v. 175, n. 3, p. 385-393, 2008.

MICHIELS, Katrien; VAN DAMME, Els JM; SMAGGHE, Guy. Plant-insect interactions: what can we learn from plant lectins?. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America**, v. 73, n. 4, p. 193-212, 2010.

MOLCHANOVA, Valentina et al. A new lectin from the sea worm Serpula vermicularis: isolation, characterization and anti-HIV activity. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 145, n. 2, p. 184-193, 2007.

MOREIRA, R.A., SOUZA-CAVADA, B., J.T.A., AINOUIZ, I.L. Plants lectins in: **Proceeding on the First Brazilian Congress on Proteins. p. 71-96** ED. Unicamp, Campinas, 1991.

MORGAN, Doris Anne; RUSCETTI, Francis W.; GALLO, Robert. Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. **Science**, v. 193, n. 4257, p. 1007-1008, 1976.

MOVAFAGH, Abolfazl et al. Laboratory Use of Lectin Mitogens for Mitotic Stimulation of Human Lymphocytes. **Trends in Peptide and Protein Sciences**, v. 1, n. 2, p. 83-88, 2016.

NASCIMENTO, Gislene GF et al. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian journal of microbiology**, v. 31, n. 4, p. 247-256, 2000.

NAWROT, Robert et al. Plant antimicrobial peptides. **Folia microbiologica**, v. 59, n. 3, p. 181-196, 2014.

NAZZARO, Filomena et al. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals**, v. 6, n. 12, p. 1451-1474, 2013.

OLIVEIRA, Maria Danielly Lima de. **Caracterização físico-química e biológica da lectina de sementes de Eugenia uniflora L.** 2005. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.

OLIVEIRA, Caio Fernando Ramalho et al. Evaluation of seed coagulant Moringa oleifera lectin (cMoL) as a bioinsecticidal tool with potential for the control of insects. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 2, p. 498-504, 2011.

OLIVEIRA, M. D. L. et al. Purification of a lectin from Eugenia uniflora L. seeds and its potential antibacterial activity. **Letters in applied microbiology**, v. 46, n. 3, p. 371-376, 2008.

OUYANG, Liang et al. Polygonatum odoratum lectin induces apoptosis and autophagy via targeting EGFR-mediated Ras-Raf-MEK-ERK pathway in human MCF-7 breast cancer cells. **Phytomedicine**, v. 21, n. 12, p. 1658-1665, 2014.

PAIVA, P. M. G.; GOMES, F. S.; NAPOLEÃO, T. H.; SÁ, R. A.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B. Antimicrobial activity of secondary metabolites and lectins from plants. In: Antonio Mendez Vilas. (Org.). **Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**. : Formatex Research Center., 2010. 1:396-406

PAIVA, Patricia MG; COELHO, Luana CBB. Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (amarante bean). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 113-118, 1992.

PALHARINI, Julio G. et al. Eutirucallin: a lectin with antitumor and antimicrobial properties. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 7, p. 136, 2017.

PAPENFORT, Kai; BASSLER, Bonnie L. Quorum sensing signal–response systems in Gram-negative bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 9, p. 576, 2016.

PEUMANS, Willy J.; DAMME, Els JM Van. Plant lectins: versatile proteins with important perspectives in biotechnology. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 15, n. 1, p. 199-228, 1998.

PEUMANS, Willy J.; VAN DAMME, E. J. Lectins as plant defense proteins. **Plant physiology**, v. 109, n. 2, p. 347, 1995.

POHLEVEN, Jure et al. Bivalent Carbohydrate Binding Is Required for Biological Activity of *Clitocybe nebularis* Lectin (CNL), the N, N'-Diacetyllactosediamine (GalNAc $\beta$ 1-4GlcNAc, LacdiNAc)-specific Lectin from Basidiomycete *C. nebularis*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 13, p. 10602-10612, 2012.

POMPEU, Davia Guimaraes et al. Purification, partial characterization and antimicrobial activity of lectin from *Chenopodium quinoa* seeds. **Food Science and Technology**, v. 35, n. 4, p. 696-703, 2015.

PROCÓPIO, Thamara Figueiredo et al. CasuL: A new lectin isolated from *Calliandra surinamensis* leaf pinnulae with cytotoxicity to cancer cells, antimicrobial activity and antibiofilm effect. **International journal of biological macromolecules**, v. 98, p. 419-429, 2017.

RABINOVICH, Gabriel A. et al. Functions of cell surface galectin-glycoprotein lattices. **Current opinion in structural biology**, v. 17, n. 5, p. 513-520, 2007.

RAFIQ, Shaista et al. Isolation and antiproliferative activity of *Lotus corniculatus* lectin towards human tumour cell lines. **Phytomedicine**, v. 21, n. 1, p. 30-38, 2013.

RAMESHWARAM, Nagender Rao; NADIMPALLI, Siva Kumar. An efficient method for the purification and quantification of a galactose-specific lectin from vegetative tissues of *Dolichos lablab*. **Journal of Chromatography B**, v. 861, n. 2, p. 209-217, 2008.

RÊGO, Moacyr Jesus Barreto de Melo et al. Evaluation of WGA and Concanavalin A (Con A) lectin as biomarkers of hepatosplenic schistosomiasis in human biopsies with no evidence of egg-granuloma system. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 55, n. 3, p. 213-215, 2013.

ROY, Amit et al. Binding of insecticidal lectin *C. olocasia* esculenta tuber agglutinin (CEA) to midgut receptors of *B. emisia tabaci* and *L. ipaphis erysimi* provides clues to its insecticidal potential. **Proteomics**, v. 14, n. 13-14, p. 1646-1659, 2014.

RÜDIGER, Harold; GABIUS, Hans-J. Plant lectins: occurrence, biochemistry, functions and applications. **Glycoconjugate journal**, v. 18, n. 8, p. 589-613, 2001.

SÁ, Roberto A. et al. Antibacterial and antifungal activities of *Myracrodruon urundeuva* heartwood. **Wood Science and Technology**, v. 43, n. 1-2, p. 85-95, 2009.

PARISI, Mónica G.; MORENO, Silvia; FERNÁNDEZ, Graciela. Isolation and characterization of a dual function protein from *Allium sativum* bulbs which exhibits proteolytic and hemagglutinating activities. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 46, n. 4, p. 403-413, 2008.

PAULCHAMY, Ramaraj et al. A serine protease-associated lectin in the cytolytic system of blowfly (*Chrysomya megacephala*) larvae: Evidence and characterization. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, 2019.

SAHA, Repon Kumer et al. Antibacterial and Antioxidant Activities of a Food Lectin Isolated from the Seeds of Lablab purpureous. **American Journal of Ethnomedicine**, v. 1, n. 1, p. 008-017, 2014.

SANO, Kotone; OGAWA, Haruko. Hemagglutination (inhibition) assay. In: **Lectins**. Humana Press, New York, NY, 2014. p. 47-52.

SANTI-GADELHA, T. et al. Effects of a lectin-like protein isolated from *Acacia farnesiana* seeds on phytopathogenic bacterial strains and root-knot nematode. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 103, n. 1, p. 15-22, 2012.

SANTOS, Andrea FS et al. Isolation of a seed coagulant *Moringa oleifera* lectin. **Process biochemistry**, v. 44, n. 4, p. 504-508, 2009.

SANTOS, Andréa FS et al. Lectins: Function, structure, biological properties and potential applications. **Current topics in peptide & protein research**, v. 15, p. 41-62, 2014.

SCHAEFER, R. L.; KELLER, K. F.; DOYLE, R. J. Lectins in diagnostic microbiology: use of wheat germ agglutinin for laboratory identification of *Neisseria gonorrhoeae*. **Journal of clinical microbiology**, v. 10, n. 5, p. 669-672, 1979.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, Guillermo et al. Preliminary pharmacological studies on *Eugenia uniflora* leaves: xanthine oxidase inhibitory activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 21, n. 2, p. 183-186, 1987.

SHARMA, Arishya et al. Purification and characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris* cv.(Anasazi beans). **BioMed Research International**, v. 2009, 2009.

SHARON, N.; LIS, H. A Century of lectin research. **Trends in Biochemical Science**, v.12, 1988.

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

SHI, Zheng et al. Antitumor effects of concanavalin A and *Sophora flavescens* lectin in vitro and in vivo. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 35, n. 2, p. 248, 2014.

SILVA, Cristiana V. et al. Fracionamento e germinação de sementes de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess.-Myrtaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, n. 2, p. 213-221, 2003.

SILVA, Maria Cristina et al. Extração da lectina da folha de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e o efeito de cátions divalentes na atividade hemaglutinante. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 1, p. 103-107, 2010.

SILVA, José Dayvid Ferreira. **Purificação e caracterização de uma lectina antimicrobiana da raiz de *Portulaca elatior***. 2016. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.

SILVA, Laura Nunes et al. Plant natural products targeting bacterial virulence factors. **Chemical reviews**, v. 116, n. 16, p. 9162-9236, 2016.

SILVA, Mariana CC et al. Purification, primary structure and potential functions of a novel lectin from *Bauhinia forficata* seeds. **Process biochemistry**, v. 47, n. 7, p. 1049-1059, 2012.

SILVA, M. V. et al. A Caatinga e seu potencial biotecnológico. **Ed. Universitária da UFPE, Recife**, p. 43-45, 2013.

SINGH H, R. S.; TIWARY, A. K.; KENNEDY, J. F. Lectins: Sources, activities, and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 19, n. 2, p. 145-178, 1999.

SINGHA, Biswajit; ADHYA, Mausumi; CHATTERJEE, Bishnu P. Multivalent II [ $\beta$ -d-Galp-(1 $\rightarrow$  4)- $\beta$ -d-GlcpNAc] and T $\alpha$  [ $\beta$ -d-Galp-(1 $\rightarrow$  3)- $\alpha$ -d-GalpNAc] specific Moraceae family plant lectin from the seeds of *Ficus bengalensis* fruits. **Carbohydrate research**, v. 342, n. 8, p. 1034-1043, 2007.

SOBRAL, Ana Paula V. et al. ConA and UEA-I lectin histochemistry of parotid gland mucoepidermoid carcinoma. **Journal of oral science**, v. 52, n. 1, p. 49-54, 2010.

SOL, F.G.; NAGANO, C.S.; CAVADA, B.S.; SAMPAIO, A.H.; SANZ, L.; CALVETE, J.J. **Lectinas. Investigación y Ciencia**, v. 361, p. 58-67, 2006.

SOUZA, Angela Maria et al. In vitro effects of *Eugenia pyriformis* Cambess., Myrtaceae: Antimicrobial activity and synergistic interactions with Vancomycin and Fluconazole. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 8, n. 35, p. 862-867, 2014.

SOUZA, Jayra D. et al. A new *Bauhinia monandra* galactose-specific lectin purified in milligram quantities from secondary roots with antifungal and termiticidal activities. **International biodeterioration & biodegradation**, v. 65, n. 5, p. 696-702, 2011.

SPEROTTO, Raul Antonio. Protocolos e métodos de análise em laboratórios de biotecnologia agroalimentar e de saúde humana. **Lajeado: Editora Univates**, 2014.

STIEVEN, A. C.; MOREIRA, J. J. S.; SILVA, C. F. Óleos essenciais de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess): avaliação das atividades microbiana e antioxidante. **Eclética Química**, v. 34, n. 3, p. 7-16, 2009.

SUMNER, James B.; HOWELL, Stacey F. Identification of hemagglutinin of jack bean with concanavalin A. **Journal of Bacteriology**, v. 32, n. 2, p. 227, 1936.

TAKAHASHI, Keisuke G.; KURODA, Takuo; MUROGA, Kiyokuni. Purification and antibacterial characterization of a novel isoform of the Manila clam lectin (MCL-4) from the plasma of the

Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 150, n. 1, p. 45-52, 2008.

THAKUR, Atul et al. Purification and characterization of lectin from fruiting body of *Ganoderma lucidum*: Lectin from *Ganoderma lucidum*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1770, n. 9, p. 1404-1412, 2007.

THEODULOZ, Cristina et al. Xanthine oxidase inhibitory activity of Paraguayan Myrtaceae. **Journal of ethnopharmacology**, v. 24, n. 2-3, p. 179-183, 1988.

TRIGUEROS, Véronique et al. *Xerocomus chrysenteron* lectin: identification of a new pesticidal protein. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1621, n. 3, p. 292-298, 2003.

TRINDADE, Melissa Barbano; BELTRAMINI, Leila Maria. Purificação, caracterização e estudos estruturais de duas novas lectinas ligantes de quitina das sementes do gênero *Artocarpus*. 2005.

VAN DAMME, Els JM et al. Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v. 17, n. 6, p. 575-692, 1998.

VAN DAMME, Els JM et al. Cytoplasmic/nuclear plant lectins: a new story. **Trends in plant science**, v. 9, n. 10, p. 484-489, 2004.

VAN DAMME, Els JM; LANNOO, Nausicaa; PEUMANS, Willy J. Plant lectins. In: **Advances in botanical research**. Academic Press, 2008. p. 107-209.

VAN HOLLE, S. and VAN DAMME E.J.M. Signaling through plant lectins: modulation of plant immunity and beyond. **Biochem Soc Tran** 46, 217– 233, 2018.

VANDENBORRE, Gianni; SMAGGHE, Guy; VAN DAMME, Els JM. Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects. **Phytochemistry**, v. 72, n. 13, p. 1538-1550, 2011.

VEGA, Nohora; PÉREZ, Gerardo. Isolation and characterisation of a *Salvia bogotensis* seed lectin specific for the Tn antigen. **Phytochemistry**, v. 67, n. 4, p. 347-355, 2006.

VELAYUTHAM, Veeramani et al. Purification, characterization, and analysis of antibacterial activity of a serum lectin from the grub of rhinoceros beetle, *Oryctes rhinoceros*. **Process biochemistry**, v. 53, p. 232-244, 2017.

WALSKI, Tomasz; VAN DAMME, Els JM; SMAGGHE, Guy. Penetration through the peritrophic matrix is a key to lectin toxicity against *Tribolium castaneum*. **Journal of insect physiology**, v. 70, p. 94-101, 2014.

WÄLTI, Martin Andreas et al. Structural basis for chitotetraose coordination by CGL3, a novel galectin-related protein from *Coprinopsis cinerea*. **Journal of molecular biology**, v. 379, n. 1, p. 146-159, 2008.

WANG, H.; NG, T. B. A lectin with some unique characteristics from the samta tomato. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 44, n. 4, p. 181-185, 2006.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION)- **Public Health Importance of Antimicrobial Resistance**. Disponível em: [www.who.int/drugresistance/AMR\\_importance/en/](http://www.who.int/drugresistance/AMR_importance/en/). Acesso em: 15 Ago. 2018.

WONG, Jack H. et al. Proteins with antifungal properties and other medicinal applications from plants and mushrooms. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 87, n. 4, p. 1221-1235, 2010.

WONGSUK, Thanwa; PUMEESEAT, Potjaman; LUPLERTLOP, Natthanej. Fungal quorum sensing molecules: role in fungal morphogenesis and pathogenicity. **Journal of basic microbiology**, v. 56, n. 5, p. 440-447, 2016.

WORMALD, Mark R.; SHARON, Nathan. Carbohydrates and glycoconjugates: Progress in non-mammalian glycosylation, glycosyltransferases, invertebrate lectins and carbohydrate-carbohydrate interactions. 2004.

YAU, Tammy et al. Lectins with potential for anti-cancer therapy. **Molecules**, v. 20, n. 3, p. 3791-3810, 2015.

YIM, Nam-Hui et al. Screening of aqueous extracts of medicinal herbs for antimicrobial activity against oral bacteria. **Integrative medicine research**, v. 2, n. 1, p. 18-24, 2013.

ZHANG, Lin et al. Critical role of antimicrobial peptide cathelicidin for controlling helicobacter pylori survival and infection. **The Journal of Immunology**, v. 196, n. 4, p. 1799-1809, 2016.

ZHU-SALZMAN, Keyan; SALZMAN, Ron A. Functional mechanics of the plant defensive *Griffonia simplicifolia* lectin II: resistance to proteolysis is independent of glycoconjugate binding in the insect gut. **Journal of economic entomology**, v. 94, n. 5, p. 1280-1284, 2001.

## 5. ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO DA LECTINA DE SEMENTES DE *Eugenia pyriformis* E POTENCIAL ANTIMICROBIANO

Adriano Favero<sup>1,2</sup>; Rosemeire Aparecida da Silva de Lucca<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>*Centro de Ciências Aplicadas à Saúde, Unioeste, R. Maringá, 1200 – Vila Nova, Francisco Beltrão – PR, 85605-010 Francisco Beltrão, Paraná, Brasil;*

<sup>2</sup> UFFS-Universidade Federal da Fronteira Sul, Avenida Edmundo Gaievski, 1000, Rodovia BR 182 – Km 466 Cx Postal 253 Zona Rural, Realeza – PR, 85770-000

<sup>3</sup>*Centro de Engenharias e Ciências Exatas, Unioeste, R. da Faculdade, 645 – Jardim La Salle, Toledo – PR, 85903-000 Toledo, Paraná, Brasil.*

*roselucca@gmail.com*

**Palavras-chave:** antibacteriano; antifúngico; biotecnologia, Myrtacea; uvaia.

**Keywords:** antibacterial; antifungal; biotechnology; Myrtacea; uvaia.

Seção: Ciências Biológicas

## RESUMO

Lectinas são proteínas de origem não imune, que despertam interesse biotecnológico devido à sua capacidade de ligação seletiva e reversível aos carboidratos, mediando processos de reconhecimento celular. O objetivo deste trabalho foi extrair lectinas, caracterizá-las e avaliar o potencial antimicrobiano das sementes de *Eugenia pyriformis*. O extrato aquoso foi fracionado em duas saturações de sulfato de amônio (0-40% e 40-80%). Amostras foram dosadas em relação ao conteúdo fenólico e proteínas. A presença de lectinas e a sua especificidade aos carboidratos foram investigadas utilizando-se ensaios de hemaglutinação, em eritrócitos humanos. O potencial antimicrobiano foi avaliado em ensaios de discos de difusão. As dosagens revelaram baixo teor de proteínas e fenóis nas amostras. As atividades hemaglutinantes foram positivas em todas amostras, que aglutinaram preferencialmente o grupo A, o aumento da atividade específica na fração 40-80% revelou que a pré-purificação foi eficiente. O perfil de inibição dessa atividade pelos carboidratos galactose, galactosamina, lactose e arabinose sugere a presença de ao menos duas lectinas. Os testes antibacterianos mostraram halos de inibição em bactérias Gram Positivas (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* e *Enterococcus faecalis*), e Gram Negativas (*Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Serratia sp.* e *Klebsiella sp.*) demonstrando o potencial dessa espécie como antibiótico de amplo espectro.

## ABSTRACT

Lectins are proteins of non-immune origin, which arouse biotechnological interest due to their capacity of selective and reversible binding to carbohydrates, mediating processes of cell recognition. The objective of this work was to extract lectins, partially characterize them and evaluate the antimicrobial potential of *Eugenia pyriformis* seeds. The aqueous extract was fractionated in two saturations of ammonium sulfate (0-40% and 40-80%). Samples were measured in relation to phenolic content and proteins. The presence of lectins and their specificity to carbohydrates were investigated using hemagglutination assays in human erythrocytes. The antimicrobial potential was evaluated in diffusion disc assays. The dosages revealed low levels of proteins and phenols in the samples. The hemagglutinating activities were positive in all samples, which preferably grouped group A, the increase of the specified activity in the fraction 40-80% revealed that the pre-purification was efficient. The profile of inhibition of the activity by carbohydrates galactose, galactosamine, lactose and arabinose suggest the presence of at least two lectins. The antibacterial tests showed inhibition in Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* and *Enterococcus faecalis*), and Gram-negative (*Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Serratia sp.* and *Klebsiella sp.*) demonstrating the potential of this species as a broad-spectrum antibiotic.

## 1-Introdução

As lectinas são proteínas ou glicoproteínas de origem não imune que possuem a capacidade de se ligar seletiva e reversivelmente aos carboidratos e glicoproteínas sem alterar a suas estruturas glicosídicas, isto é, sem processá-los enzimaticamente (Lanno e Van Damme 2010; Lam e Ng 2011; Sheela Devi et al. 2013).

Altamente variáveis em suas sequências de aminoácidos, as lectinas são amplamente distribuídas nas mais variadas formas de vida, desde microrganismos até animais e plantas (Cavada et al. 2001; Saha et al. 2014). Elas ocorrem com mais abundância no reino vegetal, onde são detectadas e isoladas em diversas partes, como caule, folhas, frutos e principalmente sementes. As funções endógenas das lectinas, por exemplo, como proteínas de reserva e defesa, estão relacionadas com a localização dessas nos vegetais e com as propriedades de seus sítios ligantes de carboidratos (Lanno e Van Damme, 2014).

A aplicabilidade dessas biomoléculas nas áreas da saúde e biotecnologia decorre da sua capacidade de ligação específica aos carboidratos e glicoconjugados na superfície das células, atuando como mediadoras de processos de interação e reconhecimento celular dependente de carboidratos, dentre eles, alguns relacionados às patologias humanas, como infecções e metástase. De fato, quando isoladas, as lectinas vegetais apresentam ampla variedade de atividades biológicas, dentre elas, a ação inseticida (Macedo et al. 2015), mitogênica (Movafagh et al. 2016), antitumoral (Hashim et al. 2017), anti-inflamatória (Movafagh et al. 2016), antiviral (Hamid et al. 2013), antifúngica (Van Holle e Van Damme, 2018), e antibacteriana (Procopio et al. 2017).

As doenças infecciosas sempre foram a principal motivo de morbidade e mortalidade em animais e seres humanos. Os antimicrobianos foram responsáveis por conter consideravelmente esses números, porém, o uso indiscriminado desse artifício,

principalmente em procedimentos agrícolas, veterinários e médicos tem favorecido a emergência de cepas de microrganismos resistentes às drogas conhecidas e causam infecções graves (Nascimento et al. 2000; Gomes et al. 2013; Yim et al. 2013; Who 2014).

A função imunológica que as lectinas endógenas desempenham nos vegetais, principalmente no antagonismo a microrganismos patogênicos, tem levado a um crescente interesse na investigação do papel dessas proteínas na interação célula/patógeno, no desenvolvimento das infecções e no seu potencial antimicrobiano (Dias et al. 2015; Lagarda-Diaz et al. 2017; Breitenbach Barroso Coelho et al. 2018).

A abundante biodiversidade da flora brasileira traz consigo um grande potencial farmacológico pouco explorado, grande parte de seus representantes ainda não foram estudados (Santos et al. 2009). Dentre eles, a *Eugenia pyriformis cambess*, pertencente à família Myrtaceae, uma espécie nativa da região sul do Brasil, possui fruto amarelo, globoso e indeiscente, popularmente conhecido na região como uvaia (Lorenzi 2002; Felipe 2015). Essa espécie apresentou potencial antibiótico em óleos essenciais dos frutos (Stieven 2009) e nos extratos hidroalcoólicos das sementes (Chavasco et al. 2014). Avaliação do potencial antimicrobiano e investigação das lectinas não foram relatados para os extratos aquosos das sementes dessa espécie. Por outro lado, lectinas foram purificadas a partir de sementes de *Eugenia uniflora* (Oliveira 2008) e *E. malaccencis* (Brusntein et al. 2012).

O fato de a *Eugenia pyriformis* ser uma árvore nativa da região sul do Brasil, a carência de estudos de metabólitos primários dessa espécie e os relatos científicos desse gênero sobre seu potencial antibiótico, torna a espécie um grande alvo para pesquisas. O presente estudo teve por objetivo a detecção, o isolamento e a caracterização da lectina de sementes de *Eugenia pyriformis*. A lectina foi caracterizada em relação às especificidades de eritrócitos do sistema ABO humano e de ligação aos carboidratos. Adicionalmente, avaliou-se a presença de compostos antibacterianos e antifúngicos nos extratos e frações precipitadas das sementes dessa planta.

## **2-Material e Métodos**

### **2.1-Isolamento de Lectina**

Os frutos de *Eugenia pyriformis* foram coletados na região sudoeste do estado do Paraná. As sementes foram separadas da polpa e secas à temperatura ambiente para retirada completa da umidade e moídas em um micro-moinho para a obtenção da farinha. A farinha foi adicionada ao tampão fosfato salino (PBS - *phosphate buffer saline*), pH 7,4, na proporção 1/10 (m/v), sob agitação magnética em refrigerador durante 4 horas. O conteúdo total foi filtrado e rotacionado em uma centrífuga Sigma 3-16L refrigerada a 10 °C, por 30 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi precipitado fracionadamente com sulfato de amônio a 0-40% e 40-80% de saturação, em banho de gelo. As frações precipitadas foram dialisadas utilizando uma membrana filtrante YM 14 kDa com o objetivo de retirar o excesso de sulfato de amônio presente nas frações e recuperar a solubilidade das proteínas. Após diálise, as frações precipitadas foram denominadas FPD 0-40 e FPD 40-80 (FPD – Frações Precipitadas Dialisadas).

### **2.2-Dosagem do conteúdo proteico**

Para determinar a presença e a concentração de proteínas foi utilizado o método de Bradford, baseado na interação entre o corante comassie brilliant blue BG-250 (Sigma-Aldrich) e as macromoléculas das proteínas que contêm aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas (Bradford 1976; Sperotto 2014). A proteína albumina bovina sérica (BSA-*bovine serum albumin*) foi utilizada para a construção de uma curva padrão de

dosagem compreendendo o intervalo entre 0,1 – 1,0 mg/mL. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Evolution 201/220 UV-Vis – Thermo Scientific) a uma absorvância de 595 nm.

### **2.3-Determinação de Fenóis**

Para quantificar os fenóis presentes nas amostras foi utilizado o método de Folin-Ciocalteu (Singleton et al. 1999; Alves e Kubota 2013). Para uma curva de calibração foi utilizado o ácido gálico (100, 125, 250, 500 e 1000 µg/ml) e a leitura foi realizada em espectrofotômetro (Evolution 201/220 UV-Vis - Thermo Scientific) a uma absorvância de 740 nm.

### **2.4-Ensaio de Atividades hemaglutinantes**

A atividade hemaglutinante (AH) do extrato bruto e das frações precipitadas e dialisadas foram testadas em placas de microtitulação de 96 poços, fundo U, utilizando-se NaCl, 0,15 M, e hemácias humanas 2% (Correia et al, 2008). Resumidamente, as amostras (50 µL) foram submetidas a uma diluição de fator 2 em NaCl (50 µL), previamente pipetados na microplaca. Desse modo, as diluições das amostras variaram de 1/2 a 1/2048 (títulos). Em seguida, 50 µL da solução de hemácias 2% foram adicionados e realizou-se a incubação por 1 h, em temperatura ambiente. Os resultados foram visualizados macroscopicamente, o aparecimento de uma rede reticulada no fundo do poço da microplaca é a AH positiva, enquanto na ausência dessa atividade as hemácias precipitam-se na base. Os testes foram realizados em duplicatas e o mesmo procedimento foi aplicado em amostras desnaturadas termicamente (100 °C, 30 minutos) para a comprovação de que a AH era de origem proteica.

A atividade hemaglutinante (AH, inverso do título) foi definida como a diluição de menor concentração das amostras que apresentou nítida aglutinação dos eritrócitos. A comparação entre esses valores permite avaliar qual o tipo sanguíneo apresenta maior especificidade para cada amostra. A atividade hemaglutinante específica (AHE), nas hemácias do tipo A, foi calculada pelo quociente entre a AH e a concentração de proteínas (mg/mL) da amostra. Esses dados permitem traçar um comparativo entre a concentração de lectinas nas diferentes amostras.

## **2.5-Teste de especificidade a carboidratos**

A especificidade das lectinas a carboidratos, geralmente é determinada pelo ensaio de inibição da hemaglutinação de células ou precipitação de glicoproteínas (Rudger e Gabius 2001). Desse modo, os ensaios da atividade hemaglutinante das amostras (EB, FPD 0-40, FPD 40-80) foram realizados na presença dos carboidratos: D(+)-glicose, D(+)-fucose, D(+)-arabinose, D(+)-ribose, D(+)-manose, D(+)-galactose, D(+)-glicosamina, D(+)-lactose, D(+)-sacarose, D(+) trealose di-hidratada, N-acetil D-glicosamina, L-ramnose, D(+)-maltose, D(+)-galactosamina e D(+)-rafinose penta-hidratada, adquiridos da Sigma-Aldrich.

A metodologia utilizada é a descrita por Silva et al. (2012), e é semelhante aos ensaios de hemaglutinação com a diferença de que a diluição seriada (fator 2) das amostras (50 µL) é realizada com diversas soluções de carboidratos 0,4 M (50 µL), em NaCl, 0,15 M. Após a incubação de 30 minutos com os carboidratos, à temperatura ambiente, adicionou-se 50 µL de uma suspensão de hemácias 2% (grupo A). Os resultados das AHs foram observados após 1 h. Simultaneamente, foram realizados ensaios das amostras na ausência de carboidratos como um controle dessa atividade. Para efeitos de comparação foram calculadas as atividades hemaglutinantes específicas (AHE).

## 2.6-Culturas Microbianas

Os inóculos bacterianos foram cultivados em caldo Nutriente durante 24 horas a 37 °C. As cepas utilizadas como microrganismos testes foram os seguintes, Gram Negativos: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Shigella flexneri* NP 0122, *Escherichia coli* NP 0022, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella sp.*, *Morganella sp.*, *Serratia sp.* e *Proteus mirabilis*, as Gram Positivas foram: *Staphylococcus aureus* Np 0023, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* B24, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis* e *Bacillus cereus*.

Os fungos também foram cultivados em caldo Nutriente a 28 °C durante 48 horas. Para esse ensaio foram utilizados cepas das leveduras: *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Cryptococcus gattii* WM178 e *Cryptococcus gattii* WM179.

A turbidez da cultura foi ajustada com solução salina estéril (NaCl 0,9%- 0,15M) até obter uma turbidez compatível com a solução padrão de McFarland a 0,5 (580 – 600 nm/absorbância de 0,10 a 0,15, o correspondente a  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL). Os ajustes finos na absorbância foram realizados com o auxílio do espectrofotômetro.

## 2.7-Ensaio Antimicrobianos

Os ensaios foram realizados em triplicata através da metodologia de Kirby-Bauer (Bauer et al. 1966) ou método de difusão em disco. O teste fornece resultados qualitativos e seu princípio básico é a difusão de um composto antimicrobiano na superfície de um ágar a partir de um disco impregnado com o antimicrobiano em questão (Anvisa 2018).

Para as culturas bacterianas foram utilizadas placas contendo ágar MH (Muller-Hinton), as bactérias testadas foram inoculadas com auxílio de um swab estéril preenchendo toda superfície da placa. Nos discos brancos estéreis (6 mm) para antibiograma foram

pipetados 5 µL das amostras a serem testadas e os mesmos foram distribuídos na placa conforme padronizado pela ANVISA (CLSI 2009). Como controle foram utilizados discos de antibiograma comerciais de Amoxicilina 10 mcg (AMO 10), Ciprofloxacina 5 Mcg (CIP 5) e Penicilina G. 10 UI (PEN 10), pois os mesmos conferem o espectro de ação necessário as cepas bacterianas testadas. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C por 24 horas. A mesma metodologia foi aplicada para as culturas de fungos, porém, o meio utilizado para a metodologia foi o ágar Sauboraud Dextrose e as placas foram incubadas por de 24 a 48 horas, a 35 °C.

A atividade antimicrobiana foi avaliada através da média das medidas dos halos de inibição expressos em milímetros (mm).

Os ensaios antimicrobianos foram repetidos para os resultados positivos, utilizando a mesma metodologia (Kirby-Bauer), porém, desta vez após as amostras sofrerem desnaturação térmica (100 °C, 30 minutos).

### **3-Resultados e Discussão**

#### **3.1-Obtenção do Extrato Bruto (EB), FPD-0-40 e FPD-40-80**

A farinha das sementes trituradas da *Eugenia pyriformis* incubada com o tampão PBS, pH 7,4, resultou em 575 mL de extrato bruto (EB). A finalidade foi extrair os componentes polares presentes nas sementes, como proteínas e peptídeos, porém, alguns metabólitos secundários, tais como os fenóis (taninos, flavonoides), lipídeos e os pigmentos das sementes também podem ser extraídos em menor proporção.

Na sequência, o EB foi fracionado com sulfato de amônio em duas etapas: 0-40% e 40-80% de saturação. Este processo segrega as proteínas por solubilidade e polaridade,

facilitando a purificação. Os sais têm afinidade com as moléculas de água do meio, diminuindo a solubilidade das moléculas de proteínas, que tendem a interagir entre si formando precipitados. A quantidade de sal para que ocorra a precipitação varia conforme a proteína, sendo este método um frequente primeiro passo para a purificação.

Diversas pesquisas utilizam o fracionamento com sulfato de amônio para isolamento de lectinas. Como exemplos Siebra Paes Barreto (2007) com a purificação e caracterização da lectina da entrecasca da *Caesalpinia ferrea* var. *leiostachya* Benth (CfeBL), e Silva et al., (2012) na purificação da BfL, lectina extraída das sementes de *Bauhinia forficata*.

Na purificação das proteínas, a diálise mostrou-se um método essencial após o fracionamento, pois separou a fração precipitada das partículas menores que 14 kDa (como os sais, pequenos metabólitos e pigmentos) recuperando a solubilidade das proteínas. Nesse sentido, o processo de diálise das frações foi eficiente, visto que as todas as frações apresentaram características solúveis, com uma fase única. Após esse processo, obtiveram-se as frações precipitadas dialisadas nas saturações 0-40 (FPD 0-40) e 40-80 (FPD 40-80).

### **3.2-Dosagem de Proteínas e Fenóis**

O método utilizado para a extração, a precipitação e a diálise das proteínas nas 50 gramas de sementes da *E. pyrifomis* obteve 550 mg para o EB, valor quatro vezes superior aos 275 mg extraídos em 100 gramas de *Bauhinia cheilantha* por Cruz (2015). O total de proteína recuperada das sementes de *Eugenia pyrifomis* foi aproximadamente 1% da massa total das sementes, número relativamente pequeno, visto que em muitas sementes, esse valor pode chegar próximo a 10%.

Para as frações precipitadas dialisadas 0-40% e 40-80% obteve-se 55 e 66 mg após o processo de diálise, mostrando uma recuperação de aproximadamente 20% das proteínas do EB nas frações FPD. Pereira Junior (2014), obteve 2,39 mg/mL no extrato bruto da

semente de *Dioclea reflexa*, mas Cruz (2015) conseguiu apenas 0,55 mg/mL no extrato bruto de *Bauhinia cheilantha*, mostrando que a metodologia de extração utilizada para *E. pyriformis* foi parcialmente eficiente, alcançando aproximadamente 1,0 mg/mL no EB.

Os fenóis podem apresentar tanto atividade hemaglutinante quanto atividade antimicrobiana, por isso, é importante quantificá-los para evitar o mascaramento de resultados. As concentrações fenólicas de 71 mg no EB, valor aproximadamente dez vezes menor que de proteínas. Nas FPD 0-40% e 40-80% foi obtido 1,9 e 3,6 mg, respectivamente. Os valores obtidos, embora muito pequenos, podem ser responsáveis por uma pequena parcela da atividade hemaglutinante. Stieven (2009) não encontrou compostos fenólicos detectáveis nos, extrato etanólico e extrato aquoso de sementes de *E. pyriformis*.

### **3.3-Atividade hemaglutinante**

Os ensaios de atividade hemaglutinante são uma forma rápida e simples de detectar lectinas em amostras. O resultado de hemaglutinação positiva consiste na formação de uma rede reticulada no fundo do micropoço, enquanto a hemaglutinação negativa é a precipitação das hemácias em sua integridade.

A Figura 1 representa os resultados das atividades hemaglutinantes das amostras (EB, FPD 0-40, FPD 40-80) para cada tipo sanguíneo testado (A, AB e O). As amostras promoveram a aglutinação dos três tipos sanguíneos, não demonstrando especificidade para as hemácias humanas, porém notou-se uma maior afinidade pelo tipo A, evidenciada pelos seus maiores valores de atividade hemaglutinante (AH).

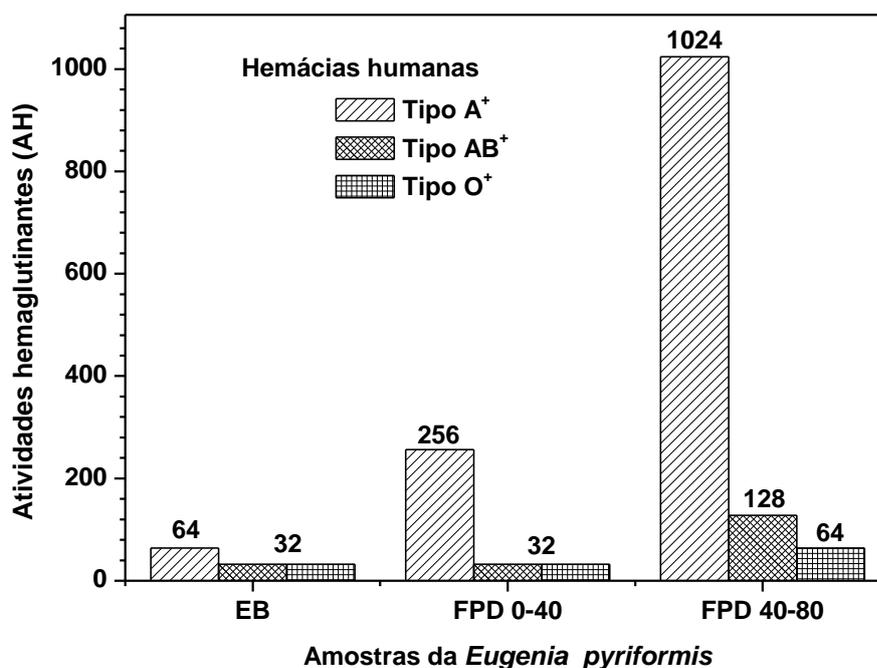


Figura 1 – Atividades hemaglutinantes das sementes da *Eugenia pyriformis* em hemácias humanas. As atividades do extrato bruto (EB) e das frações precipitadas e dialisadas 0-40% e 40-80% (FPD 0-40 e FPD 40-80), foram ensaiadas em hemácias 2%. A AH (inverso do título) é a diluição menos concentrada da amostra que apresentou aglutinação. Cada valor de AH é o resultado idêntico obtido dos ensaios em duplicatas.

Observa-se que para estas hemácias, a fração FPD 40-80 alcança AH de 1024, sendo oito vezes mais eficiente que nas hemácias tipo AB<sup>+</sup> (128 AH) e dezesseis vezes comparadas às do tipo O<sup>+</sup>. O teste sugere que existe a presença de lectinas em todas as frações.

Nas hemácias do tipo A, pode-se ordenar a atividade hemaglutinante na seguinte ordem decrescente: FPD 40-80 > FPD 0-40 > EB, sugerindo que as proteínas de interesse se encontram mais concentradas na FPD 40-80.

Além de lectinas, outros compostos presentes em extratos vegetais podem aglutinar hemácias, como os fenóis, por exemplo. Uma maneira de separar a aglutinação de lectinas, daquela promovida pelos metabólitos secundários, é realizando a desnaturação térmica das amostras para inibir a AH das proteínas. Após esse tratamento, verificou-se uma diminuição drástica dessa atividade para todas as amostras nos diversos tipos de eritrócitos (**Tabela 1**). Por exemplo, a AH da FPD 40-80 (hemácias tipo A<sup>+</sup>), diminuiu de um fator igual a 64 (1024 → 16 AH).

**Tabela 1** – Atividades hemaglutinantes das amostras nativas e desnaturadas da *E. pyriformis*

Amostras	Hemácias	AH <sup>a</sup>	AH
		(nativas)	(desnaturadas)
EB	A+	64	2
	AB+	32	2
	O+	32	2
FPD 0-40	A+	256	8
	AB+	32	4
	O+	32	2
FPD 40-80	A+	1024	16
	AB+	128	2
	O+	64	4

<sup>a</sup>Atividade hemaglutinante foi testada nas hemácias 2% do grupo ABO.

A atividade hemaglutinante residual verificada com as amostras desnaturadas sugere a presença de outros compostos com tal atividade. Uma alternativa seria a presença de mais de uma lectina, sendo uma delas termorresistente e em baixos níveis de concentração. Contudo, a detecção de fenóis, previamente estimados, mesmo em concentrações baixas, pode ser a responsável por essa hemaglutinação.

### 3.4-Atividade Hemaglutinante Específica (AHE)

Os cálculos da atividade específica auxiliam na avaliação a cada passo do isolamento proteico, a cada etapa é esperada uma diminuição da proteína total e o aumento da atividade específica. Após o fracionamento, notou-se que atividade hemaglutinante específica (AHE) foi levemente superior na FPD 0-40 em relação ao EB, essa atividade foi 4,4 vezes superior na FPD 40-80 indicando uma maior concentração de lectinas nessa fração, conforme verificado na **tabela 2**.

**Tabela 2** – Etapas do processo de pré - purificação do extrato bruto das sementes de *E. pyriformis*.

Fração	Proteínas [[mg/mL]	Proteínas (mg)	AH <sup>a</sup>	AHE <sup>b</sup> (AH/mg.mL <sup>-1</sup> )	AH <sup>c</sup> Total	FP <sup>d</sup>	RAH <sup>e</sup> (%)
EB	1,0	550	64	64	35.200	1	100
FPD 0-40	3,1	54	256	83	1.446	1,3	4,1
FPD 40-80	3,6	67	1024	284	5.286	4,4	15

<sup>a</sup>Atividade hemaglutinante – maior diluição que apresentou atividade nas hemácias 2% (A<sup>+</sup>).

<sup>b</sup> Atividade hemaglutinante específica – AH/(mg.mL<sup>-1</sup>)

<sup>c</sup> Atividade hemaglutinante total – AHE x volume (mL)

<sup>d</sup> Fator de Purificação (AHE (Fração)/AH EB)

<sup>e</sup> Recuperação da atividade hemaglutinante (AH Total (Fração)/ AH Total (EB) x 100)

O aumento da atividade específica das amostras sugere que a sequência do isolamento e pré-purificação foram eficientes, porém o rendimento da atividade hemaglutinante (RAH) foi de aproximadamente 20% da AHT é geralmente é considerado baixo para essa etapa. Essa característica dificulta a purificação, pois o rendimento diminui a cada passo do processo, necessitando-se de maiores quantidades de sementes para a sua conclusão.

### 3.6-Especificidade aos carboidratos

A especificidade da ligação das lectinas de *E. pyriformis* a carboidratos foi determinada por ensaios de inibição da atividade hemaglutinante por mono e oligossacarídeos. Trata-se de um método semiquantitativo e concede informações quanto à habilidade do carboidrato em inibir a atividade da lectina (Correia et al., 2008).

A **Tabela 3** compara as atividades hemaglutinantes específicas (AHE) das amostras incubadas com diversos carboidratos com um controle positivo. Os ensaios de inibição da AH demonstraram que de modo geral as lectinas das sementes de *E. pyriformis* possuem afinidade pela galactose, e também são inibidas pelos seus derivados, a galactosamina e a lactose, em menor grau. Em ordem decrescente, os fatores de diminuição para AHE na FPD 40-80 foram: galactose (130 x) > galactosamina (60 x) > lactose (16 x).

**Tabela 3** – Especificidade das lectinas da *E. pyriformis* aos carboidratos

Carboidratos <sup>c</sup> (0,2 M)	AHE <sup>a</sup> (AH/mg.mL <sup>-1</sup> )		
	EB	FPD 0-40	FPD 40-80
Controle <sup>b</sup>	512	661	569
D(+)-arabinose	32	661	35,5
D(+)-galactosamina	16	10	8,9
D(+)-galactose	8	5,2	4,4
D(+)-lactose	16	82,3	35,5

<sup>a</sup>Atividade hemaglutinante específica; <sup>b</sup> Controle – ensaios de hemaglutinação na ausência dos carboidratos; <sup>c</sup>Os carboidratos D(+)-glicose, D(+)-fucose, D(+)-ribose, D(+)-manose, D(+) glicosamina, D(+) sacarose, D(+) trealose, N-acetil D-glicosamina, L-ramnose, D(+) maltose e D-(+)-rafinose não inibiram a aglutinação dos eritrócitos e AHE das amostras foram iguais aos controles.

O monossacarídeo arabinose tem baixa afinidade pelo EB e pela fração FPD 40-80 pois diminui a AHE de um fator 16. Entretanto, não inibe a FPD 0-40, sugerindo a presença de duas lectinas nas sementes de *E. pyriformis*. Os demais carboidratos não apresentaram afinidade para as amostras, as quais mantiveram suas AHE inalteradas em relação ao controle.

Considerando os resultados da especificidade, as sementes da *E. pyriformis* contém duas lectinas, ao menos uma pertencente à família galactose/N-acetilgalactosamina (Gal/GalNAc).

A especificidade por galactose/N-acetil-galactosamina é comum nas lectinas vegetais, por exemplo, a jacalina, uma proteína antiviral e anti-inflamatória, extraída das sementes da *Artocarpus integrifolia*, considerada como modelo na classificação de uma família de lectinas (Van Damme et al, 1998). Outro exemplo é a lectina purificada da espécie *Morus alba*, MAL (Khurtsidze et al, 2017), que apresenta efeito similar ao hormônio do crescimento em plantas.

A afinidade entre a FPD 40-80 e o carboidrato arabinose, ainda que baixa, revelou uma propriedade rara, pois lectinas ligantes desse monossacarídeo não são comumente encontradas no reino vegetal. Elas são frequentemente isoladas de bactérias, como as lectinas da *Pseudomonas aeruginosa* e da *Ralstonia solanacearum* (Sudakevitz et al, 2002). As ocorrências em esponjas marinhas e cogumelos também são consideradas raras (Wang et al, 2005).

**Quadro 2: Especificidade a carboidratos das lectinas da *E. pyriformis*.**

Carboidratos	Amostras	AH	AHE (AH/mg.mL <sup>-1</sup> )
Controle	EB	512	512
	FPD 0-40	2048	661
	FPD 40-80	2048	569
D(+) galactose	EB	8	8
	FPD 0-40	16	5,2
	FPD 40-80	16	4,4
D(+) lactose Monohidratada	EB	16	16
	FPD 0-40	256	82,3
	FPD 40-80	128	35,5
D(+) galactosamina	FPD 0-40	32	10
	FPD 40-80	32	8,9
D(+) arabinose	EB	32	32
	FPD 0-40	2048	661
	FPD 40-80	128	35,5

As especificidades aos carboidratos encontradas nas lectinas das sementes de *Eugenia pyriformis* foram bem diferentes das encontradas para as espécies do mesmo gênero. A lectina EuniL, purificada das sementes de *E. uniflora*, teve sua atividade hemaglutinante inibida por glicoproteínas, como a caseína e a fetuína, porém não se ligou nem a mono ou oligossacarídeos (Oliveira et al, 2008). Por sua vez a lectina extraída das sementes da *E. malaccensis*, foi inibida por glicose, mas também por azocaseína e fetuína (Brusntein et al., 2012).

### 3.7-Ensaio Antimicrobianos

Poucas lectinas estudadas apresentaram atividade antifúngica devido à dificuldade de as lectinas se ligarem a glicoconjugados e penetrar no citoplasma por causa da barreira imposta pela parede celular, isso torna a inibição direta de crescimento um fato improvável (Lagarda-Diaz et al. 2017). Porém, as lectinas podem afetar indiretamente a sobrevivência e outras atividades fisiológicas pela sua interação com a parede celular de fungos que é composta por quitina, glicanos e outros polímeros (Wong et al. 2010; Lagarda-Diaz et al. 2017).

Os testes antifúngicos não apresentaram halo de inibição em nenhuma das cepas testadas, indicando que não existe atividade antifúngica para essas leveduras.

Diversas lectinas apresentam atividade antibacteriana comprovada, geralmente essa atividade é devido a interação da lectina com componentes da parede celular bacteriana, como é o caso da N-acetilglicosamina, ácido N-acetilmurâmico (MurNAc) e tetrapeptídeos ligados a MurNAc presentes na parede celular de bactérias gram-positivas ou de lipopolissacárideos (LPS) presentes em paredes celulares de bactérias gram-negativas (Klafke et al, 2013; Iordache et al. 2015). Nas bactérias Gram Negativas, que sofreram interferência no seu crescimento, tem em sua composição de LPS, um ou mais carboidratos para os quais as lectinas demonstraram afinidade (Pompeu et al. 2015).

Os resultados foram medidos pelos halos de inibição do crescimento bacteriano em torno de cada um dos discos de 6mm de diâmetro e expressos em termos de diâmetro de inibição: < 8mm, inativo; 8- 11 mm parcialmente ativo; 12- 17mm ativo; > 17 mm muito ativo (Alves et al. 2000). Os antibióticos utilizados como controle positivo foram escolhidos de forma a contemplar todas as cepas testadas e serviram como um indicativo para os resultados obtidos.

Os ensaios antibacterianos apresentaram atividade tanto em bactérias Gram Positivas (*S. aureus*, *S. úberes* e *E. faecalis*), quanto Gram Negativas (*E. coli*, *S. flexnerii*, *Serratia sp.* e *Klebsiella sp.*), o diâmetro dos halos de inibição apresentado no **Quadro 3**,

revela que as lectinas de *E. pyriformis* tem um amplo espectro de ação, atuando de forma não seletiva sobre muitos grupos de bactérias possivelmente patogênicas humanas. Para os resultados positivos, as amostras (EB e FPD) não apresentaram diferenças significativas entre os halos para as mesmas cepas. Por exemplo, a *Klebsiella sp.* os halos mostraram que as amostras foram todas ativas com um halo médio de 15 mm, o mesmo aconteceu com a *Serratia sp.* com um halo médio de 13 mm. As demais cepas testadas não demonstraram nenhuma atividade antibacteriana.

Para comprovação que a atividade antibacteriana tem origem proteica, os testes positivos foram repetidos após as amostras (EB e FPDs) sofrerem desnaturação térmica. Como resultado, houve uma total perda de atividade antimicrobiana. Os extratos vegetais comumente possuem dois tipos de proteínas que apresentam atividade antimicrobiana, as lectinas e os inibidores de proteases, que também estão envolvidos nos mecanismos de defesa das plantas (Paiva et al. 2014).

Em pesquisa realizada com o extrato aquoso de sementes de *Eugenia pyriformis*, Stieven (2009), também encontrou atividade antibacteriana para as cepas de *E. coli*, *S. aureus* e *E. faecalis*. Oliveira (2008), em trabalho realizado com lectinas de *Eugenia uniflora* (EuniL) também notou um amplo espectro de ação antibacteriana da lectina purificada, conseguindo inibir o crescimento de cepas tanto Gram Positivas (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sp.* e *Bacillus subtilis*), quanto Gram Negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella sp.*, *Corinebacterium sp.* e *Pseudomonas aeruginosa*).

**Quadro 3** – Medidas das médias dos halos de inibição da atividade antibacteriana das sementes de *E. pyriformis* bactérias Gram positivas e Gram negativas.

Microrganismo	Halo de inibição (mm)					
	EB	FPD 0-40	FPD 40-80	PEN 10	AMO10	CIP 5
<i>S. aureus</i> <sup>1</sup> <i>Np 0023</i>	14±2	13,5±1,5	12,5±2,5	30	34	-
<i>S. aureus</i> <sup>1</sup> <i>ATCC 25923</i>	13±1	12±2	9±1	24	32	26
<i>S. aureus</i> <sup>1</sup> <i>B24</i>	15,5±1,5	17	12	17	25	25
<i>Shigella flexneri</i> <i>NP 0122</i>	7	11,5±1,5	10	12	19	-
<i>E. coli</i> <sup>2</sup> <i>NP 0022</i>	7	9±1	8	-	20	30
<i>E. coli</i> <sup>2</sup> <i>ATCC 25922</i>	7,5±0,5	8,5±0,5	8,5±0,5	-	18	26
<i>Streptococcus</i> <i>uberis</i>	11±1	11,5±3,5	15,5±1,5	6	18	-
<i>Enterococcus</i> <i>faecalis</i>	13,5±1,5	12	10	10	26	32
<i>Klebsiella sp.</i>	14±2	13,5±1,5	16±1	12	24	30
<i>Serratia sp.</i>	12	14±2	12±2	20	26	35
<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa ATCC</i> <i>27853</i>	-	-	-	8	-	-
<i>Streptococcus</i> <i>agalactiae</i>	-	-	-	9	9,5± 0,5	23
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	12	-	-
<i>Streptococcus</i> <i>pyogenes</i>	-	-	-	12	10	30
<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	-	-	-	21±2
<i>Morganella sp.</i>	-	-	-	-	-	-

<sup>1</sup>*Staphylococcus aureus*, <sup>2</sup>*Escherichia coli*.

A lectina (EmaL), isolada de *Eugenia malaccensis* apresentou também um amplo espectro antibacteriano no tratamento da cicatrização de feridas cutâneas em ratos. Das cepas testadas, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sp.*, tiveram melhores resultados obtendo um MIC de 1,5 µg/ml e MBC de 15 µg/ml. A *Escherichia coli*, *Bacillus sp.*, *Corynebacterium sp.*, *Klebsiella sp.* e *Pseudomonas aeruginosa* também mostraram atividade bactericida com um MIC de 15 µg/ml e MBC de 150 µg/ml (Brustein et al., 2012).

O presente estudo demonstrou o potencial do extrato de *E. pyriformis* como uma importante ferramenta antimicrobiana e biotecnológica. Nesse sentido é crucial a purificação dessas lectinas para a sua caracterização biológica, físico-química e estrutural. Pesquisas

futuras da aplicação de lectinas de plantas podem ser de grande importância para microbiologia clínica, além das possíveis aplicações terapêuticas

#### 4-Referências

ALVES, T. M. D. A. et al., (2000). Biological screening of Brazilian medicinal plants. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95(3), 367-373.

ALVES E, KUBOTA, E. 2013. Conteúdo de fenólicos, flavonoides totais e atividade antioxidante de amostras de própolis comerciais. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 34, n. 1, p. 37-41.

ANVISA. Agência nacional de vigilância sanitária. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/agencia>>. Acesso em: 10 Nov. 2018.

ARCOVERDE, J. H. V., Carvalho, A. D. S., de Almeida Neves, F. P., Dionízio, B. P., Pontual, E. V., Paiva, P. M. G., ... & Carneiro-da-Cunha, M. D. G. (2014). Screening of Caatinga plants as sources of lectins and trypsin inhibitors. *Natural product research*, 28(16), 1297-1301.

BAUER A W. et al. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American journal of clinical pathology*, v. 45, n. 4\_ts, p. 493-496.

BRADFORD, Marion M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, v. 72, n. 1-2, p. 248-254.

BREITENBACH BARROSO COELHO L. C. et al. 2018. Lectins as antimicrobial agents. *Journal of applied microbiology*, v. 125, n. 5, p. 1238-1252.

BRUSTEIN V P et al. 2012. A novel antimicrobial lectin from *Eugenia malaccensis* that stimulates cutaneous healing in mice model. *Inflammopharmacology*, v. 20, n. 6, p. 315-322.

CAVADA B S, BARBOSA T, ARRUDA S, GRANGEIRO T B, BARRAL NETTO M. 2001. Revisiting proteus: Do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potencial biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins. *Current Protein and Peptide Sciences*, v. 2, p. 123-135.

Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). 2009. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 20th Informational Supplement. CLSI document M100-S19. CLSI, Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standard Institute.

CORREIA M T S, COELHO, L C B B, PAIVA P M G. 2008. Lectins, carbohydrate recognition molecules: Are they toxic. *Recent trends in toxicology*, v. 37, p. 47-59.

DIAS R. et al. 2015. Insights into animal and plant lectins with antimicrobial activities. *Molecules*, v. 20, n. 1, p. 519-541.

FELIPHE B H. 2015. Isolamento e seleção de fungos endofíticos produtores de compostos bioativos associados à *Eugenia pyriformis* (Myrtaceae). Alfenas/MG, 80 f.

GOMES F S et al. 2013. Antimicrobial lectin from *S chinus terebinthifolius* leaf. *Journal of applied microbiology*, v. 114, n. 3, p. 672-679.

HAMID R et al. 2013. Lectins: Proteins with diverse applications. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, v. 3, n. 4, p. S93-S103.

HASHIM O H, JAYAPALAN J J, LEE C. 2017. Lectins: an effective tool for screening of potential cancer biomarkers. *PeerJ*, v. 5, p. e3784.

IORDACHE F et al. 2015. Antimicrobial and antiparasitic activity of lectins. *Current pharmaceutical biotechnology*, v. 16, n. 2, p. 152-161.

KHURTSIDZE E et al. 2017. Galactose-binding lectin from mulberry (*Morus alba* L.) seeds with growth hormone-like activity. *Annals of Agrarian Science*, v. 15, n. 1, p. 26-30.

KLAFKE G B et al. 2013. Inhibition of initial adhesion of oral bacteria through a lectin from *Bauhinia variegata* L. var. *variegata* expressed in *Escherichia coli*. *Journal of applied microbiology*, v. 115, n. 5, p. 1222-1230.

LAGARDA-DIAZ I, GUZMAN-PARTIDA A, VAZQUEZ-MORENO L. 2017. Legume lectins: proteins with diverse applications. *International journal of molecular sciences*, v. 18, n. 6, p. 1242.

LAM S K, NG T B. 2011. Lectins: production and practical applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 89: 45-55.

LANNOO N, VAN DAMME E J. 2010. Nucleocytoplasmic plant lectins. *Biochemistry and Biophysics Acta*, v.1800, p. 190–201.

LORENZI H. 2002. *Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Nova Odessa: Instituto Plantarum.

MACEDO M, OLIVEIRA C, OLIVEIRA C. 2015. Insecticidal activity of plant lectins and potential application in crop protection. *Molecules*, v. 20, n. 2, p. 2014-2033.

MOVAFAGH A et al. 2016. Laboratory Use of Lectin Mitogens for Mitotic Stimulation of Human Lymphocytes. *Trends in Peptide and Protein Sciences*, v. 1, n. 2, p. 83-88.

NASCIMENTO G G F et al. 2000. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Brazilian journal of microbiology*, v. 31, n. 4, p. 247-256.

OLIVEIRA M D L et al. 2008. Purification of a lectin from *Eugenia uniflora* L. seeds and its potential antibacterial activity. *Letters in applied microbiology*, v. 46, n. 3, p. 371-376.

POMPEU, D et al. 2015. Purification, partial characterization and antimicrobial activity of lectin from *Chenopodium quinoa* seeds. **Food Science and Technology**, v. 35, n. 4, p. 696-703.

PROCÓPIO T F et al. 2017. CasuL: A new lectin isolated from *Calliandra surinamensis* leaf pinnulae with cytotoxicity to cancer cells, antimicrobial activity and antibiofilm effect. *International journal of biological macromolecules*, v. 98, p. 419-429.

- SAHA R K et al. 2014. Antibacterial and Antioxidant Activities of a Food Lectin Isolated from the Seeds of *Lablab purpureus*. *American Journal of Ethnomedicine*, v. 1, n. 1, p. 008-017.
- SANTOS A F S, LUZ L A, ARGOLO A C C, TEIXEIRA J A, PAIVA P M G, COELHO L C B. B. 2009. Isolation of a seed coagulant *Moringa oleifera* lectin. *Process Biochemistry*, 44: 504–508.
- SHARON N, LIS H. 2004. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*, v.14, n. 11, p. 53R – 62R.
- SHEELA DEVI S, DHANALAKSHMI J, SELVI S. 2013. Antibacterial and antifungal activity of lectin from seeds of *Pongamia glabra*. *Int. J. Curr. Biotech*, v. 1, n. 8, p. 10-14.
- SIEBRA PAES BARRETO R. 2007. Purificação e Caracterização Parcial de uma Lectina da entrecasca da *Caesalpinia ferrea* var. *leiostachya* Benth. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.
- SILVA M C C et al. 2012. Purification, primary structure and potential functions of a novel lectin from *Bauhinia forficata* seeds. *Process biochemistry*, v. 47, n. 7, p. 1049-1059.
- SINGLETON V L, ORTHOFER R, LAMUELA-RAVENTÓS R M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In: *Methods in enzymology*. Academic press, p. 152-178.
- SPEROTTO R A. 2014. Protocolos e métodos de análise em laboratórios de biotecnologia agroalimentar e de saúde humana. Lajeado: Editora Univates.
- STIEVEN A C, MOREIRA J J S, SILVA C F. 2009. Óleos essenciais de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess): avaliação das atividades microbiana e antioxidante. *Eclética Química*, v. 34, n. 3, p. 7-16.
- SUDAKEVITZ D, IMBERTY A, GILBOA-GARBER N. 2002. Production, properties and specificity of a new bacterial L-fucose-and D-arabinose-binding lectin of the plant aggressive pathogen

Ralstonia solanacearum, and its comparison to related plant and microbial lectins. The Journal of Biochemistry, v. 132, n. 2, p. 353-358.

VAN HOLLE S and VAN DAMME E J M. 2018. Signaling through plant lectins: modulation of plant immunity and beyond. Biochem Soc Tran 46, 217– 233.

WANG H, NG T B. 2005. First report of an arabinose-specific fungal lectin. Biochemical and biophysical research communications, v. 337, n. 2, p. 621-625.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION)- Public Health Importance of Antimicrobial Resistance. Disponível em: [www.who.int/drugresistance/AMR\\_importance/en/](http://www.who.int/drugresistance/AMR_importance/en/). Acesso em: 15 Ago. 2018.

WONG J H et al. 2010. Proteins with antifungal properties and other medicinal applications from plants and mushrooms. Applied microbiology and biotechnology, v. 87, n. 4, p. 1221-1235.

YIM N et al. 2013. Screening of aqueous extracts of medicinal herbs for antimicrobial activity against oral bacteria. Integrative medicine research, v. 2, n. 1, p. 18-24.

