



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



JOSIVAN BARBOSA DE FARIAS

**AVALIAÇÃO DAS INTERAÇÕES BIOLÓGICAS POR ELETROQUÍMICA ENTRE
BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS E LECTINA GALACTOSE ESPECÍFICA (BmoLL)
ISOLADOS DE FOLHAS DE *Bauhinia monandra* Kurz.**

Recife

2022

JOSIVAN BARBOSA DE FARIAS

**AVALIAÇÃO DAS INTERAÇÕES BIOLÓGICAS POR ELETROQUÍMICA ENTRE
BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS E LECTINA GALACTOSE ESPECÍFICA (BmoLL)
ISOLADOS DE FOLHAS DE *Bauhinia monandra* Kurz.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Sistemas Biológicos.

Orientador (a): Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho, M.Sc., PhD.

Recife

2022

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB4/1788

Farias, Josivan Barbosa

Avaliação das interações biológicas por eletroquímicas entre bactérias endofíticas e lectina galactose específica (BmoLL) isolado de folhas de *Bauhinia monandra* Kurz / Josivan Barbosa Farias. – 2022.

84 f. : il.

Orientadora: Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.
Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Ciências
Biológicas, Recife, 2022.
Inclui referências.

1. Bactérias. 2. Lectinas. 3. Plantas. I. Coelho, Luana Cassandra
Breitenbach Barroso (orientadora) II. Título.

579.3

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2022-131

JOSIVAN BARBOSA DE FARIAS

**AVALIAÇÃO DE INTERAÇÕES BIOLÓGICAS POR ELETROQUÍMICA ENTRE
BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS E LECTINA GALACTOSE ESPECÍFICA (BmoLL)
ISOLADOS DE FOLHAS DE *Bauhinia monandra* Kurz.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 28/01/2022

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Luana Cassandra Breitembach Barroso Coelho (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. André de Lima Aires (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Hallyson Douglas Andrade de Araújo (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Emmanuel Viana Pontual (Suplente Interno)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Profa. Dra. Sandra Rodrigues de Souza (Suplente Externo)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dedico esta dissertação de mestrado a meu Pai Euclides *in memoriam* e a minha Mãe Eunice.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pelo dom da vida e por todas bênçãos alcançadas até aqui. A minha querida Mãe **Eunice Barbosa** por todo apoio e palavras de conforto no decorrer de toda minha trajetória, não só no mestrado, mas em toda minha vida. A meu querido pai **Euclides Alves**, que onde quer que esteja, sei que está muito orgulhoso da pessoa que me tornei e venho me tornando. Agradeço também a minha **família**, principalmente meus **irmãos** e aqueles que sempre torceram por mim, mas em especial a minhas irmãs **Joseli, Josilene** e primo **Aldair** por todas conversas e apoio nos momentos mais difíceis.

A Professora Dra. **Luana C. B. B. Coelho**, pela oportunidade desde o primeiro contato pelo qual aceitou me orientar e todo conhecimento construído no decorrer de minha atuação como mestrando, principalmente dos conselhos pessoais e científicos.

Ao **Centro Acadêmico de Vitória (CAV/UFPE)**, em especial ao **Laboratório de Bromatologia e Microbiologia dos alimentos**, pela oportunidade de executar boa parte de minha pesquisa. O CAV foi minha segunda casa na graduação e no mestrado não foi diferente. Ao Dr. **Sílvio Assis**, este que foi meu braço direito na execução dos experimentos, sou muito grato pela amizade construída e de toda ajuda.

Agradeço a todos meus amigos que me apoiaram e torceram por mim, principalmente nos momentos mais difíceis. Vai meu agradecimento em especial para a **Andreza, Klayton e Isabelle** que convive comigo desde a graduação e a **Elistássio, Mayara, Mavylla, Lucas Lima, Bruno, José Emerson, Shirleyde (Fany), Danny, Suzana, Leide, Jazielle, Francielly, Tamires, Tatyane**, dentre outros pela amizade, carinho e apoio.

Agradeço à **Coordenação do Programa de Pós Graduação em Ciências biológicas**, aos professores pelo conhecimento construído, e a **Adenilda** por toda atenção e paciência.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (**CAPES**), pela bolsa concedida e auxílio financeiro para execução da pesquisa.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

(José de Alencar).

RESUMO

A espécie vegetal *Bauhinia monandra* Kurz., pertencente à família das *Fabaceae* e amplamente distribuída no território brasileiro é conhecida popularmente como “pata de vaca” e utilizada principalmente na medicina pelo uso no tratamento de inflamação e diabetes. Bactérias endofíticas podem promover inúmeras vantagens a suas plantas hospedeiras, como indução do crescimento e defesa contra agentes patogênicos. Lectinas são proteínas reconhecedoras e ligantes de carboidratos e promovem diversas atividades biológicas. Em alguns estudos já foi demonstrada a capacidade de lectinas aglutinar células bacterianas endofíticas sem promover atividade antimicrobiana. Processos de caracterização de lectinas são fundamentais para definição de sua estrutura e função, sendo empregados métodos convencionais e diferenciados para este processo, como a técnica eletroquímica de voltametria cíclica. O objetivo do presente estudo foi avaliar a interação entre bactérias endofíticas e a lectina galactose específica BmoLL isoladas de folhas de *B. monandra* com técnicas de aglutinação e eletroquímica como estratégia de caracterização da lectina. Nos ensaios de aglutinação BmoLL foi testada para três estírpes bacterianas *Bacillus sp.*, *Burkholderia sp.* e *Enterobacter sp.*, onde a lectina promoveu maior atividade aglutinante em células de *Enterobacter sp.* em títulos de 1.024^{-1} . E em ensaios de inibição por galactose, ainda manteve atividade aglutinante para *Enterobacter sp.* em títulos de 8^{-1} . Nos ensaios eletroquímicos com Voltametria Cíclica, as diminuições das correntes de pico catódica e anódica de BmoLL immobilizada em eletrodo de ouro na presença de carboidratos redutores glicose e galactose, foi possível perceber a interação eletroquímica específica da lectina por galactose. Nos ensaios com as bactérias endofíticas, BmoLL immobilizada em eletrodo de ouro promoveu interação com as três estírpes endofíticas testadas, sendo detectado uma diminuição dos processos de oxidação e redução na interface eletrodo/solução a medida que aumentava a concentração de bactérias. Diante dos resultados foi possível perceber a possibilidade de caracterização eletroquímica da lectina BmoLL na interação com bactérias endofíticas de folhas de *B. monandra*.

Palavras-chave: Bactérias endofíticas; Caracterização de lectinas; Eletroquímica.

ABSTRACT

The plant species *Bauhinia monandra* Kurz., belonging to the Fabaceae family and widely distributed in the Brazilian territory, is popularly known as “pata de vaca” and is used mainly in medicine for its use in the treatment of inflammation and diabetes. Endophytic bacteria can provide numerous advantages to their host plants, such as growth induction and defense against pathogens. Lectins are carbohydrate-recognizing and carbohydrate-binding proteins and promote numerous biological activities. In some studies, the ability of lectins to agglutinate endophytic bacterial cells without promoting antimicrobial activity has been demonstrated. Lectin characterization processes are fundamental for defining their structure and function, using conventional and differentiated methods for this process, such as the electrochemical technique of Cyclic Voltammetry. The aim of the present study was to evaluate the interaction between endophytic bacteria and the specific galactose lectin BmoLL isolated from *B. monandra* leaves using agglutination and electrochemical techniques as a lectin characterization strategy. In the agglutination assays BmoLL was tested for three bacterial strains *Bacillus* sp., *Burkholderia* sp. and *Enterobacter* sp., where the lectin promoted greater binding activity in *Enterobacter* sp. in bonds of 1,024¹. And in galactose inhibition assays, it still maintained agglutinating activity for *Enterobacter* sp. in 8¹ titles. In electrochemical assays with Cyclic Voltammetry, the decreases in the peak cathodic and anodic currents of BmoLL immobilized on a gold electrode in the presence of reducing carbohydrates Glucose and Galactose, it was possible to perceive the specific electrochemical interaction of lectin by galactose. In assays with endophytic bacteria, BmoLL immobilized on a Gold electrode promoted interaction with the three endophytic strains tested, detecting a decrease in oxidation processes and a reduction in the electrode/solution interface as the concentration of bacteria increased. Based on the results, it was possible to perceive the possibility of electrochemical characterization of the BmoLL lectin in its interaction with endophytic bacteria from leaves of *Bauhinia monandra*.

Keywords: Endophytics bacteria; Characterization of lectins; Electrochemistry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	–	Espécie vegetal <i>B. monandra</i> Kurz. Aspecto das folhas e flores.	20
Figura 2	–	Esquema indicando os principais mecanismos de ação de bactérias endofíticas que favorecem a sanidade vegetal.	30
Figura 3	–	Esquema de célula eletroquímica na conformação de três eletrodos utilizada em análises eletroanalíticas, principalmente por Voltametria Cíclica.	37
Figura 4	–	Esquema de como ocorre o processo de voltametria cíclica. Gráfico de potencial de varredura triangular (a); Voltamograma Cíclico demonstrando as Correntes de pico Catódica (I_{pc}) e Anódica (I_{pa}) (b).	38

LISTA DE ILUSTRAÇÕES DO ARTIGO

Figura 1	–	Esquema de funcionalização do eletrodo de ouro com BmoLL por oxidação química utilizando Ácido nítrico P.A.	47
Figura 2	–	Cromatograma de prova de pureza de BmoLL por (FPLC).	50
Figura 3	–	Resultados obtidos nos ensaios de atividade aglutinante das estirpes endofíticas nos diferentes fatores de diluição por BmoLL.	51
Figura 4	–	Voltamogramas cíclicos do processo de imobilização de BmoLL em eletrodo de ouro tratado quimicamente com Ácido nítrico .	52
Figura 5	–	Voltamograma cíclico de interação específica de BmoLL e carboidratos com perfil de redução	54
Figura 6	–	Voltamogramas cíclicos da interação BmoLL e estirpe endofítica <i>Bacillus spp.</i>	55
Figura 7	–	Voltamogramas cíclicos da interação BmoLL e estirpe endofítica <i>Burkholderia spp.</i>	57
Figura 8	–	Voltamogramas cíclicos da interação BmoLL e estirpe endofítica <i>Enterobacter spp.</i>	57
Figura 9	–	Interação eletroquímica das estirpes de bactérias endofíticas nas concentrações de 10^5 UFC/mL-1 e BmoLL.	58
Figura 10	–	Voltamogramas de Interação eletroquímica entre BmoLL e estirpes bacterianas endofíticas e <i>E. coli</i> não-endofítica.	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Alguns biossensores desenvolvidos com a utilização de lectinas.	38
------------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AH	Atividade hemaglutinante
BmoLL	Lectina de Folhas de <i>Bauhinia monandra</i>
BmoRoL	Lectina da Raiz de <i>Bauhinia monandra</i>
ConA	Lectina de sementes de <i>Canavalia ensiformis</i>
CramoLL	Lectina de Folhas de <i>Cratillas mollis</i>
EIE	Espectroscopia de Impedância Eletroquímica
HPLC	Cromatografia de Afinidade de Proteína Rápida
IPA	Instituto Agronômico de Pernambuco
kDa	Quilodaltons
SDS	Sulfato sódico de dodecila
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
UFC	Unidade Formadora de Colônia
VC	Voltametria Cíclica

LISTA DE SÍMBOLOS

E	Potencial
I	Corrente elétrica
i_{pa}	Corrente de pico anódica
i_{pc}	Corrente de pico catódica
ne^-	Número de elétrons
O	Forma oxidada
R	Forma reduzida
mV/s	Milivolts por segundo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	OBJETIVOS	19
1.1.1	Geral	19
1.1.2	Específicos	19
2.	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	20
2.1	ESPÉCIE VEGETAL BAUHINIA MONANDRA	20
2.2	LECTINAS VEGETAIS	21
2.2.1	Lectinas isoladas de <i>Bauhinia monandra</i> e suas aplicações	24
2.2.2	Principais métodos de caracterização de lectinas	25
2.3	MICROORGANISMOS ENDOFÍTICOS	27
2.3.1	Bactérias endofíticas	28
2.3.2	Principais atividades biológicas de Bactérias endofíticas em plantas.	30
2.3.3	Bactérias endofíticas na indução a resistência sistêmica de plantas	33
2.4	LECTINAS E TÉCNICAS ELETROQUÍMICAS	34
2.4.1	Voltametria Cíclica	35
2.4.2	Biossensores baseados em lectinas	39
3	METODOLOGIA E RESULTADOS	41
3.1	Artigo: Caracterização eletroquímica da lectina galactose específica BmoLL por interação específica com bactérias endofíticas isoladas de folhas de <i>Bauhinia monandra</i> Kurz.	41
4	CONCLUSÕES	66
5	SÚMULA CURRICULAR	67
	REFERÊNCIAS	68

1 INTRODUÇÃO

Micro-organismos endofíticos frequentemente estão relacionados com a sanidade de suas plantas hospedeiras, principalmente pela produção ou até mesmo inibição da síntese de metabólitos secundários, podendo conferir inúmeras vantagens, tais como: proteção contra herbivoria, micro-organismos fitopatogênicos ao produzir compostos antimicrobianos, aumento da resistência a condições de estresse e alteração em propriedades fisiológicas (STROBEL, 2001; BANDARA *et al.*, 2006; AZEVEDO; ARAÚJO, 2007).

Bactérias endofíticas muitas vezes estão relacionadas com processos de defesa contra agentes patogênicos e indução do crescimento vegetal, sendo ações promovidas por mecanismos bioquímicos e fisiológicos no interior de seu vegetal hospedeiro (GARCIA, *et al.*, 2015). Muitas dessas estratégias são executadas de forma direta, porém há outras possibilidades indiretas de atuação, como em processo de indução ao crescimento, bem como na defesa contra agentes patogênicos por resistência induzida (HARDOIM *et al.*, 2015).

Podemos definir lectinas como proteínas reconhecedoras e ligantes de carboidratos, sendo uma das biomoléculas naturais mais pesquisadas, fator decorrente de sua capacidade de realizar interação reversível e específica com mono, oligo e/ou polissacarídeos com grande afinidade (LIS; SHARON, 1998; COELHO *et al.*, 2017).

Entretanto, além de se ligarem a carboidratos, em plantas lectinas podem também interagir com moléculas reguladoras de vias bioquímicas importantes (SANTOS, *et al.*, 2011). Atividades biológicas tais como: antimicrobiana, inseticida e crescimento vegetal são bastante descritas na literatura, podendo estas serem fatores importantes na adaptação evolutiva vegetal existente (PEUMANS; VAN DAMME, 1998).

Conhecida por vários nomes populares, tais como “pata de vaca”, “mão de vaca”, a espécie vegetal *Bauhinia monandra* (*Fabaceae*) possui grande valor comercial por ser utilizada para fins forrageiro, ornamental e principalmente medicinal, sendo este último pelos estudos quanto a atividade antidiabética e antioxidante de seus extratos (MARTINS *et al.*, 1995; FERNANDES *et al.*, 2012).

De um modo geral é perceptível o aspecto saudável de folhas de *B. monandra*. e acredita-se que este fator esteja correlacionado a uma possível

interação entre lectinas presentes na folha com microorganismos de sua microbiota endofítica. (RAMOS, *et al.*, 2016). Diante disso, tem se sugerido um mecanismo de ação quanto à produção de metabólitos com atividade antimicrobiana ou competição por nutrientes entre microorganismos endofíticos e eventuais patógenos colonizadores (BACILIO-JIMÉNEZ *et al.*, 2001).

Vários estudos demonstram a capacidade de lectinas em aglutinar bactérias e outros microorganismos fitopatogênicos, tais como os fungos (RATANAPO, *et al.* 2001). Todavia, em muitos casos é importante observar a interação entre os endofíticos e a planta hospedeira, pela qual pode promover aos micro-organismos produzirem metabólitos iguais ou semelhantes (AZEVEDO, 2014).

No estudo de Gao *et al.* (2003) demonstrou-se que plantas superiores possuem a capacidade na produção de compostos que estimulam ou inibem especificamente a resposta em bactérias e outros microorganismos. Porém este aspecto não é caracterizado em todos os micro-organismos presentes na planta hospedeira.

Vários estudos demonstram a capacidade de lectinas em conseguirem aglutinar bactérias e fungos fitopatogênicos (RATANAPO, *et al.* 2001) e actinobactérias. Entretanto em muitos casos o processo de aglutinação, bem como função biocida ou biostática frequentemente não se manifestam em algumas espécies de microorganismos não patogênicos.

Torna-se importante observar que a atividade de aglutinação permite especular uma possível relação entre BmoLL e endofíticos das folhas de *Bauhinia monandra* (RAMOS, *et al.* 2016). E várias lectinas de plantas têm interagido de alguma forma com diferentes patógenos (MACEDO *et al.*, 2007; SOUZA *et al.*, 2011).

No processo de caracterização de lectinas, a avaliação *in vitro* da atividade hemaglutinante de eritrócitos glutarizados de coelhos e/ou humanos é amplamente utilizada (GUZMÁN-PARTIDA, *et al.*, 2004; SILVA, *et al.*, 2012). Sendo uma metodologia adicional para as análises eletroforéticas e de focalização que também fazem parte do processo de caracterização de proteínas (SHARON; LIS, 2002).

A caracterização eletroquímica de proteínas possui vantagens no ponto de vista do uso de pouca quantidade de amostra protéica e pelo fato de podermos obter resultados de interação específica entre a proteína (bioreceptor) e seu analito (ligante alvo) com a utilização de diversas técnicas, sendo as voltamétricas a

exemplo da Voltametria Cíclica e impedimétricas como a Espectroscopia de Impedância Eletroquímica, usadas com mais frequência (ANDRADE, *et al.*, 2009; OLIVEIRA, *et al.*, 2011b).

Com o aumento de elaboração de biossensores no campo da pesquisa científica, muitos estudos demonstraram a capacidade de lectinas serem imobilizadas em eletrodos de diferentes materiais e por diversos meios, como a utilização de camadas intermediárias de diversas composições, tais como polímeros condutores e estruturas metalorgânicas (SOUZA, *et al.*, 2001; EDLA, *et al.*, 2008; OLIVEIRA, *et al.*, 2011a).

Entretanto a possibilidade de adsorção direta de proteínas em superfície de eletrodos por modificações químicas vem sendo bastante relatadas. Em alguns casos, tratamentos químicos ou até mesmo eletroquímicos, tais como processos de oxidação química inicial pode promover a ligação de proteínas biorreceptoras em eletrodos de diferentes composições sem a necessidade de camadas intermediárias (DINIZ, *et al.*, 2003; DINIZ; UETA, 2004).

Técnicas eletroquímicas como a Voltametria Cíclica (CV) e Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE) são amplamente usadas na elaboração de biossensores para diagnósticos de doenças, monitoramento ambiental, bem como diversos outros fins (DAMOS, *et al.*, 2004; SOUZA, 2012). Alguns estudos demonstraram a interação de lectinas em eletrodos de variadas composições através de técnicas eletroquímicas, tanto para a sua caracterização, quanto na forma de biorreceptores para o uso em biossensores (ANDRADE, *et al.*, 2011; OLIVEIRA, *et al.*, 2011).

Pesquisas que demonstrem os possíveis mecanismos de interação entre a lectina de folhas de *B. monandra* (BmoLL) e microorganismos da microbiota endofítica são carentes na literatura científica, como também sobre a interação de lectinas de folhas com endofíticos foliares.

E uma possível determinação desses processos, pode ser um ponto chave promissor para definição da dinâmica entre endófitos-lectina-hospedeiros, bem como irá favorecer no conhecimento dos possíveis mecanismos de síntese de novas substâncias de interesse biotecnológico, tais como para defesa agrícola contra micro-organismos fitopatogênicos e controle biológico.

Além disso, existem muitos estudos que utilizam lectinas como biorreceptores adsorvidas em diferentes tipos de eletrodos como ferramenta de caracterização.

Pesquisas realizadas por Andrade *et al.* (2011) comprovou a interação da lectina BmoLL em eletrodo de ouro por adsorção direta e através da utilização de nanocompósito híbrido orgânico/inorgânico.

Desse modo, estudos de caracterização eletroquímica envolvendo a interação de BmoLL com células bacterianas da microbióta endofítica das folhas de *Bauhinia monandra* ainda não foram realizadas. E diante da possibilidade de lectinas se ligarem especificamente a alguns endófitos bacterianos, pode ser uma ferramenta promissora na caracterização dessas biomoléculas.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 GERAL

Avaliar e caracterizar as interações biomoleculares entre a lectina galactose específica (BmoLL) e microorganismos da microbiota endofítica, isolados de folhas de *Bauhinia monandra* por técnicas eletroquímicas.

1.1.2 ESPECÍFICOS

- Purificar BmoLL de folhas de *B. monandra* através de protocolo previamente estabelecido;
- Reativar as estirpes de bactérias oriundas da microbiota endofítica foliar de *B. monandra* previamente identificadas;
- Avaliar a atividade aglutinante de BmoLL frente a estirpes de bactérias endofíticas, a fim de verificar a interação micro-organismos/lectina;
- Funcionalizar eletrodo de ouro com a lectina BmoLL por oxidação química com ácido nítrico;
- Caracterizar eletroquimicamente a adsorção da BmoLL no eletrodo através da interação com carboidratos redutores em concentrações diferentes;
- Utilizar as técnicas eletroquímicas de voltametria cíclica para avaliar os processos de interação BmoLL/bactérias endofíticas;
- Caracterizar a BmoLL através da avaliação eletroquímica da interação desta lectina com as estirpes endofíticas.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEORICA

2.1 ESPÉCIE VEGETAL BAUHINIA MONANDRA

Bauhinia monandra Kurz., consiste em uma espécie vegetal amplamente distribuída no território brasileiro. O epíteto específico “*monandra*” é referente ao fato de suas folhas possuírem um único estame (SOUZA, 2012). Esta espécie faz parte de um gênero pertencente à família *Fabaceae*, e detém uma característica em comum, o que seria no formato de suas folhas que remetem a forma de “unha de vaca”, sendo o fator principal que promoveu a disseminação de diversos nomes populares em diferentes lugares do Brasil (MARTINS, *et al.*, 1995). Dos mais variados nomes populares são: “pata de vaca”, “mão de vaca”, “unha de vaca”, dentre outros, que são utilizados para identificação e comercialização da espécie vegetal (BORGES; MENDONÇA, 2009).

No Nordeste, especificamente no estado de Pernambuco, além da *B. monandra*, podemos encontrar outras espécies do mesmo gênero, sendo consideradas nativas, a exemplo de *B. chelantha* Stend, *B. forficata* Link, *B. Heterandra* Benth, *B. membranacea* Benth (ALMEIDA, *et al.*, 2006).

Figura 1 – Espécie vegetal *B. monandra* Kurz. Aspecto das folhas e flores.



Fonte: <http://umaflorepordia.blogspot.com/2014/11/pata-de-vaca-monandra.html> Acesso em:

21/09/2021 às 13:40 hrs.

B. monandra, também possui uma característica interessante, que seria a sua

alta floração com aspecto de muita beleza, o que favorece o uso desta espécie para fins ornamentais e capacidade do uso para fins forrageiros em alimentação de animais por possuir sementes ricas em vitamina A, sendo sementes oriundas das vagens que surgem após o processo de floração (FLORES, *et al.*, 2017; SANTOS, *et al.*, 2014). Muito embora, as aplicações no âmbito medicinal são bem mais exploradas na medicina popular, bem como na pesquisa científica (LORENZI; MATOS, 2002).

Dentre as atividades biológicas promovidas por esta espécie para saúde, está na utilização de suas folhas para o tratamento do diabetes pela capacidade dos princípios ativos da planta promover o controle dos índices glicêmicos (MENEZES, *et al.*, 2007; SISENANDO, 2009). Além disso, as sementes de *B. monandra* possui altos índices de ácidos graxos oléicos e linoleicos, sendo também muito importantes em processos de coagulação sanguínea, dor e inflamação (MOYNA; HEINZEN, 2003).

2.2 LECTÍNAS VEGETAIS

Podemos considerar lectinas como proteínas altamente versáteis pela sua atuação em sistemas biológicos, onde em muitos casos estão envolvidas na promoção de defesa contra patógenos de diferentes naturezas, bem como no processo de sinalização em possíveis danos causados em superfícies de células (LIU, *et al.*, 2010; WU, *et al.*, 2009). Podem ser encontradas em diversos organismos vivos a exemplo de animais (FUJII, *et al.*, 2011; LÓPEZ-VANCELL, 2010), micro-organismos como bactérias e fungos (HAMSHOU, VAN DAMME & SMAGGHE, 2010; ZINGER-YOSOVICH, *et al.*, 2011), como também há a possibilidade de sua obtenção em plantas, sendo em sua maioria (SALLES, *et al.*, 2011).

Lectinas vegetais são as mais comuns a serem estudadas, principalmente pela infinidade de estruturas e tecidos de plantas pelos quais pode se obter essas biomoléculas (LEWIS, *et al.*, 2005). Podemos extrair lectinas de raízes primárias e secundárias (SOUZA, *et al.*, 2011; YAN *et al.*, 2010), caule, folhas (SALLES, *et al.*, 2011) e até mesmo sementes (WU, WANG & NG., 2011).

Lectinas de raízes tendem a promover inúmeras ações biológicas,

principalmente na defesa direta contra agentes patogênicos e até mesmos no combate de insetos e outros artrópodes com hábito de herbivoria (MACEDO *et al.*, 2007; SILVA, *et al.*, 2019). Em lectinas de outras estruturas, a exemplo de tecidos foliares, tendem a promover atividades biológicas pela qual favoreça a manutenção bioquímica e fisiológica da planta levando em consideração que este ambiente é suscetível a ação de agentes biótico e abióticos (FREIRE, *et al.*, 2002; VANDENBORRE; SMAGGHE; VAN DAMME, *et al.*, 2011).

Os processos de interação proteína-carboidratos executados por estas biomoléculas são um dos pontos chaves para o sucesso em diversas atuações biológicas (KENNEDY, *et al.*, 1995). Lectinas possuem no mínimo um domínio não catalítico que promove ligação a carboidratos de forma específica, seletiva e reversível (CAMACHO, 2007; PEUMANS; VAN DAMME, 1995). E muitos desses açúcares podem ser encontrados em superfícies de células eucarióticas e procarióticas.

Lectinas são classificadas por diversos critérios, sendo um dos principais a presença e quantidade de domínios com sítios de ligação para carboidrato específico e/ou até mesmo de um sítio catalítico (ISKRATSCH, 2009). O grau de especificidade para carboidratos e/ou glicoconjugados é dependente da conformação dos sítios de ligação, o que é influenciado pela constituição aminoacídica destas regiões (NEUMANNA, *et al.*, 2004; KHANG; JEAN-LUC; HOEBEKE, 1990).

Levando em conta o critério citado acima, lectinas que possuem apenas um domínio capaz de reconhecer carboidratos são denominadas como **Merolectínas**, consideradas assim monovalentes e não são capazes de aglutinar células e/ou precipitar glicoconjugados (LIU; BIAN; BAO, 2010; VAN PARIJS *et al.*, 1991). Quando há a presença de dois domínios iguais ou similares a nível conformacional e estes são capazes de se ligarem a carboidratos, denominamos então de **Hololectinas**, sendo a maioria de lectínas pertencentes a esta classe (CAVADA *et al.*, 2001). Por possuírem esta característica, hololectinas podem ser divalentes ou multivalentes, o que permite a aglutinação de células, a exemplo de eritrócitos e capacidade de aglutinar glicoconjugados (HAMID, *et al.*, 2013).

Hololectinas que possuem divergência estrutural em seus domínios de ligação a carboidratos, denominamos de **Superlectinas**, pois esta diferença conformacional de domínios permite a ligação de diferentes carboidratos na mesma proteína (VAN

DAMME *et al.*, 1996; VANDENBORRE; SMAGGHE; VAN DAMME, 2011). Quando o domínio de ligação específico para carboidratos estão em associação com outro domínio com capacidade de realizar atividade catalítica ou outra atividade biológica considerada distinta, denominamos então como **Quimerolectinas**. A depender da quantidade de domínios de ligação a açúcares, estas lectinas podem se subclassificar também como mero ou hololectinas.

(PEUMANS; VAN DAMME, 1998).

Vários estudos tem demonstrado o uso de lectinas em diversas aplicações, como na biologia molecular e farmacologia, utilizadas como estratégias eficazes na investigação de muitos mecanismos bioquímicos e fisiológicos (ZHANG, *et al.*, 2009). Lectinas podem ser utilizadas na detecção de células normais e transformadas, a exemplo de detecção de células tumorais (ZHANG; SUN; WANG; NG, 2010) e infecção por patógenos e mecanismos de ação destes, como modificação da superfície celular e fatores de virulência de microorganismos diversos (LAKHTIN; LAKHTIN; ALYOSHKIN, 2011; RAMBARUTH; DWEK, 2011).

Diversas outras aplicações na biologia estão voltadas para atividade mitogênica (DRESCH, *et al.*, 2012), indução da morte celular programada, apoptose (PENG, *et al.*, 2009) e na microbiologia, além da aviação de mecanismos de ação de microorganismos, há estudos focados para atividade antibacteriana, antifúngica e antiviral (CHARUNGCHITRAK, *et al.*, 2011).

Em pesquisas envolvendo a sanidade vegetal, lectinas podem estar relacionadas a ação de defesa contra microorganismos patogênicos, tanto por ação direta, quanto por processos de sinalização promovidos pelo contato com a superfície celular de microorganismos e até mesmos das plantas (RAMOS, *et al.*, 2016). A membrana e parede celular de fitopatógenos possui parte de sua constituição de alguns carboidratos potencialmente específicos para algumas lectinas, onde esta interação proteína-carboidrato permite uma ação contra o microorganismo por ser invasor a planta, podendo também sinalizar eventuais danos ao tecido vegetal gerando uma resposta de defesa induzida (VAN DAMME; LANNOO; PEUMANS, 2008).

2.2.1 Lectínas isoladas da espécie vegetal *Bauhinia monandra* e suas aplicações

Dentre as inúmeras estruturas e tecidos presentes na espécie vegetal *B. monandra*, as folhas e as raízes secundárias foram as que se obteve lectinas até o presente momento. A lectina extraída de folhas desta espécie vegetal chamada BmoLL, possui domínios com sítios específicos para a galactose. Foi primeiramente isolada e caracterizada por Coelho e Silva, (2000), sendo purificada convencionalmente por cromatografia de afinidade em coluna de gel de goma guár e eluída com seu carboidrato específico (galactose). E análises eletroforéticas por SDS/PAGE, elucidaram a sua estrutura secundária composta por duas subunidades protéicas, sendo uma com 23 e outra com 33 kDa respectivamente..

Em alguns estudos, BmoLL vem sendo utilizada para diversas aplicações biológicas pela sua alta capacidade em se ligar a resíduos de galactose com facilidade. Além disso, em estudos referente a estabilidade térmica, esta lectina possui atividade mantida até 50 °C, o que favorece a sua utilização em muitos estudos que requer uma temperatura um pouco elevada (COELHO; SILVA, 2000).

Pesquisas quanto a atividade antimicrobiana foram demonstrados quanto a atividade contra fungos e bactérias. BmoLL foi capaz de promover atividade antifúngica para patógenos do gênero *Fusarium* (*F. solani*, *F. lateritium*, *F. fusarioides*, *F. moniliforme* e *F. Verticiloides*), bem como capacidade de aglutinação e inibição do crescimento de bactérias gram-positivas e gram-negativas (SILVA, 2008)..

A atividade antidiabética *in vivo* de BmoLL foi analisada em ratos diabéticos, onde concentrações equivalentes a (2 mg/Kg) promoveu ação hipoglicemiante no sangue de ratos induzidos a diabetes mellitus tipo 2, promovendo redução dos níveis de glicose de forma mais eficaz comparada a fármacos comerciais (EVANGELISTA, 2018; OLIVEIRA, 2019) .

Estudos quanto à atividade inseticida também são relatados. Macedo *et al.*, (2007) detectou a atividade inseticida de BmoLL contra artrópodes das espécies *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) e *Callosobruchus maculatus*

(Coleoptera: Bruchidae), demonstrando assim a possibilidade de aplicação no controle biológico de pragas bem como em agentes vetore de doenças.

Processos de utilização de lectinas como estratégias de marcação de carboidratos e possivelmente células também vêm se tornando cada vez mais utilizados em pesquisas científicas, tais como para marcação de tecidos normais e/ou transformados e até mesmo células de diferentes patógenos, a exemplo de bactérias e fungos (CASTRO NETO, 2008). Dentre as possibilidades de aplicações de lectinas nesse sentido, está na transformação dessas proteínas em nanossondas biológicas ao bioconjugá-las com Pontos quânticos (quantum dots), que são nanocristais semicondutores fluorescentes (CUNHA, *et al.* 2017).

A lectina BmoLL foi bioconjugada com pontos quânticos de Telureto de Cádmió (CdTe), sendo estes testados em eritrócitos quanto a sua capacidade de marcação de células, demonstrando ser uma metodologia muito valiosa para estudos de marcação de células e tecidos normais e/ou transformados, bem como aplicações diversas na biofotônica (OLIVEIRA, *et al.*, 2020).

A lectina obtida de raízes secundárias de *B. monandra*, descrita como BmoRoL, possui características similares a BmoLL, quanto ao processo de purificação e especificidade para o carboidrato Galactose. Entretanto possui algumas diferenças, como a capacidade de se ligar a resíduos de N-Acetilgalactosamina (SOUZA, 2012). Dentre as atividades biológicas importantes detectadas, a capacidade de BmoRoL na ação antifúngica contra fitopatógenos da espécie *Fuzarium solani*, termicida contra *Nasutitermes corniger* e ligação a carboidratos de membrana em formas de promastigotas de *Leishmania sp.* foram relatadas (SOUZA, 2012; SOUZA, *et al.*, 2011).

2.2.2 Principais métodos de caracterização de lectinas

Processos de caracterização de proteínas tem sua importância no conhecimento da estrutura e função de um peptídeo de interesse antes de sua aplicação para fins biológicos. Muitas das estratégias voltadas para avaliação da atividade biológica específica e estrutural são também amplamente aplicadas para a caracterização de lectinas, sendo o primeiro frequentemente utilizado a avaliação da

(HA) atividade hemaglutinante (NASCIMENTO, *et al.*, 2017; SHARON; LIS, 2004). O ensaio de hemaglutinação pode ser facilmente realizado, aplicando a amostra em eritrócitos de mamíferos previamente tratados, sendo um método simples e rápido de detecção de lectinas em amostras (COSTA, *et al.*, 2010; SILVA, *et al.*, 2012).

As hemáceas assim como muitas células, possuem carboidratos em sua superfície e em muitos casos possuem resíduos de carboidratos específicos em maior quantidade, sendo possível assim definir a presença de lectina na amostra e dessa forma, considera-se um ensaio semiquantitativo (GUZMÁN-PARTIDA, *et al.*, 2004; HIRABAYASHI; KUNO; TATENO, 2011). Para avaliar o processo de hemaglutinação, a amostra lectínica é serialmente diluída em microplacas onde se analisa a concentração mínima pela qual é capaz de aglutinar uma concentração de eritrócitos tratados (COELHO; SILVA, 2000).

Para determinação de carboidrato(s) específico(s) de lectinas costuma-se realizar ensaios de inibição de atividade hemaglutinante, onde a diluição de amostra lectínica em solução tampão é aplicada concentrações determinadas de diferentes carboidratos e/ou glicoproteínas a fim de verificar uma possível inibição no processo de hemaglutinação de eritrócitos pré-tratados com glutaraldeído (CORREIA; COELHO, 2008).

Como um dos critérios de classificação de lectinas está relacionado a presença e quantidade de domínios protéicos, outros métodos de caracterização também são empregados levando em consideração este ponto de vista, baseado na predição da estrutura e quantidade domínios da proteína (HOLLE, *et al.*, 2017). Métodos como a Eletroforese SDS/PAGE, PAGE em condições desnaturantes, Eletroforese bidimensional são frequentemente empregadas para definição da quantidade de domínios e isoformas presentes na lectina (PAJIC, *et al.*, 2002; RITTIDACH; PAJIT; UTARABHAND, 2007).

Outros métodos como a análise da possível sequência de aminoácidos (SOUZA, *et al.*, 2003), Cristalografia de Difração de Raio-X, Ressonância Magnética Nuclear (MILLER; KLYOSOV; MAYO, 2012), Dicroísmo circular (YAO; PAN; ZHOU, 2012) e proteômica (VAREJÃO, *et al.*, 2010), são aplicadas para definição da estrutura secundária, terciária, quantidade de domínios presentes, bem como até mesmo a estrutura quaternária da lectina estudada (SHARON; LIS, 2002).

Outras técnicas baseadas na especificidade da lectina por determinados carboidratos são as **técnicas eletroanalíticas**, onde há possibilidade de imobilização de lectinas em eletrodos de diferentes composições a fim de analisar a capacidade dessas proteínas se ligarem de forma específica a glicoconjugados e até mesmo células inteiras (DINIZ; UETA, 2004; UETA, 2002). Além disso, há a possibilidade de analisar a presença de muitos eventos envolvidos no processo e interação proteína/carboidrato, a exemplo da ação de íons metálicos, temperatura ideal para o processo de adsorção, estabilidade, pH e muitos outros eventos físico-químicos (ANDRADE, *et al.*, 2005, SANTOS, *et al.*, 2013).

Com a versatilidade de técnicas eletroquímicas na caracterização de lectinas, como as Voltamétricas e Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE), há a possibilidade dessas proteínas servirem como eventuais sondas biológicas (biorreceptores) em biossensores para diferentes aplicações (ANDRADE, *et al.* 2011; SILVA JUNIOR, *et al.*, 2018). Embora exista desvantagem no ponto de vista de algumas análises precisarem de tratamentos elaborados para adsorver determinadas lectinas em eletrodos, a quantidade de amostra protéica é bem menor comparado a outros métodos, demonstrando assim a possibilidade de empregar a eletroanalítica como ferramenta adicional na caracterização de lectinas purificadas em grandes lotes.

2.3 MICROORGANISMOS ENDOFÍTICOS

Podemos considerar microorganismos endofíticos aqueles que colonizam internamente a espécies vegetais sem lhes causar sequer nenhum dano, durante toda ou parte de sua vida. Podem se desenvolver nos mais diversos tecidos e órgãos de plantas, tais como raízes, caule, folhas e até mesmo sementes, tanto em espaços intercelulares quanto intracelulares (HARDOIM *et al.*, 2015; PAPIK *et al.*, 2020).

Endófitos se proliferam logo após penetrarem internamente aos tecidos de plantas e esta entrada no vegetal o qual se tornará seu hospedeiro, pode ser por via vertical ao se disseminarem internos a sementes e sendo assim dispersos ou por via horizontal ao adentrarem passivamente por meio de fissuras radiculares, lenticelas

e aberturas estomáticas ou ativamente ao secretarem enzimas hidrolíticas (KASANA *et al.*, 2008; TROGNITZ *et al.*, 2016; FRANK *et al.*, 2017).

Para a colonização e formação de uma microbióta endofítica, são utilizadas várias estratégias pelos microorganismos ao adentrarem os tecidos vegetais, sendo iniciado esse processo através do direcionamento para o sistema radicular, de onde ocorre a entrada inicial e posteriormente disseminação e adesão na raiz e seguindo de distribuição nos mais diversos tecidos da planta hospedeira (GIRI; DUDEJA, 2013).

A interação endófito/hospedeiro pode ser considerada simbiótica ou neutra. Por simbiose, o vegetal hospedeiro disponibiliza nutrientes necessários para sobrevivência do microorganismo e em troca recebe proteção contra doenças e predadores, bem como subsídios para o seu crescimento (ARAÚJO, 1996; CONTI; GUIMARÃES; PUPO, 2012). Por neutralização, o microorganismos ao adentrar o tecido vegetal promove uma resposta biológica pela planta, onde dependendo da sanidade do vegetal, poderá mesmo assim permitir a entrada do microrganismo, que por sua vez, de possível patógeno se tornará endófito, podendo promover inúmeros benefícios ao seu hospedeiro (GODINHO, 2016; PITTNER, 2016; RESENDE, *et al.*, 2007; ROMEIRO, 2011).

Podemos encontrar em uma microbiota endofítica, bactérias, fungos e até mesmo actinobactérias, sendo em nível de quantidade e diversidade dependerá de espécie para espécie (ROCHA, *et al.*, 2009). Muitas pesquisas vêm demonstrando a capacidade de endófitos em produzirem uma infinidade de substâncias, tais como: enzimas, toxinas, fatores de crescimento vegetal, compostos antimicrobianos, antitumorais, inseticidas e muitas outras de grande importância na biotecnologia AZEVEDO; ARAÚJO, 2007; KHALDI *et al.*, 2010). Diante desses fatores, a busca por pesquisas mais aprofundadas em relação a síntese de produtos para diversas aplicações na biotecnologia.

2.3.1 Bactérias endofíticas

Bactérias endofíticas podem ser encontradas na maior parte das espécies vegetais existentes, principalmente pela sua capacidade de realizar inúmeras interações biológicas em diferentes tecidos e estruturas vegetais sem causar nenhum dano visível, sendo um dos fatores importantes para o processo evolutivo

do hospedeiro (GRAY & SMITH, 2005; HAYAT *et al.* 2010; MASTRETTA, C. *et al.*, 2009).

Diversos estudos demonstraram a presença dessas bactérias em muitas espécies vegetais, inclusive de grande interesse econômico, a exemplo do algodão, cevada, cana-de-açúcar, soja, videira, dentre muitas outras (PIÑON, *et al.*, 2002; SOUZA, *et al.*, 2001). Sendo aplicadas em estudos de avaliação na indução do crescimento, germinação e atividade antimicrobiana para muitos fitopatógenos considerados um problema a nível agrônomo (PAPIK, *et al.*, 2020; PARTIDA-MARTINEZ, *et al.*, 2007).

De uma forma geral, a origem das bactérias endofíticas se dar inicialmente pela infestação de outros procariotos da microbiota epifítica de plantas, onde se proliferam através da região da rizosfera, filosfera ou até mesmo em sementes no momento da germinação (COMPANT, *et al.*, 2008). E a entrada destas é facilitada principalmente pela presença de feridas naturais nos tecidos, bem como por processos catalíticos realizados por enzimas hidrolíticas, tais como pectinases e celulasas ((HALLMANN, 1997; KANG; MILLS, 2004). Bactérias endofíticas colonizadoras de raízes, Rizobacterias podem promover inúmeras vantagens, principalmente pelo fato das raízes serem a primeira estrutura a sofrer danos físicos pela atividade de crescimento por gravitropismo positivo, bem como ação de patógenos presentes neste ambiente de altíssima (DEY, *et al.*, 2004; DIMKPA, 2009).

Colonizadoras de tecidos foliares frequentemente necessitam lidar com os estresses recorrentes nesse ambiente. A região foliar é muito importante para os processos fotossintéticos das plantas o que é de se esperar a ação de raios solares e diversos outros eventos abióticos que venham a afetar essas estruturas (AZEVEDO, *et al.*, 2002; BARRETTI; SOUZA; POZZA, 2008). Outro fator associado ao ambiente da filosfera são os possíveis patógenos presentes na microbiota epifítica que podem muitas vezes, possuírem mecanismos de ação para invadir os tecidos foliares e se instalarem como agentes causadores de doenças (AZEVEDO, 1998; MACCHERONI; ARAÚJO; LIMA, 2004).

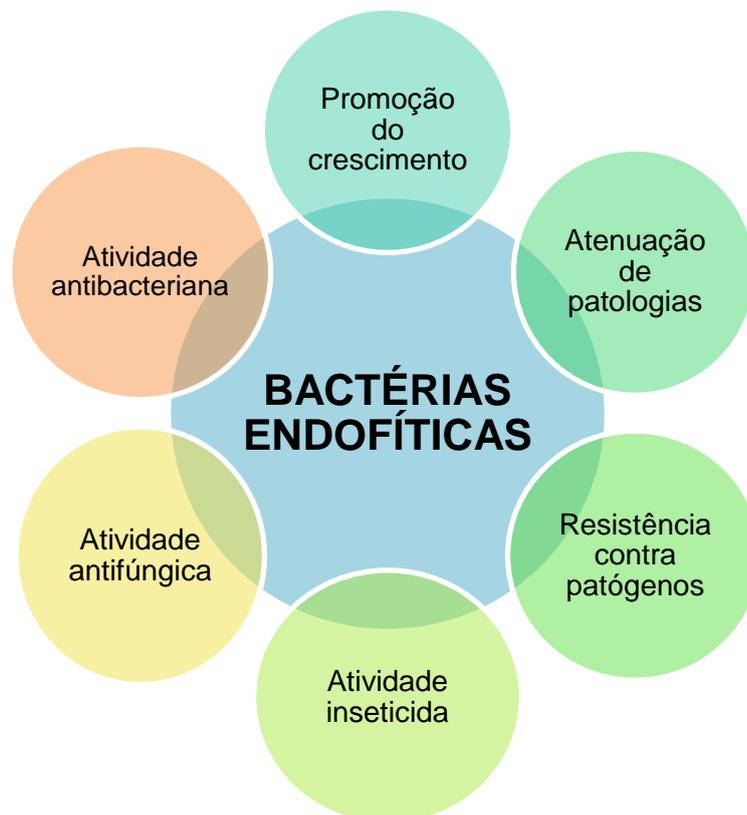
Bactérias endofíticas da região foliar, muitas vezes não só estão relacionadas a indução do crescimento vegetal, mas principalmente na promoção de defesa

contra diversos agentes patogênicos por diferentes mecanismos, podendo estes serem bioquímicos pela síntese de compostos que combatem esses agentes ou físicos, através de barreiras biológicas formadas por estes microorganismos o que pode gerar um processo de competição bastante vantajosa (ARAÚJO, *et al.*, 2002; BANDARA, *et al.*, 2006).

2.3.2 Principais atividades biológicas de Bactérias endofíticas em plantas

Pela diversidade de interações bioquímicas e fisiológicas que bactérias endofíticas podem realizar com seus hospedeiros vegetais, há uma gama de aplicações biológicas possíveis de serem detectadas. Dentre estas podemos destacar a promoção do crescimento vegetal e atenuação de doenças pela indução da defesa contra agentes fitopatogênicos, atividade inseticida e antimicrobiana frente a fungos e bactérias diversos (KUKLINSKY-SOBRAL, *et al.*, 2006; MASSIMILIANO, *et al.*, 2020; SANTOS, 2014).

Figura 2 – Principais mecanismos de ação de bactérias endofíticas que favorecem a sanidade vegetal



Fonte: O autor.

Processos de crescimento vegetal podem ser induzidos por bactérias endofíticas através de estímulos diretos ou indiretos. De forma direta, ocorre quando o microorganismo produz hormônios ou compostos que promovem efeito similar que permita um estímulo ao crescimento de diversas estruturas do vegetal hospedeiro (ASGHAR, *et al.*, 2002; GUO *et al.* 2008). Já de forma indireta, ocorrem processos de indução promovidos pela facilitação na absorção de nutrientes e sais minerais, que são extremamente ideais para o crescimento da planta como fixação de N₂ (ANTOUN, *et al.*, 1998), solubilização do fosfato (CHABOT, *et al.*, 1996), bem como na disponibilidade de nutrientes, tendo em vista que endófitos também podem produzir metabólitos secundários que favorecem o processo de crescimento vegetal (PÉREZ-GARCÍA *et al.*, 2011, ZHANG *et al.* 2011)

Outra grande vantagem que bactérias endofíticas podem propiciar a planta hospedeira está na capacidade de estabelecer mecanismos de defesa contra espécies fitopatogênicas (ARAVIND, *et al.*, 2010; GOVAN, 1993; COMPANT, *et al.*, 2008). Muitas estirpes de bactérias endofíticas podem executar atividade antimicrobiana para muitas espécies de fungos e bactérias com perfil de patogenicidade, promovendo assim a atenuação de doenças diversas (GOVAN; HUGHES; VANDAMME, 1996; HOLMES; GOVAN; GOLDSTEIN, 1998; PARKE; GURIAN-SHERMAN, 2001; PERIN, *et al.*, 2006).

Segundo os estudos de Hu & Young (1998) e Kang *et al.* (1998), muitos endófitos do gênero *Burkholderia sp.* e *Enterobacter sp.*, assim como em muitos outros, tendem a possuir a capacidade de sintetizarem compostos bioativos capazes de inibir o crescimento de fungos fitopatogênicos, sendo possíveis ferramentas potenciais para aplicação no controle biológico na agricultura (MELNICK, *et al.*, 2008).

Bactérias colonizadoras de raízes, rizobactérias, além de promover o crescimento vegetal de forma direta e indireta, podem executar diversos mecanismos que favorecem a manutenção fisiológica da planta hospedeira (HANADA; ROMEIRO, 1998; HAYAT, 2010). Como prova de conceito, podemos citar a produção de fito-hormônios como a exemplo de ácido giberélico e auxinas, produção de compostos quelantes de minerais como os sideróforos e facilitação no processo de solubilização de fosfato (SOUZA, *et al.*, 2013; GARCIA, *et al.*, 2015).

Esses mecanismos são de extrema importância para as plantas, tendo em vista que a raiz é a primeira estrutura de manutenção estrutural e fisiológica, bem como estas bactérias podem facilmente colonizar outras estruturas vegetais importantes, tais como o ambiente foliar (ARAÚJO, *et al.*, 2002)..

Endófitos bacterianos colonizadores de folhas tendem a estar mais propensos a estresses bióticos e abióticos, o que favorece uma maior atuação destes, na promoção de defesa de sua planta hospedeira frente a esses fatores (NANDAKUMAR *et al.*, 2001). Dentre muitos dos mecanismos já anteriormente citados, microorganismos desse ambiente, tendem a terem uma alta síntese de metabólitos antimicrobianos, como também de enzimas líticas que degradam a parede celular de fitopatógenos, o que pode gerar uma resposta de indução a mecanismos de defesa vegetal (SESSITSCH; REITER; BERG, 2004).

Outro fatores gerais envolvidos na atividade antimicrobiana de bactérias endofíticas contra patógenos, está na competição entre si por nutrientes, produção de compostos antibióticos diferenciados e sideróforos (KLOEPPER, *et al.*, 1980; RAMAMOORTHY, *et al.*, 2001). Alguns gêneros bacterianos endofíticos são muito encontrados em plantas, principalmente de forma abrangente na rizosfera e filosfera. Um desses microorganismos é *Bacillus spp.* Em tecidos foliares estirpe de *Bacillus sp.* vem sendo bastante relatado quanto ao seu isolamento a nível endofítico. Nos estudos de Melo (2017), foi possível isolar estirpes de *Bacillus spp.*, *Burkholderia spp.* e *Enterobacter spp.* de folhas saudáveis de *B. monandra*, demonstrando uma grande variedade de tecidos onde estas bactérias podem colonizar.

Diversos estudos envolvendo esse gênero vem sendo relatados na literatura, tais como na atividade antibacteriana contra outras estirpes bacterianas com perfil de fitopageneicidade, fungos, atividade inseticida e promoção do crescimento vegetal pela síntese e indução de fito-hormônios (JOE, *et al.*, 2012; LASTOCHKINA, *et al.*, 2020; QI, *et al.*, 2011; YUAN, *et al.*, 2002). Em pesquisa executadas por Jia, *et al.*, (2020) *Bacillus megaterium* promoveu ação antibacteriana contra os fitopatógenos *Streptomyces scabies* and *Erwinia carotovora* causadores de patologias em batatas.

A capacidade de endófitos bacterianos promover proteção contra patógenos é bastante perceptível, sendo muitos outros estudos voltados para essa temática sendo executados, principalmente voltados para análise moleculares e de

bioinformática a exemplo da genômica, proteômica e metabolômica (RAJENDRAN, *et al.*, 2008; SESSITSCH, *et al.*, 2004).

2.3.3 Bactérias endofíticas na indução a resistência sistêmica de plantas

Bactérias endofíticas podem promover inúmeros processos de defesa para plantas e muitos desses são promovidos de forma indireta, sendo favorecidos por mecanismos de indução a respostas de defesa contra agentes patogênicos de diferentes naturezas, podendo estes serem fungos, bactérias ou até mesmo outros grupos diversos (HANADA; ROMEIRO, 1998; NANDAKUMAR *et al.*, 2001).

Várias estruturas dos microorganismos podem facilitar o processo de resistência a patógenos. Nas bactérias a maquinaria do sistema de secreção, flagelo, pili, lipopolissacarídeos, e até mesmo proteínas derivadas de bactérias, a exemplo de efetores de fitopatogenia, podem promover processos de desencadeamento de uma eficaz resposta sistêmica induzida (HARDOIM *et al.*, 2015).

Dessa forma, percebemos que muitas proteínas e peptídeos de origem vegetal não só atuam apenas de forma direta no combate de fitopatógenos, mas também conferem processos de indução a defesa contra a esses agentes causadores de patologias diversas (WHIPPS, 2001). Algumas proteínas como as defensinas, lectinas e peptídeos efetores de fitopatógenos são relatadas na literatura como possíveis biomoléculas que podem induzir mecanismos de defesa contra fitopatógenos (LANNOO; VAN DAMME, 2010; VAN'T SLOT; KNOGGE, 2002).

A presença do patógeno alvo na região epifítica amplia a capacidade de defesa do vegetal ao receber estímulos da microbiota endofítica residente no tecido afetado (ARAÚJO, 2019). A ampliação dessa defesa e resistência a possíveis ataques pode aumentar e diminuir por inúmeros fatores, sendo o aumento proporcionado por respostas biológicas de contato a longo prazo entre endófitos/patógenos e diminuição ocasionada pela elevada variabilidade genética dos fitopatógenos (KUMAR *et al.*, 2012; REINHOLD-HUREK; HUREK, 2011).

Muitos eventos na natureza acabam promovendo inúmeros estímulos de defesa para as plantas, o que muitas vezes favorecem na estruturação de

mecanismos mais especializados, podendo estes, serem químicos, físicos ou até mesmo biológicos (LANNOO; VAN DAMME, 2014). Em muitos casos, processos de indução de defesa estão atrelados a estes eventos pelos quais espécies vegetais estão sob frequente exposição, tais como os mecanismos de ataque de agentes patogênicos onde a microbiota endofítica recebe o estímulo necessário e posteriormente promove uma indução (PINTO; RIBEIRO; OLIVEIRA, 2011).

2.4 TÉCNICAS ELETROQUÍMICAS E LECTINAS

Com o passar dos anos, muitas técnicas eletroanalíticas vem sendo amplamente utilizadas em processos de identificação e caracterização de biomoléculas de diferentes origens (DINIZ, *et al.*, 2003). E essa possibilidade está associada com a presença de eventos eletroquímicos envolvidos na síntese, estruturação e mecanismos de ação dessas biomoléculas, onde podemos tomar como exemplo as proteínas, que por sua vez, requerem de eventos eletroquímicos em seu processo de síntese, principalmente na sua conformação estrutural tridimensional, bem como na manutenção de sua solubilidade através da camada de solvatação em sua extremidade (NERO, *et al.*, 2014).

Dentre o grupo de técnicas eletroanalíticas que podem ser utilizadas em aplicações biológicas, podemos citar as que envolvem potenciometria (potenciométricas) e por amperometria (amperométricas) (PACHECO, *et al.*, 2013). Partindo do princípio de amperometria, tendo em vista que sua utilização é bem mais frequente em análises de processos biológicos, a conformação baseada em uma célula eletroquímica contendo três eletrodos, onde dentre estes é medido um potencial de corrente entre um eletrodo de trabalho e um auxiliar, levando em consideração um potencial fixo obtido por um eletrodo de referência (UETA, 2002).

Para essas técnicas eletroquímicas amperométricas no contexto de análises do perfil de interação de proteínas com outros analitos, tais como as lectinas e carboidratos, as técnicas mais amplamente utilizadas são a Voltametria cíclica e Espectroscopia de impedância eletroquímica (ANDRADE, *et al.*, 2011; OLIVEIRA, *et al.*, 2008). Muitos desses estudos visam na caracterização de lectinas quanto aos processos de interação específica a carboidratos, como para elaboração de plataformas biosensoras para diversas aplicações baseadas nessas biomoléculas

como biorreceptores (DINIZ; UETA, *et al.*, SOUZA, *et al.*, 2001).

A EIE tem como principal variável de análise a resistência a transferência de carga (R_{tc}) à medida que um analito alvo vai se ligando em um biorreceptor, sendo a impedância e a dupla camada elétrica também avaliados (CARVALHO; ANDRADE; BUENO, 2006). Embora haja uma grande utilização desta técnica tanto para caracterização de lectinas como para elaboração de plataformas biosensoras, daremos um enfoque maior para a VC, tendo em vista por ser a técnica eletroanalítica que utilizamos nos experimentos para obtenção de resultados do presente projeto de dissertação.

2.4.1 Voltametria Cíclica (VC)

Dentre as ferramentas voltamétricas, a VC é baseada em um grupo de técnicas que possibilita a investigação de muitos processos eletroquímicos envolvendo a análise de inúmeros analitos (SOUZA, 2012; HARRIS, 2001). Essa investigação é possível através da observação da relação entre uma corrente elétrica e um potencial aplicado através de dois eletrodos, sendo estes imersos em uma solução eletrolítica ou o que chamamos de eletrólito suporte (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009; KOTZ, *et al.*, 2015).

Frequentemente se utiliza VC pela capacidade desta técnica eletroanalítica promover a obtenção de informações a nível qualitativo, a medida que se analisa os eventos eletroquímicos decorrentes das reações envolvidas, bem como a possibilidade de se obter resultados quantitativos, quando se estrutura um planejamento fatorial na análise do analito de interesse através de concentrações diferentes no decorrer que cada evento eletroquímico vai ocorrendo (AVELINO, 2017; OLIVEIRA, *et al.*, 2011a). Além disso, há a possibilidade de obtermos informações sobre a cinética de reações de transferência de elétron e termodinâmica dos processos de oxidação e redução (PACHECO, *et al.*, 2013; ZUMDAHL; ZUMDAHL, 2014).

Em análises de processos eletroquímicos, como caracterização de biomoléculas e estruturação de biosensores, costuma-se usar uma célula eletroquímica convencional onde esta, contém uma solução a qual equivale ao eletrólito suporte e este, por sua vez, requer o uso de sondas redox, pelas quais

promovem a detecção na variação dos potenciais de oxidação e redução envolvidos nas análises (CHAUHAN, *et al.*, 2017; VIDOTTI, *et al.*, 2010).

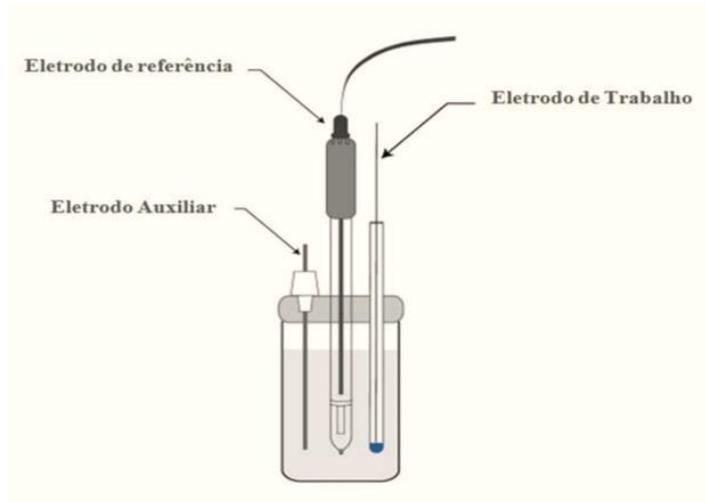
Quanto á composição estrutural de eletrodos no sistema de análise por Voltametria, convencionalmente utiliza-se a conformação de três eletrodos: o Eletrodo de Trabalho, Eletrodo auxiliar e Eletrodo de referência (CORREIA DE SÁ, 1992; FONSECA; PROENÇA; CAPELO, 2015). O eletrodo de trabalho, que em muitas vezes tem sua composição química de Ouro, Prata, Platina e/ou Carbono, equivale aquele pelo qual ocorre a funcionalização de receptores para detecção de um analito alvo, podendo ser uma biomolécula ou componentes de reconhecimento de origem inorgânica (CHEN, *et al.*, 1998; JACOBS; PEAIRS; VENTON, 2010).

O eletrodo auxiliar, que frequentemente de composição química de Platina, promove uma transferência de elétrons com o eletrodo de trabalho, servindo como auxílio no momento em que vai se realizando as análises dos processos redox envolvidos nas reações (UETA, 2002). Já o eletrodo de Referência, quem frequentemente tem composição química de Calomelano ou Prata/Cloreto de Prata, tem a principal função de manter um potencial constante no momento da realização das análises dos processos redox e essa capacidade é sempre mantida pela sua saturação com solução de KCL antes de cada análise eletroquímica (FONSECA, *et al.*, 2002; SILVA JR; ARAÚJO FILHO; SILVA, 2000).

Caracterizamos o processo de VC, como um processo eletroquímico interfacial, tendo em vista que o mesmo ocorre em uma região denominada interface eletrodo-solução, sendo este eletrodo, considerado o de trabalho onde ocorrem os processos interfaciais importantes e uma camada próxima composta de solução eletrolítica (CHEVION; ROBERTS; CHEVION, 2000; SEMENOVA, *et al.*, 2018).

Em VC o potencial de varredura é triangular, onde é empregada uma velocidade conhecida e de forma constante no eletrodo de trabalho, sendo este estacionário, imerso em solução eletrolítica em repouso e ao passo que atingimos o potencial final pretendido, ocorre a inversão da direção da varredura de elétrons para o sentido do potencial inicial, podendo ser obtido assim um gráfico de corrente em relação ao potencial (BARD; FAULKNER, 2006; SKOOG *et al.*, 2008; WANG, 2006).

Figura 3 – Esquema de célula eletroquímica na conformação de três eletrodos utilizada em análises eletroanalíticas, principalmente por Voltametria Cíclica.

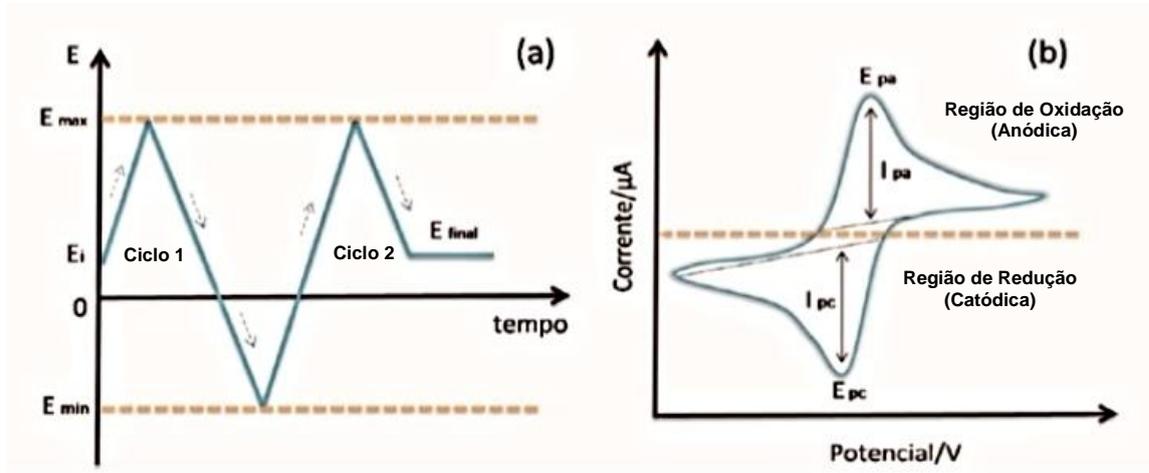


Fonte: Adaptado de LANDIM, 2014.

Na figura 4 (a) podemos observar com clareza este processo, considerado que, dependendo do analito a ser identificado, podemos realizar um único ciclo de medição ou vários no decorrer do tempo. À medida que realizamos esses processos de varredura, conseqüentemente conseguimos detectar as variações nos processos de oxidação e redução envolvidos na interface eletrodo-solução.

Diante dessas variações dos processos redox, podemos obter um Voltamograma Cíclico através da mensuração da Corrente sobre o Eletrodo de trabalho a medida que ocorre uma variação de potencial, sendo assim estruturado um gráfico de corrente mediante o potencial. (PACHECO *et al.*, 2013 REIS, *et al.*, 2013). Sendo considerado, neste caso, a corrente apontada como o sinal que nos indica o processo de excitação do potencial, como podemos observar na figura 4 (b).

Figura 4 – Esquema de como ocorre o processo de voltametria cíclica. Gráfico de potencial de varredura triangular (a); Voltamograma Cíclico demonstrando as Correntes de pico Catódica (I_{pc}) e Anódica (I_{pa}) (b).



Fonte: Adaptado de (BRETT & BRETT, 1993; BARD & FAULKNER, 2006).

Desse modo, a variação no aumento ou diminuição das correntes de pico são importantes para detecção de processos de interação de um analito com seu biorreceptor a depender da análise a ser realizada. A variação na Corrente de Pico Anódica (I_{pa}), demonstra os processos de oxidação que estão eventualmente ocorrendo, denominamos esta área como Região de Oxidação. Já a variação na Corrente de pico Catódica (I_{pc}), nos permite prever a ocorrência dos processos de redução, sendo considerada esta área de Região de Redução (WANG, 2006; RONKAINEN; HALSALL; HEINEMAN, 2010).

Assim, conseguimos detectar possíveis processos de interação ocorrendo na interface eletrodo/solução, bem como entender quais processos de cinética de transferência de carga (oxirredução) e em que níveis estão sendo executados, principalmente se tratando de substâncias eletroativas, tais como aquelas ricas em proteínas e outras biomoléculas (NICHOLSON, 1965; JARA-PALACIOS, 2017).

2.4.2 Biossensores eletroquímicos baseados em lectinas

Biossensores baseiam-se em ferramentas de detecção rápida que vem se tornando cada vez mais importantes, principalmente nas indústrias médica e ambiental, sendo estruturas a nível nanotecnológico que promove o biorreconhecimento de um analito de interesse de forma eficaz e em curto período

de tempo (ARDUINI, *et al.*, 2016; CONGUR, *et al.*, 2015).

Dentre os biossensores baseados em lectinas, as técnicas eletroquímicas mais utilizadas são a Voltametria Cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica, pela simplicidade de análise dos resultados, bem como uma melhor performance dos processos de interação das lectinas com seus carboidratos específicos (KISS, *et al.*, 2016; NESAKUMAR *et al.*, 2016; POVEDANO *et al.*, 2017).

No âmbito de biossensores Voltamétricos, muitos cientistas consideram a VC com boa funcionalidade para construção de novos biodispositivos, por conta de sua capacidade de detectar fenômenos físico-químicos associados ao processo de interação analito biorreceptor, bem como no processo de funcionalização de superfícies eletródicas ao adsorver biomoléculas sobre um eletrodo de trabalho (KIMMEL, *et al.*, 2011; LUNA *et al.*, 2015; NIA *et al.*, 2015).

Tabela 1 – Alguns Biossensores baseados em lectinas.

Lectina	Patógeno ou analito alvo	Autor
<i>BmoLL</i>	<i>Detecção do Vírus da Dengue</i>	Andrade, <i>et al.</i> , 2011.
<i>Clavanina A</i>	<i>Detecção de bactérias patogênicas</i>	Silva Júnior, <i>et al.</i> , 2018.
<i>ConA</i>	<i>Detecção de Candida sp.</i>	Sá, <i>et al.</i> , 2020.
<i>CramoLL</i>	<i>Detecção de lipopolissacarídeo bacteriano.</i>	Oliveira, <i>et al.</i> , 2011b.
<i>CramoLL</i>	<i>Detecção do Vírus da Dengue</i>	Oliveira, <i>et al.</i> , 2011a.
<i>CramoLL</i>	<i>Diagnóstico do Câncer de Próstata.</i>	Silva, 2019.

Fonte: O autor.

Muitos biossensores baseados em lectinas vêm sendo estruturados, principalmente para a detecção de microorganismos dos mais variados tipos. Estudos de detecção de partículas virais, bactérias com perfil de patogenicidade, leveduras e lipopolissacarídeos bacterianos (ANDRADE, *et al.*, 2015; Oliveira, *et al.*, 2011b.).

Biossensores de lectinas também podem ser estruturados para o diagnóstico de doenças virais, principalmente pela possível interação de lectinas com glicoproteínas de superfície viral. Nos estudos de Andrade, *et al.* (2011) foi construído um biossensor nanoestruturado baseado em nanocompósito híbrido orgânico/inorgânico de BmoLL e nanopartículas de ouro com Polianilina, onde demonstrou eficácia na detecção de vários sorotipos do Vírus da dengue em soro humano sendo possível detectar DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 respectivamente. Outra estratégia similar utilizando outra lectina, a CramoLL, também foi testado na detecção do Vírus da Dengue de forma rápida e eficiente (OLIVEIRA, *et al.*, 2011a).

Lectinas como biorreceptores também podem detectar a presença de glicoconjugados em amostras biológicas e como se sabe, muitos desses, em grandes quantidades é evidência da presença de patologias, a exemplo de células tumorais. Nos estudos de Silva (2019), foi possível elaborar uma plataforma biossensora baseada na lectina CramoLL como ferramenta diagnóstica para o câncer de próstata. Dessa forma podemos perceber a versatilidade de lectinas na utilização como ferramenta de diagnóstico rápido, tais como em biossensores eletroquímicos nos mais diferentes campos da ciência.

3 METODOLOGIA E RESULTADOS

Os resultados dessa dissertação está apresentado na forma de artigo.

3.1 ARTIGO

Caracterização eletroquímica da lectina galactose específica BmoLL por interação específica com bactérias endofíticas isoladas de folhas de *Bauhinia monandra* Kurz.

Josivan Barbosa de Farias¹, Sílvio Assis de Oliveira Ferreira², Rosilma Pereira de Araújo Melo³, Sandra Rodrigues de Souza⁴, Luana Cassandra Breitembach Barroso Coelho¹

¹*Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Recife, 50670-420 Pernambuco, Brazil.*

²*Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Rua Alto do Reservatório, Bela Vista, Vitória de Santo Antão, 55608608, Pernambuco, Brasil.*

³*Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Recife, 50670-420 Pernambuco, Brazil.*

⁴*Departamento de Educação, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n, Dois irmãos, Recife, 52171-900, Pernambuco, Brasil.*

Resumo/Abstract

O objetivo deste estudo baseia-se na caracterização eletroquímica da lectina específica para galactose BmoLL extraída de folhas da espécie vegetal *Bauhinia monandra* através dos processos de interação com bactérias endofíticas isoladas do mesmo tecido vegetal. Foram verificadas a atividade aglutinante de BmoLL frente a três estirpes bacterianas endofítica: *Bacillus spp.*, *Burkholderia spp.* e *Enterobacter spp.* Nos resultados obtidos para atividade aglutinante, a lectina BmoLL promoveu maior aglutinação para a estirpe *Enterobacter spp.* em títulos de 1024¹. Nas análises eletroquímicas, BmoLL foi imobilizada em eletrodo de ouro através do processo de

oxidação química e posteriormente caracterizada pela interação com carboidratos redutores, sendo a galactose, o carboidrato que mais interagiu com a lectina diante dos resultados obtidos por Voltametria Cíclica. Quanto ao processo de interação das estirpes endofíticas com BmoLL por eletroquímica, as diminuições sequenciais dos picos de correntes catódicas e anódicas demonstraram interação da lectina por ambas as estirpes endofíticas, tendo maior especificidade para o gênero *Enterobacter spp.* A proposta de utilizar bactérias endofíticas como estratégia de caracterização adicional de lectinas por eletroquímica demonstrou ser viável pela especificidade, rapidez e uso de quantidades menores de amostra protéica.

Palavras-chave/Key words: Bactérias Endofíticas; Caracterização de proteínas; Eletroquímica; Lectinas; Voltametria Cíclica.

Introdução

Diversas classes de proteínas desempenham importantes papéis em sistemas biológicos, tais como os processos de reconhecimento e sinalização celular, combate de agentes patogênicos de diferentes naturezas, bem como na síntese de biocompostos e até mesmos outros peptídeos (KANEKO; NIMMERJAHN; RAVETCH, 2006; HARDIVILLÉ; HART, 2014; IORDACHE, *et al.*, 2015; SILVA, *et al.*, 2019).

Durante e após os processos de purificação, torna-se fundamental realizar a caracterização da proteína de interesse para assim ocorrer uma comprovação se de fato, a amostra em questão realmente possui o peptídeo (ALAM, *et al.*, 1996; HELMHOLZ, *et al.*, 2008). Nesse sentido, muitos métodos analíticos podem ser empregados neste processo, sendo um dos principais, a avaliação da atividade biológica a qual amostra proteica pode executar (SANTOS, *et al.*, 2013)..

Lectinas são consideradas proteínas de origem não imune que podem ser encontradas em diversos organismos vivos, sendo em sua maioria, em plantas (PEUMANS; VAN DAMME, 1995). Sua capacidade de se ligar especificamente e reversivelmente a carboidratos, proporciona uma gama de aplicações, tais como na purificação de glicoconjugados, marcação células tumorais, atividade antimicrobiana, inseticida e até mesmo na produção de diferentes tipos de biossensores (GABIUS *et al.*, 2002; MURDOCK; SHADE, 2002; MACEDO *et al.*,

2007; COELHO *et al.*, 2017).

No processo de caracterização de lectinas, a avaliação *in vitro* da atividade hemaglutinante de eritrócitos glutarizados de coelhos e/ou humanos é amplamente utilizada (GUZMÁN-PARTIDA, *et al.*, 2004; SILVA, *et al.*, 2012). Sendo uma metodologia adicional para as análises eletroforéticas e de focalização que também fazem parte do processo de caracterização secundária de proteínas (SHARON; LIS, 2002).

A caracterização eletroquímica possui vantagens no ponto de vista do uso de pouca quantidade de amostra proteica e pelo fato de podermos obter resultados de interação específica entre a proteína (bioreceptor) e seu analito (ligante alvo) com a utilização de diversas técnicas, sendo as voltamétricas a exemplo da Voltametria Cíclica e impedimétricas como a Espectroscopia de Impedância Eletroquímica, usadas com mais frequência (ANDRADE, *et al.*, 2009; OLIVEIRA, *et al.*, 2011b)

Com o aumento de elaboração de biossensores no campo da pesquisa científica, muitos estudos demonstraram a capacidade de lectinas serem imobilizadas em eletrodos de diferentes materiais e por diversos meios, como a utilização de camadas intermediárias de distintas composições, tais como polímeros condutores e estruturas metalorgânicas (SOUZA, *et al.*, 2001; EDLA, *et al.*, 2008; OLIVEIRA, *et al.*, 2011a).

Entretanto a possibilidade de adsorção direta de proteínas em superfície de eletrodos por modificações químicas vem sendo bastante relatadas (BASSI, *et al.*, 1999; FURTADO, *et al.*, 2012). Em alguns casos, tratamentos químicos e até mesmo eletroquímicos, como processos de oxidação química inicial, pode promover a ligação de proteínas biorreceptoras em diferentes tipos de eletrodos sem a necessidade de ligantes intermediários (DINIZ, *et al.*, 2003; DINIZ; UETA, 2004).

A BmoLL consiste em uma lectina com sítios de ligação específico para resíduos de galactose extraídas das folhas da espécie vegetal *Bauhinia monandra* (*Fabacea*) (COELHO; SILVA, 2000). E muitos estudos demonstraram sua eficácia em diversas aplicações biotecnológicas, como: na atividade antimicrobiana, construção de biossensores para o diagnóstico do Vírus da Dengue e atividade antidiabética (ANDRADE, *et al.*, 2011; FERNANDES, *et al.*, 2012).

Microorganismos endofíticos são aqueles que colonizam diversos tecidos vegetais sem causar nenhum dano evidente. Podendo promover condições benéficas ao hospedeiro tais como promoção de crescimento e combate de agentes

patogênicos de diferentes naturezas (AZEVEDO, 1998; LACAVA, *et al.*, 2004). Dentre os endófitos importantes neste processo, podemos citar as bactérias, principalmente aquelas que antes de colonizar internamente os tecidos foliares, aprimoram seus mecanismos de defesa contra fitopatógenos inicialmente na rizosfera (ABEDINZADEH, *et al.*, 2019).

Bactérias endofíticas podem promover diversas vantagens a suas plantas hospedeiras, sendo a indução de crescimento e proteção contra patógenos uma das mais importantes no ambiente foliar (ARAÚJO, *et al.*, 2002). Nos estudos de Ramos, *et al.*, (2016) a lectina BmoLL promoveu aglutinação de células bacterianas endofíticas da espécie *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de folhas de *B. monandra*, sem promover a morte desses microorganismos, o que nos pode demonstrar a possibilidade de um mecanismo de ação induzido a defesa de eventuais espécies fitopatogênicas.

Diante de possíveis interações que possam ocorrer no ambiente foliar, acredita-se que lectinas possam de alguma forma interagir com esses microorganismos, principalmente em processos de resistência sistêmica induzida para proteção de espécies fitopagênicas invasoras (GAO, *et al.*, 2003; RATANAPO, *et al.*, 2001).

Da possibilidade de lectinas se ligarem se forma específica a bactérias endofíticas, este estudo objetiva avaliar a interação entre a lectina específica para galactose BmoLL extraída de folhas de *B. monandra* e bactérias isoladas do mesmo tecido vegetal como ferramenta de caracterização eletroquímica de lectinas.

Materiais e métodos

Purificação e caracterização da Lectina de folhas de B. monandra (BmoLL)

A purificação e caracterização da lectina de folhas de *B. monandra* (BmoLL) foi baseada segundo protocolo previamente estabelecido (COELHO; SILVA, 2000). Neste processo, utilizou-se como purificação a cromatografia de Afinidade em coluna de Gel de guár e como prova do grau de pureza da proteína purificada, foi utilizado a técnica de Cromatografia Líquida de Proteína Rápida (FPLC).

O material vegetal foi inicialmente coletado na cidade de Vitoria de Santo

Antão – Pernambuco e identificado por técnicas taxonômicas no Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA). As folhas foram secas em estufa a 37 °C e trituradas. O extrato foi preparado em solução Tampão Citrato Fosfato pH 6,5 preparado em NaCl a 0,15 M e agitado durante a noite por um período de 16 h a 4°C. Posterior filtração e centrifugação, o sobrenadante foi coletado para posterior precipitação em Sulfato de Amônio de 0 a 60% p em tampão (p / v) por 4 h em temperatura ambiente.

Após centrifugação, o precipitado foi dialisado e submetido à quantificação de proteínas (Lowry *et al.*, 1951). Posteriormente as amostras foram aplicadas em coluna de cromatografia de afinidade de gel de guár preparado previamente e eluição utilizando tampão citrato fosfato contendo Galactose a 50Mm.

Sequencialmente, após diálise, BmoLL teve sua atividade Hemaglutinante verificada em suspensões de 2,5% em placa de microtitulação com NaCl a 0,15 M (v / v) e eritrócitos de coelhos tratados com glutaraldeído. Em seguida, as frações de BmoLL foram submetidas a caracterização por Eletroforese SDS-PAGE.

Para o processo de prova de pureza da lectina por FPLC, 1 mL das frações protéicas recém purificadas foram aplicadas em coluna de Sephadex G-75 (de aproximadamente 20 cm de altura). Como fase móvel, foi utilizado tampão citrato de sódio (pH 6,5) e assim realizado a análises dos pico de absorbância característico para BmoLL purificada.

Reativação e imobilização das bactérias endofíticas de B. monandra

As estirpes endofíticas foram isoladas anteriormente de folhas frescas de *B. monandra* e identificadas a nível de gênero. Para realização dos testes foram utilizados os gêneros: *Bacillus spp.*, *Burkholderia spp.* e *Enterobacter spp.* A reativação foi realizada em Ágar Muller Hington por 24 h a 37 °C. e posteriormente, as culturas foram mantidas em meio Brain Heart Infusion (BHI) até o uso.

Para imobilização das bactérias foi usado um protocolo adaptado descrito em Vazquez *et al.*, (1996). O cultivo bacteriano foi realizado em meio Brain Heart Infusion por 24 h a 37°C. No dia seguinte, para cada uma dos gêneros considerados, preparamos suspensão bacteriana concentrada com 10 mL de PBS estéril,

resultando em uma concentração de aproximadamente 15×10^8 CFU mL⁻¹, compatível com a turbidez, que foi avaliada como tubo 5 na escala de McFarland.

A suspensão bacteriana foi centrifugada por 10 min. a 3000 rpm; após o sobrenadante ter sido descartado, o sedimento foi lavado três vezes com PBS estéril (pH 7,4). Em seguida, utilizou-se solução de formalina 0,4 em água estéril por 2 h a 4 °C, agitando o tubo por inversão, para imobilizar a bactéria.

Após incubação em 2 h de formaldeído, as bactérias foram lavadas com solução de PBS estéril por três vezes. Por fim, a turbidez da suspensão bacteriana foi ajustada no tubo 5 na escala de McFarland e armazenada a 4 °C até o momento de sua utilização.

Ensaio de aglutinação de BmoLL com as estirpes endofíticas de B. monandra

O ensaio de aglutinação foi realizado em placas de microtitulação (96 poços). Neste ensaio, 50 µL de NaCl 0,15 mol L⁻¹, 50 µL de uma suspensão bacteriana (10^8 células mL⁻¹) e uma diluição em série de 50 µL de preparação altamente purificada de BmoLL (0,96 mg/mL⁻¹) foram adicionadas e o controle não continha lectina. A atividade de aglutinação foi observada e fotografada após 24 h, utilizando um microscópio óptico.

Os ensaios de inibição foram realizados com uma solução contendo 100 µL de 100 mmol L⁻¹ de galactose em cloreto de sódio 0,15 mol L⁻¹ misturado com 100 µL⁻¹ de preparação de lectina (0,96 mg mL⁻¹), e 50 µL dessa mistura foram distribuídos nos poços. Após 15 min. em temperatura ambiente, foram adicionados 50 µL de solução bacteriana em um volume final de 100 µL. O resultado foi registrado visualmente após 45 min. em temperatura ambiente e seguindo posteriormente para as análises dos resultados comparando com aqueles inicialmente realizados sem inibição.

Funcionalização por oxidação química da superfície do eletrodo de ouro com a lectina BmoLL

Para funcionalização da lectina em eletrodo de ouro foi utilizado o protocolo de Diniz e Ueta, (2004). Seguindo pararealização dos ensaios eletroquímicos, um eletrodo de disco de ouro ($0,05 \text{ cm}^2$) sendo este o eletrodo de trabalho, foi polido em pasta de Alumina e sonicado em água Milli-Q por 3 min. Logo após, o eletrodo foi imerso em solução piranha ($(1:3 - \text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{SO}_4)$) por 3 min. Em seguida foi realizada leitura por voltametria cíclica utilizando solução $0,5 \text{ M}$ de H_2SO_4 para obtenção de um voltamograma cíclico de eletrodo limpo. Posteriormente, para ocorrer a oxidação química e favorecer a adsorção das lectinas, o eletrodo limpo foi exposto a uma solução de ácido nítrico P.A. durante 5 min.

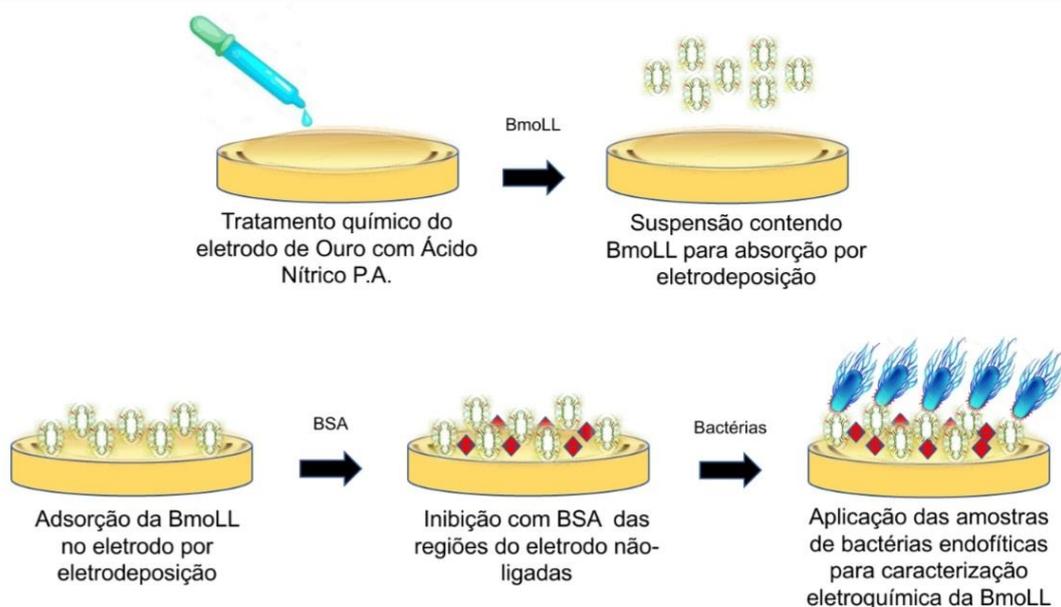


Figura 1: Esquema de funcionalização do eletrodo de ouro com BmoLL por oxidação química utilizando Ácido Nítrico P.A. Podemos também observar como ocorrerá o processo de caracterização pela interação com as células bacterianas endofíticas ao se ligarem na lectina (bioreceptor).

Depois deste processo, foi realizada a lavagem com água ultrapura e imersão do eletrodo em solução salina $0,15 \text{ M}$ contendo a lectina BmoLL em uma concentração de $1 \mu\text{g/mL}$ para funcionalização do eletrodo em um período de 30 min. Após este procedimento, o eletrodo revestido com BmoLL foi enxaguado com água desionizada e incubado em solução aquosa de BSA a 3% por 1 h para bloquear regiões de ligação não específica (figura 1).

Caracterização eletroquímica da adsorção da BmoLL em eletrodo de ouro por

Voltametria Cíclica

As análises eletroquímicas foram realizadas com o auxílio de um aparelho Potenciostato/Galvanostato (Autolab, PGSTAT302N, Metrohm, Suíça) e através do *software* NOVA 1.11.2. Os experimentos foram realizados utilizando como sonda redox, uma solução de 10 mM de ferrocianeto de potássio $K_4[Fe(CN)_6]^{4-}/K_3[Fe(CN)_6]^{3-}$ (1:1) em 20 ml de solução PBS 10 mM contendo NaCl 0,15.

Para a realização dos experimentos foi utilizada célula eletroquímica convencional com três eletrodos, mantendo a configuração padrão, sendo: Ag / AgCl (KCl saturado) como eletrodo de referência, o auxiliar um fio de platina e o de trabalho, um disco de ouro modificado ($d = 2$ mm).

As medições de Voltametria Cíclica foram realizadas em um potencial de - 0,2 a 0,7 V com uma velocidade de varredura de 50 mV.s^{-1} dentro de uma gaiola de Faraday. Todas as medidas foram realizadas em triplicata (OLIVEIRA, 2011).

Caracterização eletroquímica da adsorção da BmoLL em eletrodo de ouro por Voltametria Cíclica e interação com galactose e glicose

Partindo para as análises eletroquímicas da imobilização de BmoLL, foram realizadas então a caracterização pelo processo de interação com os carboidratos D-Galactose e D-Glicose, baseando-se no protocolo de Bassi, *et. al.*, (1999). Sabendo-se que BmoLL possui sítios específicos de ligação a Galactose, sendo este um açúcar redutor, nesta parte experimental também resolvemos avaliar os processos redox envolvidos nas análises eletroquímicas da BmoLL imobilizada na presença de outro carboidrato com perfil redutor, porém não específico a esta lectina, sendo assim um estudo comparativo.

Seguindo um planejamento fatorial, concentrações de 40, 60, 80 e 100 Mm de D-Galactose (Sigma-Adrish) foram preparadas previamente em 20 mL de solução de Ferrocianeto de potássio $K_4[Fe(CN)_6]^{4-}/K_3[Fe(CN)_6]^{3-}$ (1:1) (preparado em solução de NaCl a 0,15 M). A suspensão foi agitada em um período de 5 min. para inteira homogeneização. Posteriormente, foram realizadas leituras por voltametria cíclica seguindo os mesmos parâmetros descritos na seção anterior. Os experimentos realizados com D-Glicose seguiram os mesmos protocolos acima citados.

Caracterização eletroquímica por Voltametria Cíclica pela interação BmoLL /Bactérias endofíticas de B. monandra

Posterior leitura eletroquímica da funcionalização de BmoLL em eletrodo quimicamente modificado, foi então realizada a caracterização pelo processo de interação com as bactérias endofíticas de folhas de *B. monandra* baseado-se no protocolo de (OLIVEIRA, 2011). Cada estirpe bacteriana inicialmente imobilizada foi adaptada a uma concentração de $0,5 \times 10^8$ UFC/mL⁻¹ sendo o equivalente ao tubo 5 da Escala de Mcfarland.

A partir da suspensão inicial, foram realizadas diluições sucessivas para assim obter as concentrações de 10^1 a 10^5 UFC/mL⁻¹. Posteriormente, no eletrodo de ouro quimicamente funcionalizado com a BmoLL, 1 mL de cada uma das suspensões bacterianas foram aplicadas seguindo da menor para a maior concentração (figura 1).

Foi então aguardado um período de 15 min., para assim serem realizadas as leituras eletroquímicas por Voltametria Cíclica seguindo os mesmos parâmetros de potencial e velocidade de varredura descritos anteriormente para avaliação da imobilização de BmoLL no eletrodo de ouro.

A nível comparativo, foram realizados os mesmos processos de detecção de interação com uma estirpe não endofítica. Neste caso utilizamos uma amostra de *E. coli* de linhagem não - endofítica. Os procedimentos de imobilização e detecção foram realizados da mesma forma como descritos para todos os endófitos.

Resultados e Discussão

Purificação e caracterização da Lectina de folhas de B. monandra (BmoLL)

No processo de purificação em gel de guar, foi possível obter uma concentração máxima de 280 mg/mL de lectina purificada. Nos resultados de atividade hemaglutinante foi obtido títulos de 2.048^{-1} para fração proteica dialisada. E nas análises por Eletroforese SDS – PAGE revelou-se 2 bandas protéicas, uma de 26 KDa e outra de 33 Kda, equivalente as duas subunidades da BmoLL de acordo

com o protocolo estabelecido por Coelho e Silva (2000).

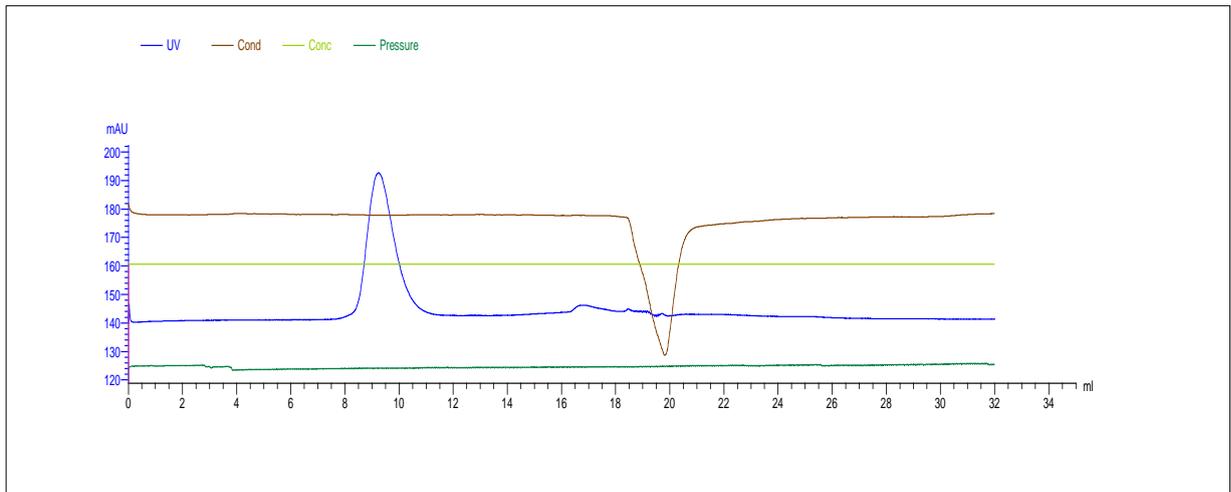


Figura 2: Cromatograma de prova de pureza de BmoLL por (FPLC). O pico destacado em Azul, demonstra o grau de pureza da amostra de BmoLL adquirida através do processo de purificação.

Na avaliação por FPLC, foi possível observar o grau de pureza de BmoLL através do pico de absorvância (em azul) característico para as análises de purificação da lectina por este método. Além disso, o processo de condutividade no decorrer do processo da avaliação da pureza da lectina não demonstrou interferência. Dessa forma conseguimos avaliar que nas amostras protéicas de lectina purificada inicialmente por cromatografia de afinidade foi eficaz (figura 2).

Atividade aglutinante de BmoLL com as estirpes endofíticas de B. monandra

Nos ensaios de aglutinação, a lectina BmoLL demonstrou maior interação para a estirpe *Enterobacter spp.* com fator de diluição em títulos de 1.024^{-1} . As análises pela formação de agregados no poço equivalente a essa diluição na placa de microtitulação foi observado 30 min. depois da realização dos ensaios. Quanto a estirpe *Burkholderia spp.*, foi observada uma menor interação de BmoLL pelas células bacterianas, onde a aglutinação chegou a títulos de 256^{-1} (figura 3).

Para a estirpe *Bacillus spp.* foi obtido os menores valores de atividade aglutinante. BmoLL promoveu interação com essas bactérias em um fator de diluição de 64^{-1} , sendo observada uma aglutinação bem menor, comparadas as demais estirpes testadas (figura 3). Os ensaios de inibição de BmoLL com galactose como interferente na atividade aglutinante demonstrou resultados satisfatórios. Isso

porque, com os sítios de ligação de BmoLL específicos para galactose inibidos, houve uma diminuição drástica na interação da lectina com as células bacterianas endofíticas.

Para a estirpes *Burkholderia spp.* e *Enterobacter spp.*, o título de aglutinação anterior decaiu para 2^{-1} , demonstrando assim que nos ensaios anteriores BmoLL realmente promove uma interação com essas bactérias, mesmo em fatores de diluição moderados. Outro fator a ser destacado, foi em relação a *Enterobacter spp.*, onde nos ensaios de inibição houve uma queda de 1.024^{-1} para 8^{-1} , demonstrando que a inibição dos sítios específicos da lectina para galactose interferiu na interação com a estirpe bacteriana (figura 3).

Torna-se importante analisar que, embora tenha ocorrido uma diminuição da interação de BmoLL com *Enterobacter spp.*, ainda se manteve a atividade aglutinante em títulos de 8^{-1} , o que pode nos demonstrar a maior especificidade da lectina por este gênero bacteriano endofítico. Nos estudos de Ramos, *et. al.*, 2016 as análises realizadas com BmoLL e bactérias endofíticas do gênero *Pseudomonas spp.*, demonstraram resultados similares, além de utilizar esta mesma metodologia comparativa de atividade aglutinante de lectina pura e inibida com galactose.

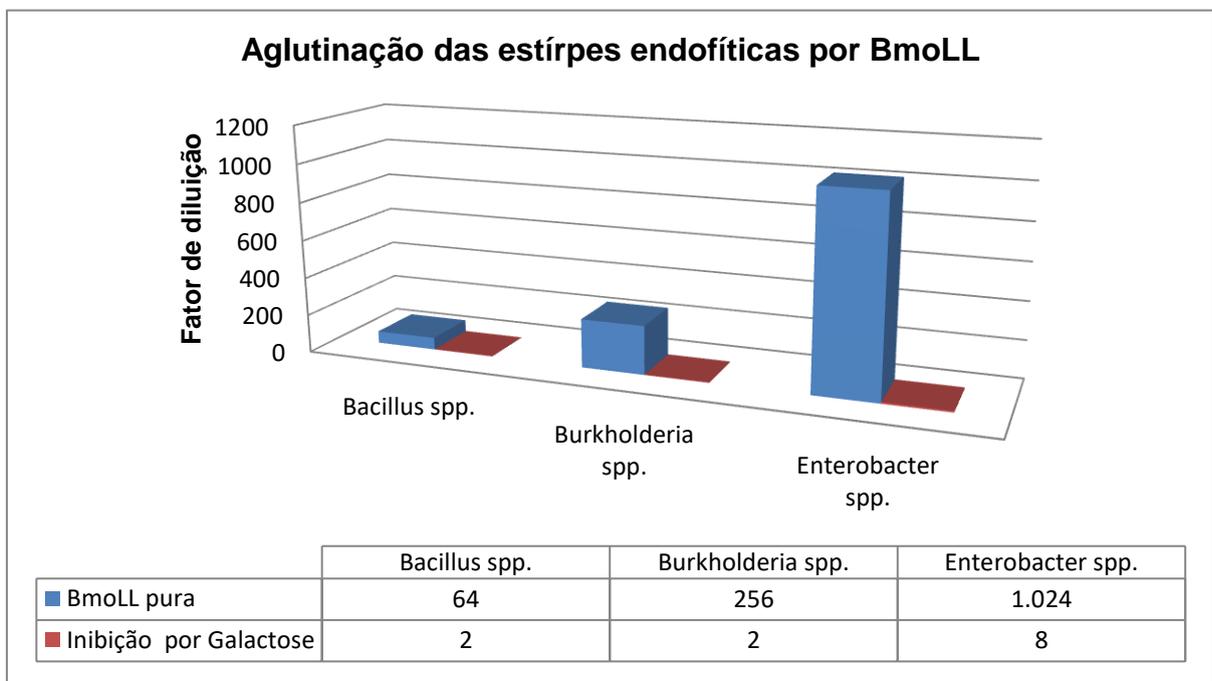


Figura 3: Resultados obtidos nos ensaios de atividade aglutinante das estirpes endofíticas nos diferentes fatores de diluição por BmoLL pura (em azul) e inibida com D- Galactose a 50 mM (em vermelho).

Dessa forma, observamos que podemos realizar esta metodologia como estratégia simples e adicional de caracterização de lectinas com endófitos bacterianos diferentes, porém isolados do mesmo tecido que a proteína em questão. Além disso, muitas das variações obtidas nos resultados de aglutinação podem estar relacionadas com as diferenças bioquímicas encontradas na estrutura de cada gênero de microorganismo, inclusive aqueles constituintes da microbiota endofítica.

Caracterização eletroquímica da adsorção da BmoLL em eletrodo de ouro por Voltametria Cíclica

Diante dos resultados obtidos, foi possível observar que o tratamento com Ácido Nítrico proporcionou a adsorção da lectina BmoLL no eletrodo de Ouro. A superfície do eletrodo de ouro ao entrar em contato com a suspensão de lectina promoveu um recobrimento e adsorção eficaz, tendo em vista que a área eletroativa foi diminuída e conseqüentemente a transferência de elétrons pela sonda redox ferricianeto de potássio. Desse modo conseguimos verificar uma diminuição da amplitude de corrente e dos picos de correntes catódica e anódica, que se refere na diminuição dos processos de oxidação e redução do par redox $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ na interface eletrodo/solução (Figura 4 b).

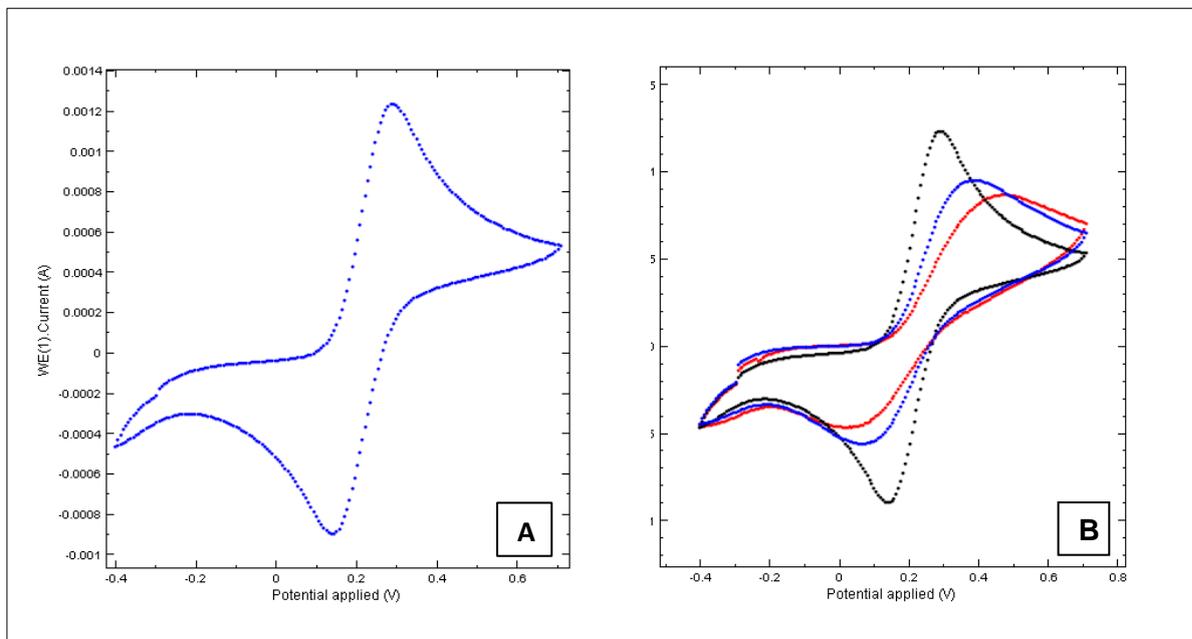


Figura 4: Voltamogramas Cíclicos do processo de imobilização de BmoLL em eletrodo de Ouro tratado quimicamente com Ácido Nítrico. Eletrodo limpo (A); Eletrodo funcionalizado com BmoLL em concentrações diferentes (B).

Desse modo é perceptível também que, a lectina se ligou facilmente ao eletrodo modificado quimicamente, principalmente se observarmos a linearidade nas duas concentrações de BmoLL que ao serem aplicadas da menor para maior área eletroativa do eletrodo foi bastante diminuída, o que pode ser interferências nos processos redox envolvidos. Assim, percebemos a capacidade de lectinas serem adsorvidas em eletrodo por tratamento químico simples, tais como muitas outras têm se interagido principalmente por oxidação química, a exemplo dos estudos de Diniz e Ueta, (2004) que demonstrou a adsorção de Concanavalin A através da oxidação de eletrodo de platina.

Caracterização eletroquímica por Voltametria Cíclica da interação BmoLL com Galactose e Glicose em diferentes concentrações

Nos ensaios de interação de carboidratos com perfil de redução e BmoLL imobilizada, foi possível perceber a especificidade da lectina pelo seu carboidrato Galactose. Ao aumentarmos a concentração de D-Galactose ao longo do tempo, foi possível observar uma diminuição das correntes de pico catódica e anódica, demonstrando assim uma diminuição dos processos redox na interface eletrodo/solução e consequentemente comprovando uma possível ligação de galactose no sítios específicos da lectina BmoLL (figura 5 a).

Outro fator a ser observado está nas correntes de pico catódicas, onde detectamos duas correntes geradas, desde as menores concentrações de galactose (40 mM) até a sua maior concentração (100 mM). Sendo assim, podemos perceber que embora a galactose se ligue a BmoLL com alta especificidade, o que é perceptível pela diminuição dos processos redox, o perfil de redução é mantido mesmo com essa diminuição. Podemos ver nitidamente se compararmos os dois picos de redução presentes na maior concentração de Galactose (figura 5a, em destaque).

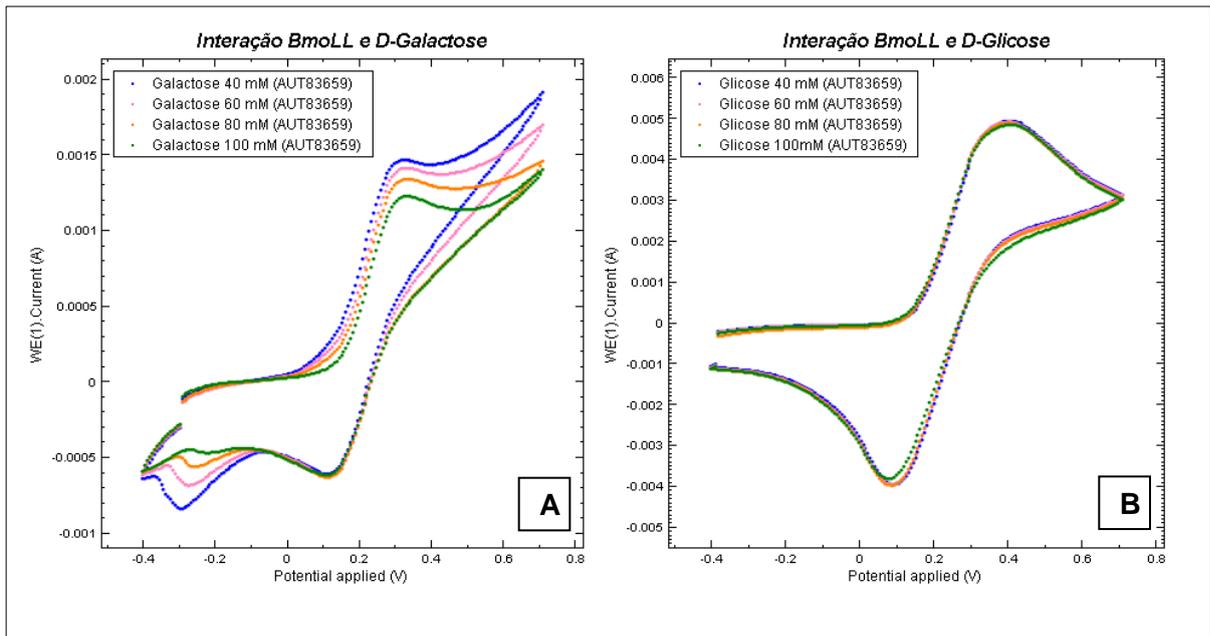


Figura 5: Voltamogramas cíclicos de interação específica de BmoLL e carboidratos com perfil de redução: Interação BmoLL e D-Galactose (A) BmoLL e D-Glicose (B).

Quanto aos estudos de interação eletroquímica envolvendo BmoLL e Glicose, outro carboidrato com perfil de redução, as análises voltamétricas não demonstraram resultados satisfatórios para interação específica deste açúcar com a lectina. Os processos de oxidação e redução não mudaram com o aumento da concentração de D-Glicose, bem como não conseguimos ver um potencial de redução mantido ao interagir com BmoLL igualmente foi detectado nos experimentos realizados com galactose.

Conseguimos observar com clareza, ao verificar que os picos de corrente catódica e anódica não mudam com aumento de Glicose na solução eletrolítica, mantendo-se parcialmente constante. Além disso, mesmo possuindo perfil de redução, as correntes catódicas não se manifestaram duplicadas como observado com galactose (figura 5 b).

Frequentemente, análises de interação eletroquímica específica de carboidratos redutores com biomoléculas demonstram um maior potencial de pico anódico em ensaios voltamétricos. Em muitos casos essas correntes catódicas tendem a vir duplicadas e isso pode ser utilizado como parâmetro de caracterização de processos de interação de proteínas específicas a carboidratos com perfil de redução (BASSI, *et. al.*, 1999).

Caracterização eletroquímica por Voltametria Cíclica da interação BmoLL /Bactérias endofíticas de *B. monandra*

As análises de interação das estirpes endofíticas e BmoLL por Voltametria Cíclica seguiram inicialmente do gênero *Bacillus spp.* e seguindo-se por *Burkholderia* e *Enterobacter spp.*, respectivamente. Partindo dos parâmetros voltamétricos de potencial e corrente, as diferentes concentrações de células bacterianas foram testadas no eletrodo funcionalizado com BmoLL.

Os resultados obtidos nos ensaios com *Bacillus spp.* nos mostraram a necessidade de uma maior concentração de bactérias para ocorrer um processo de interação mais específico com BmoLL. Entretanto, podemos detectar este evento ao comparar os voltamogramas cíclicos obtidos das diferentes concentrações, onde conseguimos verificar uma diminuição significativa dos processos redox a medida que aumentamos a concentração de células nas suspensões bacterianas.

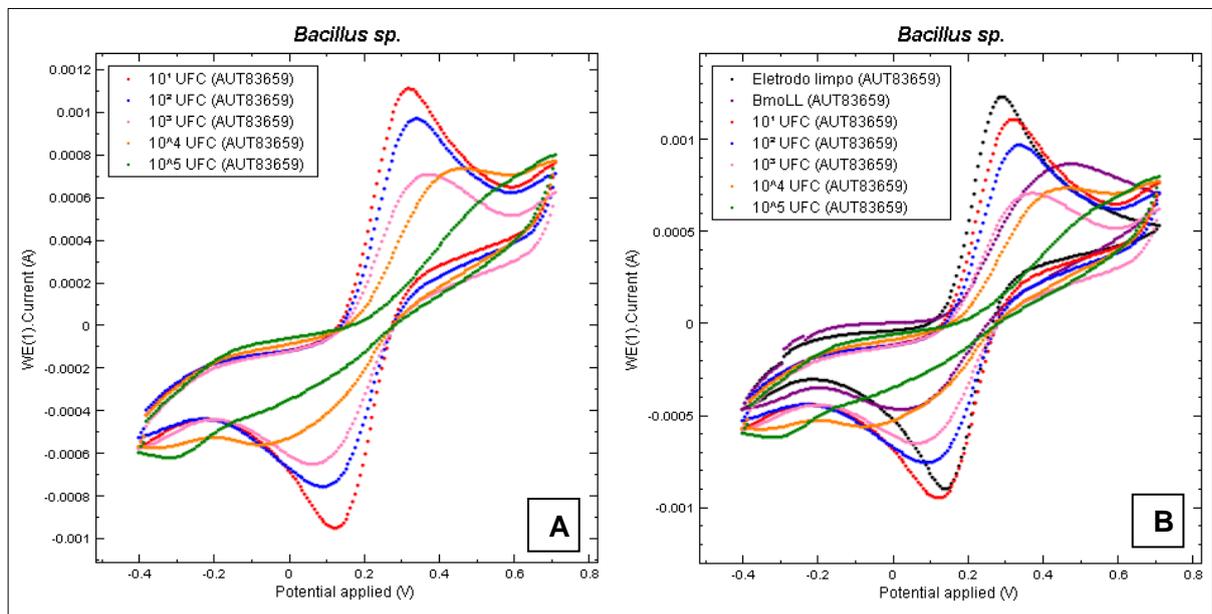


Figura 6: Voltamogramas cíclicos da interação BmoLL e estirpe endofítica *Bacillus spp.*: Interação das células bacterianas em diferentes concentrações com BmoLL (A). Comparativo do perfil de interação das bactérias com BmoLL imobilizada e eletrodo limpo(B).

A diminuição sequencial dos picos de corrente catódica (i_{pc}) e anódica (i_{pa}) é um fator que demonstra a presença de analito em solução sendo detectado pelo seu biorreceptor. Neste caso podemos perceber nitidamente a diminuição dos processos de oxidação e redução do par redox Fe^{3+}/Fe^{2+} na interface eletrodo/solução a

medida que aumentamos a concentração de endófitos, demonstrando assim uma tendência inicial de interação com BmoLL em baixas concentrações na faixa de 10^1 UFC/mL⁻¹ e de forma bastante específica nas maiores concentrações o equivalente a 10^8 UFC/mL⁻¹ (figura 6 a).

Para as suspensões de *Bacillus spp.* foi necessário de concentrações bem mais elevadas para início de interação com BmoLL em comparação as outras estirpes. Podemos perceber esse fenômeno observando que, a diminuição dos picos catódicos e anódicos no voltamograma foi apenas constatada a partir das concentrações equivalente a 10^3 UFC/mL⁻¹ comparando-se com os resultados de adsorção de BmoLL no eletrodo quimicamente modificado (Figura 6 b).

Um detalhe a ser observado nesse sentido, refere-se ao fato de que bactérias do gênero *Bacillus* comumente são colonizadoras de raízes e muitas vezes são encontradas de forma endofítica em tecido foliar através de movimentação através de vasos condutores de seiva bem como através de processos de coevolução vegetal promovido principalmente pelo processo de dispersão de sementes

Para o gênero *Burkholderia spp.*, foi possível constatar uma maior interação se comparado com os resultados com *Bacillus spp.* Isso porque, para gerar uma interferência nos processos redox a ser detectado na interface eletrodo/solução, as menores concentrações de bactérias (equivalente a 10^1 UFC/mL⁻¹) foi necessária. Esse processo pode ser evidenciado de forma clara quando comparamos o voltamograma de menor concentração bacteriana e os resultados obtidos para eletrodo limpo e BmoLL adsorvida (figura 7 b).

Podemos também perceber nitidamente que, a medida que aumentamos as concentrações de endófitos em cada análise, os picos de corrente catódicos e anódicos diminuem de forma linear, demonstrando a interação das células bacterianas com BmoLL (figura 7 a).

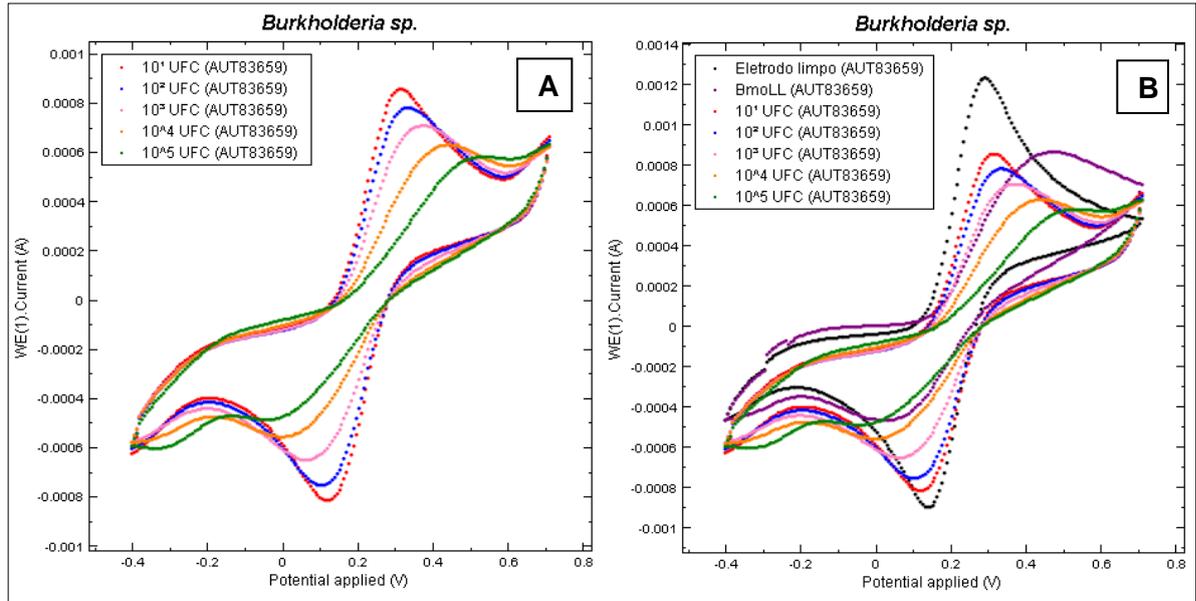


Figura 7: Voltamogramas cíclicos da interação BmoLL e estirpe endofítica *Burkholderia spp.*: Perfil de interação das células bacterianas em diferentes concentrações com BmoLL (A). Comparativo do perfil de interação das bactérias com BmoLL imobilizada e eletrodo limpo (B).

Nas análises realizadas com a estirpe de *Enterobacter spp.* foi possível observar um maior grau de interação com BmoLL. As interferências nos processos redox na interface eletrodo solução foram detectadas imediatamente em baixas concentrações de células bacterianas (figura 8 a). As diminuições dos picos catódicos e anódicos foram detectadas de forma linear semelhante as análises realizadas com *Burkholderia spp.*

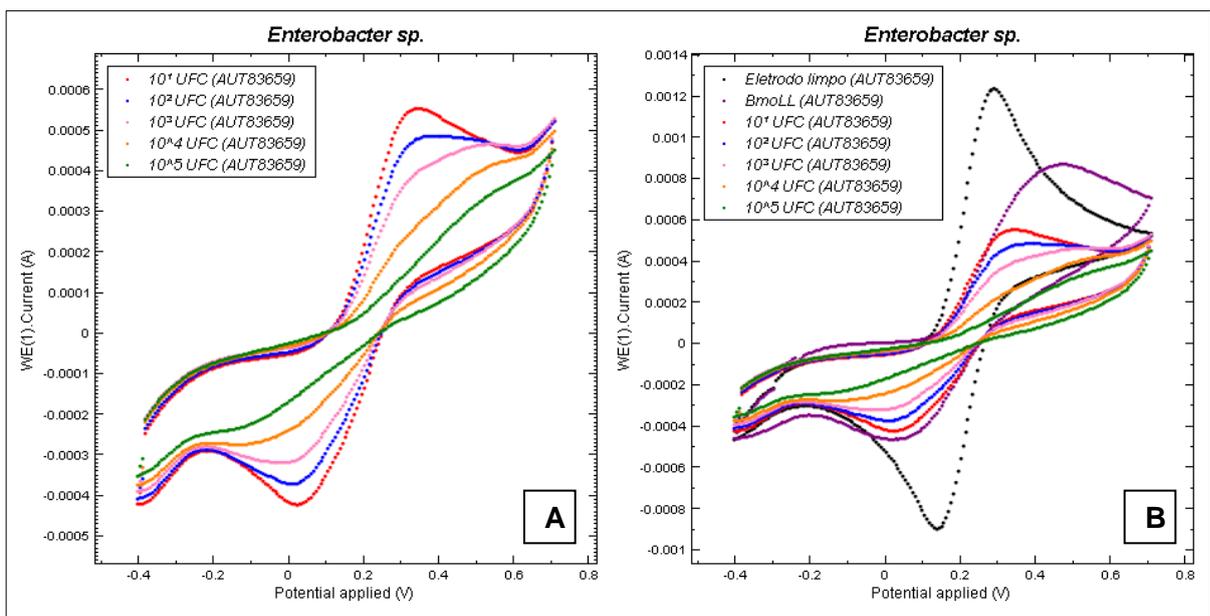


Figura 8: Voltamogramas cíclicos da interação BmoLL e estirpe endofítica *Enterobacter spp.*: Perfil de interação das células bacterianas em diferentes concentrações com BmoLL (A). Comparativo do perfil de interação das bactérias com BmoLL imobilizada e eletrodo limpo (B).

Todavia, se compararmos com os picos de corrente catódicos e anódicos de eletrodo limpo e de imobilização de BmoLL, podemos perceber que *Enterobacter spp.* demonstrou maior interação, visto que a distância entre os picos de interação nas variadas concentrações de bactérias foram bem mais reduzidos se comparados aos resultados alcançados para as demais estirpes (figura 7 b).

A nível comparativo, nas maiores concentrações de células bacterianas endofíticas, também podemos observar com clareza a maior interação de *Enterobacter spp.* por BmoLL em comparação aos demais endófitos. Os picos catódicos e anódicos demonstram maior diminuição na oxidação e redução na interface eletrodo solução detectada pela sonda redox utilizada, seguindo de *Enterobacter spp.*, *Bacillus spp.* e *Burkholderia spp.*, respectivamente.

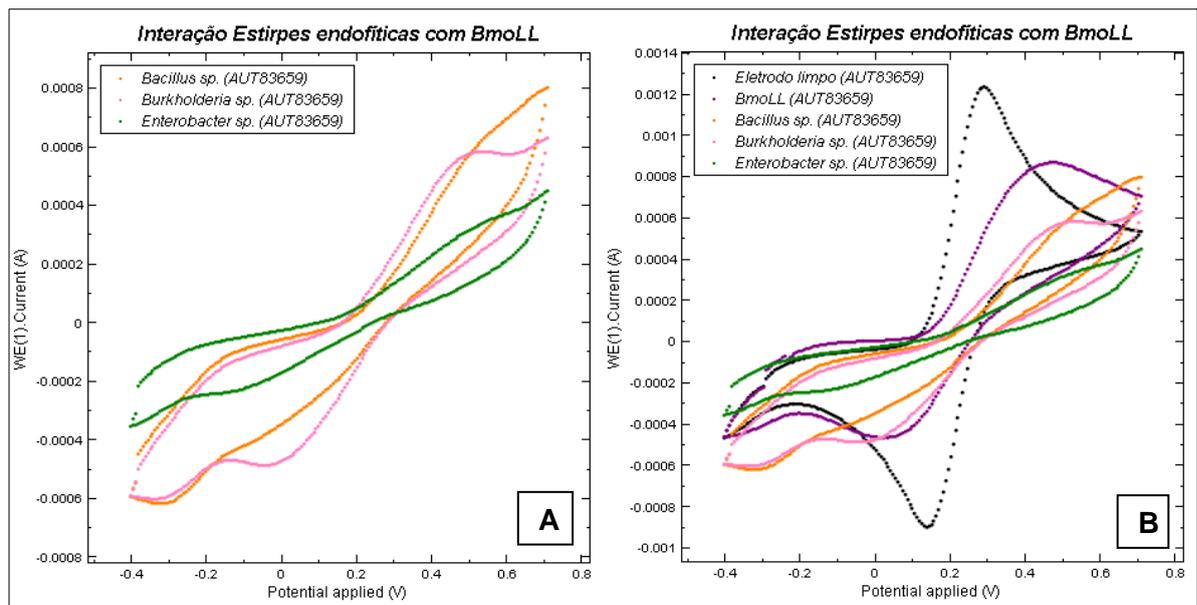


Figura 9: Interação eletroquímica das estirpes de bactérias endofíticas nas concentrações de 10^5 UFC/mL-1 e BmoLL. Voltamogramas do processo de interação de cada uma das estirpes endofíticas (A). Comparação com os resultados obtidos para eletrodo limpo e BmoLL imobilizada (B).

Embora nas maiores concentrações de endófitos do gênero *Bacillus* tenha demonstrado maior interação em comparação a *Burkholderia sp.*, esse processo pode estar relacionado a capacidade de promoção de uma possível defesa biológica induzida ou não por peptídeos, que neste caso seria a lectina. (LACAVA, *et.al.*, 2004). Além disso, *Bacillus spp.*, por ser um gênero amplamente presente na

Rizosfera, sendo este um ambiente de grande competição com agentes patogênicos, poderá se tornar necessário uma grande quantidade de células bacterianas para promoção de defesa, principalmente em mecanismos de indução por proteínas e peptídeos (AZEVEDO, 1998).

Como teste comparativo de interação com as bactérias endofíticas e não-endofíticas, todas as estirpes endofíticas demonstraram maior interação com BmoLL em comparação da estirpe *E. coli* não endofítica. Os resultados obtidos no voltamograma cíclico nos mostra uma grande distância dos picos catódicos e anódicos da interação *E. Coli,q/BmoLL* comparada com Endófitos bacterianos/BmoLL, ambos nas maiores concentrações, o equivalente a 10^5 UFC/mL⁻¹ (figura 10 a).

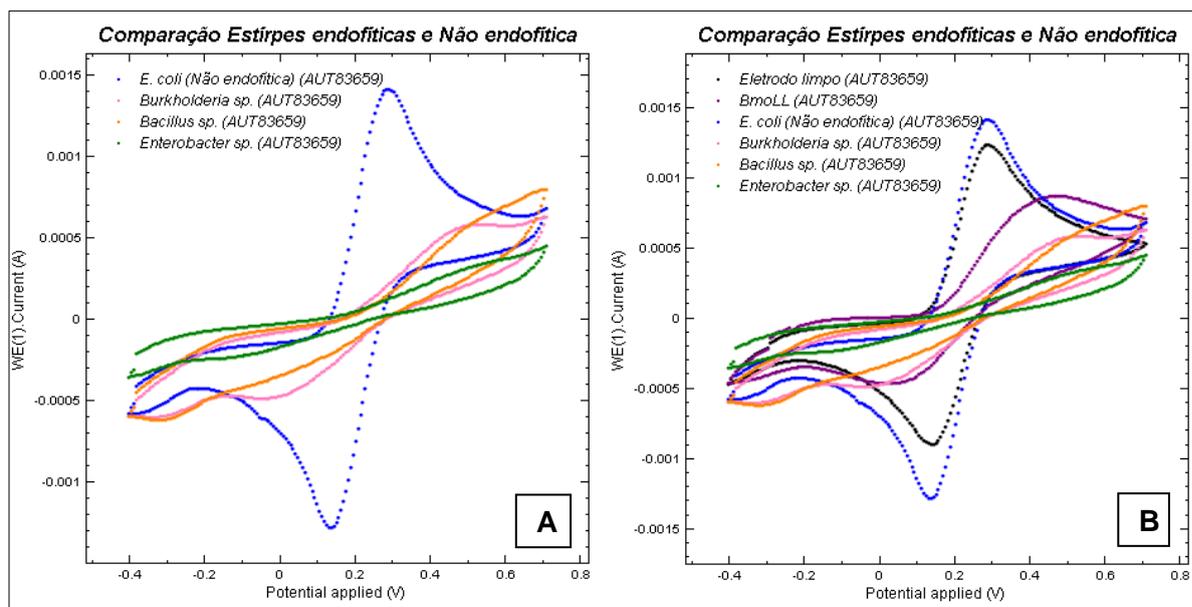


Figura 10: Voltamogramas de Interação eletroquímica entre BmoLL e estirpes bacterianas endofíticas e *E. coli* não-endofítica. Comparação do processo de interação das bactérias em suas maiores concentrações equivalente a 10^5 UFC/mL⁻¹ (A). Comparação entre os resultados eletroquímicos das estirpes, BmoLL imobilizada e eletrodo limpo (B).

Além disso, mesmo em concentrações elevadas, *E. coli* não demonstrou diminuição significativa nos processos redox, onde podemos constatar se compararmos com os resultados de voltametria cíclica para eletrodo limpo e BmoLL imobilizada (figura 10 b).

Um fator determinante para a interação de lectinas com células bacterianas é a capacidade de ligação dessas biomoléculas com ácidos teicóicos e teicurônicos,

peptidoglicanos e lipopolissacarídeos que participam da composição da parede celular do microorganismo. E embora sejam encontrados esses diferentes glicoconjugados nos mais variados gêneros bacterianos, processos de ligação mais específicos podem estar relacionados a uma possível indução de resposta biológica.

Assim podemos então entender o fato da estirpe não-endofítica não se ligar facilmente a BmoLL se comparada aos endófitos, bem como a diferença de potencial de interação entre BmoLL e cada uma das bactérias endofíticas. Com esses resultados, conseguimos então perceber uma especificidade maior de BmoLL para as estirpes endofíticas oriundas de folhas de *B. monandra* em comparação a estirpe não-endofítica.

Conclusão

A lectina específica para galactose BmoLL demonstrou interação específica para todas estirpes bacterianas endofíticas isoladas de folhas de *Bauhinia monandra*, sendo detectado uma especificidade maior pelo gênero *Enterobacter spp.* O perfil de interação de BmoLL por galactose como estratégia de caracterização eletroquímica demonstrou resultados satisfatórios, podendo ser uma metodologia de caracterização adicional as técnicas convencionais existentes.

Torna-se importante observar que a atividade de aglutinação permite especular uma possível relação entre BmoLL e endofíticos das folhas de *Bauhinia monandra* (RAMOS, *et. al.* 2016). E várias lectinas de plantas têm interagido de alguma forma com diferentes patógenos (MACEDO *et al.*, 2007; SOUZA *et al.*, 2011).

Os resultados de atividade aglutinante das células bacterianas endofíticas pela ação de BmoLL demonstraram resultados parecidos com aqueles obtidos por eletroquímica. Foi possível observar a atividade aglutinante de BmoLL em maiores títulos para a estirpe endofítica *Enterobacter spp.* E em paralelo conseguimos detectar uma maior interação específica desta bactéria eletroquimicamente por BmoLL através dos procedimentos realizados por Voltametria Cíclica mesmo em suas menores concentrações.

O fato de BmoLL ter demonstrado interação maior a estirpe do gênero *Enterobacter sp.*, poderia estar relacionado a uma possível indução a resistência

contra o ataque de fitopatógenos microbianos.

Agradecimentos

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Centro Acadêmico de Vitória de Santo Antão (UFPE/CAV) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro para realização da pesquisa.

Referências

ABEDINZADEH, M.; ETESAMI, H.; ALIKHANI, H. A. Characterization of rhizosphere and endophytic bacteria from roots of maize (*Zea mays* L.) plant irrigated with wastewater with biotechnological potential in agriculture. ***Biotechnol Rep (Amst)***, 21:e00305, 2019. doi:10.1016/j.btre.2019.e00305

ALAM, M.; MIYOSHI, S.; TOMOCHIKA, K.; SHINODA, S. Purification and characterization of novel hemagglutinin from *Vibrio mimicus*: a 39-kilodalton major outer membrane protein and lipopolysaccharide. ***Infection and Immunity***, 64:4035-4041, 1996.

ANDRADE, C. A. S.; OLIVEIRA, M. D. L.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; CORREIA M. T. S.; MELO, C. P. Comparison of the interfacial properties of *Eugenia uniflora* and *Triticum vulgare* lectins. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 68:7-12, 2009.

ANDRADE, C. A. S.; OLIVEIRA, M. D. L.; MELO, C. P.; COELHO, L. C. B. B.; CORREIA, M. T. S.; NOGUEIRA, M. L.; SINGH, P. R.; ZENG, X. Diagnosis of dengue infection using a modified gold electrode with hybrid organic–inorganic nanocomposite and *Bauhinia monandra* lectin. ***Journal of Colloid and Interface Science***, 362:517–523, 2011.

ARAÚJO, W. L.; MARCON, J.; MACCHERONI, W.; ELSAS, J. D. van; VUURDE, J. W. L. van; AZEVEDO, J. L. Diversity of endophytic bacterial populations and their

interações com *Xylella fastidiosa* in Citrus Plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, 68:10, 4906-4914, 2002.

AZEVEDO, J. L., **Microorganismos endofíticos**. In: Ecologia Microbiana. MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). Editora EMBRAPA, Jaguariúna, 12:117-137, 1998.

BASSI, A. S.; TANG, D.; BERGOUGNOU, M. A. 1999. Mediated amperometric biosensor for glucose-6-phosphate monitoring based on entrapped glucose-6-phosphate dehydrogenase, Mg ions, tetracyanoquinodimethane, and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate in carbon paste. **Analytical Biochemistry**, 268(2):223-228, 1999.

COELHO, L. C. B. B.; SILVA, M. B. R. Simple method to purify milligram quantities of the galactose-specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*. **Phytochemical Analysis**, 11:295-300, 2000.

COELHO, L. C. B. B.; SILVA, P. M. S.; LIMA, V. L. M.; PONTUAL, E. V.; PAIVA, P. M. G.; NAPOLEÃO, T. H.; CORREIA, M. T. S. Lectins, interconnecting proteins with biotechnological/pharmacological and therapeutic applications, Evidence in: **Based Complementary Alternative Medicine**, 2017:1-22, 2017.

DINIZ, F. B.; UETA, R. R.; PEDROSA, A. M. C., AREIAS, M. C., PEREIRA, V. R. A., SILVA, E. D.; SILVA, J. G., FERREIRA, A. G. P. GOMES, Y. M. Impedimetric evaluation for diagnosis of Chagas' disease: antigen-antibody interactions on metallic electrodes. **Biosensors and Bioelectronics**, 19(2, 15):79-84, 2003.

DINIZ, F. B.; UETA, R. R. Platinum oxidation and its effect on Concanavalin A adsorption. **Electrochimica Acta**, 49:4281-4286, 2004.

PEREIRA, E. M. A.; SIERAKOWSKI, M. R.; JÓ, T. A.; MOREIRA, R. A.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O.; FRANÇA, R. F. O.; FONSECA, B. A. L.; PETRI, D. F. S. Lectins and/or xyloglucans/alginate layers as supports for immobilization of dengue virus particles. **Colloids and surfaces Biointerfaces**, 66(1): 45-52, 2008.

FERNANDES, A. J. D.; FERREIRA, M. R. A.; RANDAU, K. P.; SOUZA, T. P.; SOARES, L. A. L. Total flavonoids content in the raw material and aqueous extractives from *Bauhinia monandra* Kurz (Caesalpinaceae). **The Scientific World Journal**, 1:1-7, 2012.

FURTADO, R. F.; ALVES, C. R.; MOREIRA, A. C.; AZEVEDO, R. M.; DUTRA, R. F. A novel xyloglucan film-based biosensor for toxicity assessment of ricin in castor seed meal. **Carbohydr Polym**, 89(2):586-9, 2012. doi: 10.1016/j.carbpol.2012.03.053. Epub 2012.

GABIUS, H. J.; et al. The sugar code: functional lectinomics. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, 1572(2-3):165-177, 2002.

GAO, M.; TEPLITSKI, M.; ROBINSON, J.; BAUER, W. D. Production of substances by *Medicago truncatula* that affect bacterial quorum sensing. **Mol. Plant-Microbe Interact**, 16:827-834, 2003.

GUZMÁN-PARTIDA, A. M., ROBLES-BURGUEÑO, M. R., ORTEGA-NIEBLAS, M., VÁZQUEZ-MORENO, I. Purification and characterization of complex carbohydrate specific isolectins from wild legume seeds: *Acacia constricta* is (vinorama) highly homologous to *Phaseolus vulgaris* lectins. **Biochimie**, 86(4-5):335-342, 2004.

HARDIVILLÉ, S.; HART, G. W. Nutrient regulation of signaling, transcription, and cell physiology by O-GlcNAcylation. **Cell Metab**, 20:208–213, 2014.

HELMHOLZ, H.; NAATZ, S.; LASSEN, S.; PRANGE, A. Isolation of a cytotoxic glycoprotein from the Scyphozoa *Cyanea lamarckii* by lectin-affinity chromatography and characterization of molecule interactions by surface plasmon resonance. **Journal of Chromatography**, 871:60-66, 2008.

IODACHE, F.; IONITA, M.; MITREA, L. I.; FAFANEATA, C.; POP, A. **Antimicrobial and Antiparasitic Activity of Lectins Antimicrobial and Antiparasitic Activity of Lectins**, n. February, 2015.

KANEKO, Y.; NIMMERJAHN, F.; RAVETCH, J. V. Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. **Science**, 313: 670–673, 2006.

LACAVA, P. T.; ARAÚJO, W. L.; MARCON, J.; MACCHERONI JÚNIOR, W.; AZEVEDO, J. L. Interaction between endophytic bacteria from citrus plants and the phytopathogenic bacteria *Xylella fastidiosa*, causal agent of citrus-variegated chlorosis. **Letters in Applied Microbiology**, 39:55–59, 2004. doi:10.1111/j.1472-765X.2004.01543.x

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, 193(1):265-75, 1951.

MACEDO, M. L. R.; FREIRE, M. G. M.; SILVA, M. B. R.; COELHO, L. C. B. B. Insecticidal action of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotes subfasciatus* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Comp. Biochem. Physiol. Part A: Mol. Integr. Physiol**, 146:486-498, 2007.

MURDOCK, L. L.; SHADE, R. E. Lectins and protease inhibitors as plant defenses against insects. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50(22):6605-6611, 2002.

OLIVEIRA, M. D. L.; NOGUEIRA, M. L.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B.; ANDRADE, C. A. S. Detection of dengue virus serotypes on the surface of gold electrode based on *Cratylia mollis* lectin affinity. **Sensors and Actuators**, 155:789-795, 2011a.

OLIVEIRA, M. D. L. et al. Impedimetric biosensor based on self-assembled hybrid cystein-gold nanoparticles and CramoLL lectin for bacterial lipopolysaccharide recognition. **Journal of Colloid and Interface Science**, 362(1):194–201, 2011b.

PEUMANS, W. J.; Van DAMME, E. J. M. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**, 109(2):347-352, 1995.

RATANAPO, S.; NGAMJUNYAPORN, W.; CHULAVATNATOL, M. Interaction of a mulberry leaf lectin with a phytopathogenic bacterium, *P. syringae pv mori*. **Plant Sci**, 160:739-744, 2001.

SHARON, N.; LIS, H. How proteins bind carbohydrates: lessons from legume lectins. *J. Agric. Food Chem*, 50:6586–6591, 2002.

SANTOS, A. F. S.; NAPOLEÃO, T. H.; BEZERRA, R. F.; CARVALHO, E. V. M. M.; CORREIA, M. T. S.; PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. B. B. Strategies to Obtain Lectins from Distinct Sources. In: **Advances in Medicine and Biology**, 63(2):33-60, 2013.

SILVA, C. D. C.; CORIOLANO, M. C.; LINO, M. A. S.; MELO, C. M. L.; BEZERRA, R. S.; CARVALHO, E. V. M. M.; SANTOS, A. J. G.; PEREIRA, V. R.; COELHO, L. C. B. B. Purification and characterization of a mannose recognition lectin from *Oreochromis niloticus* (Tilapia Fish): cytokine production in mice splenocytes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 166:424-435, 2012.

SILVA, P. M.; SILVA, B. R.; SILVA, J. N. O.; MOURA, M. C. M.; SOARES, T.; FEITOSA, A. P. S.; BRAYNER, F. A.; ALVES, L. C.; PAIVA, P. M. G.; DAMBORG, P.; INGMER, H.; NAPOLEÃO, T. H. Punica granatum sarcotesta lectin (PgTeL) has antibacterial activity and synergistic effects with antibiotics against β -lactamase-producing *Escherichia coli*. **International Journal of Biological Macromolecules**, 135:931–939, 2019.

SOUZA, S. R.; CORREIA, M. T. S.; PESSOA, M. M. A.; KENNEDY, J. F.; LIMA-FILHO, J. L.; COELHO, L. C. B. B. A novel model to characterize the electric double layer of lectins from *Cratylia mollis* (Camaratu bean) and *Canavalia ensiformis* adsorbed on metallic surface. **Carbohydrate Polymers**, 46:191-193, 2001.

VAZQUEZ, L.; JARAMILLO, L.; LASCURAIN, R.; COOPER, E. L.; ROSASI, P.; GENTENO, E. Bacterial Agglutination by the Sialic Acid Specific Serum Lectin From *Macrobrachium rosenbergii*. **Comp. Biochem. Physiol**, 113B(2):355-359, 1996.

4 CONCLUSÕES

- Com os resultados obtidos, foi possível definir a interação da lectina BmoLL com as estirpes bacterianas endofíticas isoladas de folhas de *Bauhinia monandra*;
- O mecanismo de interação eletroquímica entre a lectina BmoLL e as estirpes bacterianas, pode ser um método adicional para caracterização eletroquímica de lectinas em grandes quantidades de amostra protéica purificada;
- As diferenças no processo de interação detectados no ensaio de aglutinação, bem como nas análises eletroquímicas, demonstraram uma maior interação de BmoLL pela estirpe endofítica *Enterobacter sp.*;
- Diante de resultados consultados na literatura sobre a capacidade de endófitos do gênero *Enterobacter sp.* promoverem mecanismos de combate a fitopatógenos, acredita-se que a interação específica por BmoLL esteja relacionada a um possível mecanismo de indução a resistência contra agentes fitopatogênicos;
- Testes para verificação da capacidade de BmoLL promover indução a resistência Sistêmica a endofíticos, pode ser um possível mecanismos de defensivo agrícola no futuro;
- Estudos de bioinformática, como proteômicos e metabolômicos, podem ser promissores para o entendimento dos possíveis mecanismos envolvidos entre lectina e bactérias endofíticas e suas aplicações.

5 SÚMULA CURRICULAR

- Curso de aperfeiçoamento **PCR em tempo real - Técnicas em Biologia Molecular II**. (Carga horária: 60h). Núcleo de Aprimoramento Científico, NACIENTÍFICO, Brasil;
- Curso de aperfeiçoamento **Técnicas em Biologia Molecular I**. (Carga horária: 60h). Núcleo de Aprimoramento Científico, NACIENTÍFICO, Brasil;
- Curso de aperfeiçoamento **Sequenciamento de DNA (SANGER) - Técnicas em Biologia Molecular III**. (Carga horária: 60h). Núcleo de Aprimoramento Científico, NACIENTÍFICO, Brasil;
- Curso de aperfeiçoamento **Técnicas em Cultura Celular**. (Carga horária: 60h). Núcleo de Aprimoramento Científico, NACIENTÍFICO, Brasil;
- Curso de aperfeiçoamento **Análise de DNA em Softwares**. (Carga horária: 60h). Núcleo de Aprimoramento Científico, NACIENTÍFICO, Brasil;
- Minicurso **Biossensores: Alternativa de Diagnóstico para a COVID-19**. (Carga horária: 2h). Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil;
- 6° Encontro Brasileiro em Inovação Terapêutica – 6° **EBIT**. Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil;
- Curso **Soluções biotecnológicas aplicadas às ações de enfrentamento à COVID-19**. (Carga horária: 45h). Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil.
- **IX Curso de Inverno em Genética e Biologia Molecular**. (Carga horária: 10h). Universidade Estadual de Santa Cruz, UESC, Brasil.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, C. A. S.; BASZKIN, A.; MAGALHÃES, N. S. S.; COELHO, L. C. B. B.; MELO, C. P. Dielectric properties of Bauhinia monandra and Concanavalin A lectin monolayers, part I. **Journal of Colloid and Interface Science**. v. 289, p.371–378. 2005.
- ANDRADE, C. A. S.; OLIVEIRA, M. D. L.; MELO, C. P.; COELHO, L. C. B. B.; CORREIA, M. T. S.; NOGUEIRA, M. L.; SINGH, P. R.; ZENG, X. Diagnosis of dengue infection using a modified gold electrode with hybrid organic–inorganic nanocomposite and *Bauhinia monandra* lectin. **Journal of Colloid and Interface Science**. v. 362, p. 517–523. 2011.
- ALMEIDA, E. R.; GUEDES, M. C.; ALBUQUERQUE, J. F. C.; XAVIER, H. Hypoglycemic effect of *Bauhinia cheilandra* in rats. **Fitoterapia**. v. 77, p. 276-278. 2006.
- ANTOUN, H.; BEAUCHAMP, C. J.; GOUSSARD, N.; CHABOT, R.; LALANDE, R. Potencial of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacterian on non-legumes: Effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). **Plant Soil**. v. 204, p. 57-67, 1998.
- ARAVIND, N. et al. Screening of endophytic bacteria and evaluation of selected isolates for suppression of burrowing nematode (*Radopholus similis* Thorne) using three varieties of black pepper (*Piper nigrum* L.). **Crop Protection**. v. 29, n. 4, p. 318-324, 2010.
- ARDUINI, F. et al. Electrochemical biosensors based on nanomodified screen-printed electrodes: Recent applications in clinical analysis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**. v. 79, p. 114-126, 2016.
- AVELINO, K. Y. P. S. **Desenvolvimento de biossensores eletroquímicos baseados em nanoestruturas para o diagnóstico ultrasensível do oncogene quimérico BCRL/ABL**. Dissertação (mestrado em Bioquímica e Fisiologia) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências – Recife, 162 f. 2017.
- ARAÚJO, R. G. V. **Potencial de bactérias endofíticas para promoção de crescimento em couve da folha (*Brassica oleracea* var. *acephala*)**. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Agronomia) – Centro de Ciências Agrárias, Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, 67 f. 2019.
- ARAÚJO, W. L.; LIMA, A. O. S.; AZEVEDO, J. L.; MARCON, J.; SOBRAL, J. K.; LACAVA, P. T. **Manual: Isolamento de Microrganismos Endofíticos**. 1ª ed. São Paulo: CALQ. 2002.
- ARAÚJO, W. L.; MARCON, J.; MACCHERONI, W.; ELSAS, J. D.; VUURDE, J. W. L.; AZEVEDO, J. L. Diversity of endophytic bacterial populations and their interações com *Xylella fastidiosa* in Citrus Plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington. v. 68, n.10, p. 4906-4914, 2002.

ASGHAR, H. N.; ZAHIR, Z.A.; ARSHAD, M.; KHALIQ, A. Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth- -promoting activities in *Brassica juncea* L. **Biology and Fertility of Soils**, v.35, n.4 , p.231-237, 2002.

AZEVEDO, J. L., **Microorganismos endofíticos**. In: Ecologia Microbiana. MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). Editora EMBRAPA, Jaguariúna:, p.117-137, 1998.

AZEVEDO, J. A. Endophytic Fungi from Brazilian Tropical Hosts and Their Biotechnological Applications. In: KHARWAR, RN et al. (eds.). **Microbial Diversity and Biotechnology in Food Security**, Springer India, p. 17-22, 2014.

AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Endophytic fungi of tropical plants: diversity and biotechnological aspects. In: Ganguli, B. N., Deshmukh, S. K. (eds) **Fungi multifacetated microbes**. Anamaya Publishers, New Delhi. p. 189-207, 2007.

AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI, W. J.; ARAÚJO, W. L.; PEREIRA, J. O. Microorganismos endofíticos e seu papel em plantas tropicais. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Biociência: Avanços na agricultura e na agroindústria**, Caxias do Sul: EDUCS, p. 233-268, 2002.

BACILIO-JIMÉNEZ, M.; AGUILAR-FLORES, S.; DELL VALLE, M.; PÉREZ, A.; ZEPEDA, A.; ZENTENO, E. Endophytic bacteria in rice seeds inhibit early colonization of roots by *Azospirillum brasilense*. **Soil Biol. Biochem.** v. 33, p.167-172, 2001.

BANDARA, W. M. M. S; SENEVIRATNE, G.; KULASOORIYA, S. A. Interactions among endophytic bacteria and fungi: effects and potentials. **Journal of Biosciences**, v.31, n.5, p. 645-650, 2006.

BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications**. 2ª edição. New York: Ed. Wiley India, 827p, 2006.

BARRETTI, P. B.; SOUZA, R. M.; POZZA, E. A. Bactérias endofíticas como agentes promotores do crescimento de plantas de tomateiro e de inibição in vitro de *Ralstonia solanacearum*. **Ciência e Agrotecnologia**. v. 32, n. 3, p. 731-739, 2008.

BORGES, F. I.; MENDONÇA, M. S. Morfo-anatomia da semente de *Bauhinia monandra* Kurz. (Leguminosae-caesalpinioideae). **Rev. Bras. Sementes**, v. 31, p. 24-32, 2009.

BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O. **Electrochemistry: Principles, Methods, and Applications**. New York: Ed. Oxford University Press, 464p, 1993.

CAMACHO, N.N. **Expressão heteróloga da lectina de *Bauhinia forficata* Link em *Escherichia coli* e efeito sobre linhagens celulares tumorais**. Dissertação (Mestrado em Biociência) Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 71 f. 2007.

CARVALHO, L. A.; ANDRADE, A. R.; BUENO, P. R. **Espectroscopia de impedância eletroquímica aplicada ao estudo das reações heterogêneas em**

ânodos dimensionalmente estáveis. Química Nova, v. 29, n. 4, p. 796-804, 2006.

CASTRO NETO, J. H. R. **Histoquímica com lectinas em diagnóstico de Hiperplasia Prostática Benígna e Adenocarcinoma Prostático Humanos.** Dissertação (Mestrado em Patologia) Universidade Federal de Pernambuco – Recife – PE, 32 f. 2008.

CAVADA, B. S.; BARBOSA, T.; ARRUDA, S.; GRANGEIRO, T. B.; BARRAL NETTO, M. 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, 2001.

CHABOT, R.; ANTOUN, H.; CESCAS, M. P. Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli. **Plant Soil.** v. 184, p. 311-321, 1996.

CHARUNGCHITRAK, S.; PETSOM, A.; SANGVANICH, P.; KARNCHANATAT, A. Antifungal and antibacterial activities of lectin from the seeds of Archidendron jiringa Nielsen. **Food Chemistry.** v. 126, p. 1025–1032, 2011.

CHAUHAN, N. et al. An electrochemical sensor for detection of neurotransmitteracetylcholine using metal nanoparticles, 2D material and conducting polymer modified electrode. **Biosensors and Bioelectronics,** v. 89, p. 377-383, 2017.

CHEN, S. et al. Gold nanoelectrodes of varied size: transition to molecule-like charging. **Science,** v. 280, n. 5372, p. 2098-2101, 1998.

CHEVION, S.; ROBERTS, M. A.; CHEVION, M. The use of cyclic voltammetry for the evaluation of antioxidant capacity. **Free Radical Biology and Medicine,** v. 28, n. 6, p. 860- 870, 2000.

COELHO, L. C. B. B.; SILVA, M. B. R. Simple method to purify milligram quantities of the galactose-specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*. **Phytochemical Analysis.** v.11, p. 295-300, 2000.

COELHO, L. C. B. B.; SILVA, P. M. S.; LIMA, V. L. M.; PONTUAL, E. V.; PAIVA, P. M. G.; NAPOLEÃO, T. H.; CORREIA, M. T. S. Lectins, interconnecting proteins with biotechnological/pharmacological and therapeutic applications, Evidence in: **Based Complementary Alternative Medicine,** v. 2017, p.1-22, 2017.

COMPANT, S., NOWAK, J., COENYE, T., CLÉMENT, C.; AIT BARKA, E. Diversity and occurrence of burkholderiaspp. In the natural environment. **Fems microbiology reviews,** v. 32 n.4, p. 607–626, 2008. DOI:10.1111/J.1574-6976.2008.00113.X

CONGUR, G. et al. Zinc Oxide Nanowire Decorated Single-Use Electrodes for Electrochemical DNA Detection. **Journal of the American Ceramic Society.** v. 98, n. 2, p. 663-668, 2015.

CONTI, R.; GUIMARAES, D. O.; PUPO, M. T. Aprendendo com as interações da

natureza: microrganismos simbiotes como fontes de produtos naturais bioativos. **Cienc. Cult.** v. 64, n.3, p.43-47. 2012.

CORREIA DE SÁ, A. I. **Processos Anódicos no Sistema Cobre/Sulfato.** Dissertação de (Mestrado em Química Física) Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal, 123f. 1992.

CORREIA, M. T. S., COELHO, L. C. B. B. Lectins, carbohydrate recognition molecules: Are they toxic? **Transworld Research Network.** v. Chapter 4, n. 2, p. 37–661, 2008.

COSTA, R. M. P. B.; VAZ, A. F. M.; OLIVA, M. L. V.; COELHO, L. C. B. B.; CORREIA, M. T. S.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G. A new mistletoe *Phthirusa pyrifolia* leaf lectin with antimicrobial properties. **Process Biochemistry.** v. 45, n. 4, p. 526–533, 2010.

CUNHA, C. R. A.; ANDRADE, C. G.; PEREIRA, M. I. A.; CABRAL FILHO, P. E.; CARVALHO JR., L. B.; COELHO, L. C. B. B.; SANTOS, B. S.; FONTES, A.; CORREIA, M. T. S. Quantum dot-Cramoll lectin as novel conjugates to glycobiology. **J Photochem Photobiol B.** v. 178, p. 85-91, 2018. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2017.10.020. Epub 2017 Oct 25. PMID: 29127943.

DAMOS, F. S.; MENDES, R. K; KUBOTA, L.T. **Aplicações de QCM, EIS e SPR na investigação de superfícies e interfaces para o desenvolvimento de (bio) sensores.** Quím. Nova. 27 São Paulo, 2004.

DEY, R. et al. Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. **Microbiological Research.** v. 159, n. 4, p. 371-394, 2004.

DIMKPA, C. et al. Plant-rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. **Plant Cell Environment,** Logan, v. 32, n. 12, p. 1682-1694, 2009.

DINIZ, F. B.; UETA, R. R. Platinum oxidation and its effect on Concanavalin A adsorption. **Electrochimica Acta.** v.49, p. 4281-4286. 2004.

DINIZ, F. B.; UETA, R. R.; PEDROSA, A. M. C., AREIAS, M. C., PEREIRA, V. R. A., SILVA, E. D.; SILVA, J. G., FERREIRA, A. G. P. GOMES, Y. M. Impedimetric evaluation for diagnosis of Chagas' disease: antigen–antibody interactions on metallic electrodes. **Biosensors and Bioelectronics.** v.19, n.2, 15, p. 79-84. 2003.

DRESCH, R. R., LERNER, C. B., MOTHE, B., TRINDADE, V. M. T., HENRIQUES, A.T., VOZÁRI-HAMPE, M.M. **Biological activities of ACL-I and physicochemical properties of ACL-II, lectins isolated from the marine sponge *Axinella corrugate*.** Comparative Biochemistry and Physiology, 2012.

PEREIRA, E. M. A.; SIERAKOWSKI, M. R.; JÓ, T. A.; MOREIRA, R. A.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O.; FRANÇA, R. F.O.; FONSECA, B. A. L.; PETRI, D. F. S. Lectins and/or xyloglucans/alginate layers as supports for immobilization of dengue virus particles. **Colloids and surfaces Biointerfaces.** v. 66, n.1, p. 45-52. 2008.

EVANGELISTA, L. F. B. **Efeito hipoglicêmico da lectina de folhas de bauhinia monandra kurz. (bmoll) em ratos wistar com diabetes mellitus tipo 2.**

Monografia (Graduação em Biotecnologia) Universidade Federal Rural do Semi-árido - Mossoró – RN, 40 f., 2018.

FERNANDES, A. J. D.; FERREIRA, M. R. A.; RANDAU, K. P.; SOUZA, T. P.; SOARES, L. A. L. Total flavonoids content in the raw material and aqueous extractives from *Bauhinia monandra* Kurz (Caesalpiniaceae). **The Scientific World Journal**, v. 1, p. 1-7, 2012.

FLORES, W. A. et al. FATORES QUE INFLUENCIAM A FAUNA DE FORMIGAS QUE FORRAGEIA SOBRE *Bauhinia monandra* KURZ.(LEGUMINOSAE: CAESALPINIOIDEAE) EM ÁREA URBANA. **Revista da Sociedade Brasileira de Arborização Urbana**, v. 12, n. 2, p. 16-26, 2017.

FONSECA, I.; PROENÇA, L.; CAPELO, S. A voltametria cíclica e de varrimento linear unidirecional: suas potencialidades na caracterização de processos de corrosão. **Corrosão e Protecção de Materiais**, v. 34, p. 12-21, 2015.

FRANK, A.; SALDIERNA GUZMÁN, J.; SHAY, J. Transmission of Bacterial Endophytes. **Microorganisms**, [s. l.], v. 5, n. 4, p. 70, 2017. Disponível em: . doi: 10.3390/microorganisms5040070.

FREIRE, M. G. M.; GOMES, V. M.; CORSINI, R. E.; MACHADO, O. L. T.; DESIMONE, S. G.; NOVELLO, J. C.; MARANGONI, S.; MACEDO, M. L. R. Isolation and partial characterization of a novel lectin from *Talisia esculente* seeds that interferes with fungal growth. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 40, p. 61-68, 2002.

FUJII, Y.; KAWSAR, S. M. A.; MATSUMOTO, R.; YASUMITSU, H.; ISHIZAKI, N.; DOGASAKI, C.; HOSONO, M.; NITTA, K.; HAMAKO, J.; TAEI, M.; OZEKI, Y. A Dgalactose- binding lectin purified from coronate moon turban, Turbo (*Lunella coreensis*, with a unique amino acid sequence and the ability to recognize lacto-series glycosphingolipids. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part B, v. 158, p. 30–37, 2011.

GAO, M.; TEPLITSKI, M.; ROBINSON, J.; BAUER, W. D. Production of substances by *Medicago truncatula* that affect bacterial quorum sensing. *Mol. Plant-Microbe Interact.* v. 16, p. 827-834, 2003.

GARCIA, T. V.; KNAAK, N.; FIUZA, L. M. Endophytic bacteria as biological control agents in rice fields. **Agricultural Microbiology**. Arq. Inst. Biol., v. 82, p. 1-9, 2015.

GIRI, R.; DUDEJA, S.S. Root Colonization of Root and Nodule Endophytic Bacteria in Legume and Non Legume Plants Grown in Liquid Medium. *Journal of Microbiology Research and reviews* , v. 1, n. 6, p. 75-82, 2013.

GODINHO, B. T. V. **Isolamento, identificação e antagonismo de fungos endofíticos de *Eremanthus sp.*** Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola)

Universidade Federal de Lavras – Minas Gerais. 47 f. 2016.

GOVAN, J. R.; BROWN, P. H.; MADDISON, J.; DOHERTY, C. J.; NELSON, J. W.; DODD, M.; GREENING, A. P.; WEBB, A. K. Evidence for transmission of *Pseudomonas cepacia* by social contact in cystic fibrosis. **Lancet**. v. 342(8862), p. 15-9, 1993. doi: 10.1016/0140-6736(93)91881-I.

GOVAN, J. R.; HUGHES, J. E.; VANDAMME P. *Burkholderia cepacia*: medical, taxonomic and ecological issues. **J Med Microbiol**. v. 45(6), p. 395-407, 1996. doi: 10.1099/00222615-45-6-395.

GRAY, E. J.; SMITH, D. L. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plantbacterium signaling processes. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 37, n. 3, p. 395-412, 2005.

GUO, B. et al. Bioactive natural products from endophytes: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, Moscow, v. 44, n. 1, p. 136-142, 2008.

GUZMÁN-PARTIDA, A. M., ROBLES-BURGUEÑO, M. R., ORTEGA-NIEBLAS, M., VÁZQUEZ-MORENO I. Purification and characterization of complex carbohydrate specific isolectins from wild legume seeds: *Acacia constricta* is (vinorama) highly homologous to *Phaseolus vulgaris* lectins. **Biochimie**, v. 86, n. 4-5, p. 335-342, 2004.

HALLMANN J.; QUADTHALLMANN, A.; MAHAFFEE, W.F.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Can J Microbiol**, v. 43, p. 895-914, 1997.

HAMID, R.; MASOOD, A.; WANI, I. H.; RAFIQ, S. Lectins: Proteins with Diverse Applications ARTICLE INFO ABSTRACT. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**. v. 3, n. 4, p. 93–103, 2013.

HAMSHOU, M., VAN DAMME, E. J. M.; SMAGGHE, G. Entomotoxic effects of fungal lectin from *Rhizoctonia solani* towards *Spodoptera littoralis*. **Fungal Biology**. v. 114, p. 34-40, 2010

HANADA, R.; ROMEIRO, R. Seleção preliminar de rizobactérias como promotoras de crescimento e como indutoras de resistência sistêmica a *Xanthomonas campestris* em girassol. **Fitopatologia Brasileira**. v. 23, n. 1, p. 209 (abstract), 1998.

HARDOIM, P. R. et al. The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 79, n. 3, p. 293-320, 2015.

HARRIS, D.C. **Análise Química Quantitativa**. 5 ed. Rio de Janeiro: LTC-Livros Técnicos e Científicos, 862 p. 2001.

HAYAT, R. et al. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. **Annals of Microbiology**, Milan, v. 60, n. 4, p. 579-598, 2010.

HIRABAYASHI, J.; KUNO, A.; TATENO, H. Lectin-based structural glycomics : A practical approach to complex glycans. **Electrophoresis**, v. 32, p. 1118–1128, 2011.

- HOLLE, S. V.; SCHUTTER, K.; EGGERMONT, L.; TSANEVA, M.; DANG, L.; VAN DAMME, E. J. M. Comparative Study of Lectin Domains in Model Species : New Insights into Evolutionary Dynamics. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 18, n. 6, p. 1136, 2017.
- HOLLER, F.J.; SKOOG, D.A.; CROUCH, S.R. **Princípios de Análise Instrumental**. 6 ed. São Paulo: Ed. Bookman, 1056 p., 2009.
- HOLMES, A.; GOVAN, J.; GOLDSTEIN, R. Agricultural use of Burkholderia (Pseudomonas) cepacia: a threat to human health? **Emerg Infect Dis**. v. 4(2), p. 221-7, 1998.
- HU, F. P.; YOUNG, J. M. Biocidal activity in plant pathogenic Acidovorax, Burkholderia, Herbaspirillum, Ralstonia and Xanthomonas sp p. **J Appl Microbiol**. v. 84, p. 263–271, 2011.
- ISKRATSCH, T.; BRAUN, A.; PASCHINGER, K.; WILSON, I.B.H. Specificity analysis of lectins and antibodies using remodeled glycoproteins. **Analytical Biochemistry**. v. 386, p. 133–146, 2009.
- JACOBS, C. B.; PEAIRS, M. J.; VENTON, B. J. Review: Carbon nanotube based electrochemical sensors for biomolecules. **Analytica Chimica Acta**, v. 662, n. 2, p. 105-127, 2010.
- JARA-PALACIOS, M. J. et al. Cyclic voltammetry to evaluate the antioxidant potential in winemaking by-products. **Talanta**. v. 165, p. 211-215, 2017.
- JOE, M. M.; ISLAM, M. R.; KARTHIKEYAN, B.; BRADEEPA, K.; SIVAKUMAAR, P. K.; SA, T. Resistance responses of rice blast fungus after seed treatment with the endophytic Achromobacter xylosoxidans AUM54 strains. **Crop Protection**, v. 42, p. 141-148, 2012.
- KHALDI, N. et al. SMURF: genomic mapping of fungal secondary metabolite clusters. **Fungal Genetics and Biology**. v. 47, p. 736– 741, 2010.
- KANG, Y, CARLSON, R, THARPE, W, SCHELL, M. A. Characterization of genes involved in biosynthesis of a novel antibiotic from Burkholderia cepacia BC11 and their role in biological control of Rhizoctonia solani. **Appl Environ Microbiol**. v. 64, n. 10, p. 3939-47, 1998.
- KANG, S.; MILLS, A. L. Soil Bacterial Community structure changes following disturbance of the overlying plant community. **Soil Science**, New Brunswick, v. 169, n. 1, p. 55-65, 2004.
- KASANA, R.C.; SALWAN, R.; DHAR, H.; DUTT, S.; GULATI, S. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using grams iodine. **Current Microbiology**. v. 57, p. 503-507, 2008.

KENNEDY, J. F.; PAIVA, P. M. G.; CORREIA, M. T. S.; CAVALCANTI, M. S. M.; COELHO, L. C. B. B. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydrate Polymers**. v. 26, p. 219-30, 1995.

KHANG, N. Q.; JEAN-LUC, G.; HOEBEKE, J. A blood group A specific lectin from the seeds of *Crotalaria striata*, *Biochim. Biophys. Acta*. v. 1033, p. 210, 1990.

KIMMEL, D. W. et al. **Electrochemical sensors and biosensors**. *Analytical Chemistry*, v. 84, n. 2, p. 685-707, 2011.

KISS, L. et al. Electropolymerized molecular imprinting on glassy carbon electrode for voltammetric detection of dopamine in biological samples. **Talanta**, v. 160, p. 489-498, 2016.

KLOEPPER, J. W.; LEONG, J.; TIENTZE, M.; SCHROTH, M. N. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. **Nature**, v. 286, p. 885-886, 1980.

KOTZ, J. C., TREICHEL, P. M., TOWNSEND, J. R. E TREICHEL, D. A. **Oxidation-Reduction Reactions**. In: **Chemistry and Chemical Reactivity, Instructor's**. 9^a ed., p. 125-131, 2015. Stamford, CT: Cengage Learning.

KUMAR, K. V. K.; YELLAREDDYGARI, S. K. R.; REDDY, M. S.; KLOEPPER, J. W.; LAWRENCE, K. S.; ZHOU, X. G.; SUDINI, H.; GROTH, D. E.; RAJU, S. K.; MILLER, M. E. Efficacy of *Bacillus subtilis* MBI 600 against sheath blight caused by *Rhizoctonia solani* and on growth and yield of rice. **Rice Science**, v. 19, n. 1, p. 55-63, 2012.

LAKHTIN, V.; LAKHTIN, M.; ALYOSHKIN, V. **Lectins of living organisms**. The overview. *Anaerobe*. v. 17, p. 452-455, 2011.

LANDIM, V. P. A. **Desenvolvimento de imunossensor eletroquímico empregando nanohíbrido Pirrol – nanotubos de haloisita para detecção da troponina T cardíaca humana**. 2014. 71 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Centro de Tecnologia e Geociência, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.

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

LANNOO, N.; VAN DAMME, E. J. M. Lectin domains at the frontiers of plant defense. **Frontiers in Plant Science**. v. 5, p. 1–16, 2014.

LASTOCHKINA, O., PUSENKOVA, L., GARSHINA, D., YULDASHEV, R., SHPIRNAYA, I., KASNAK, C. The Effect of Endophytic Bacteria *Bacillus subtilis* and Salicylic Acid on Some Resistance and Quality Traits of Stored *Solanum tuberosum* L. Tubers Infected with *Fusarium Dry Rot*. **Plants** v. 9 p. 738, 2020. doi: 10.3390/plants9060738

LEWIS, G.; SCHIRE, B.; MACKINDER, B.; LOCK, M. **Legumes of the World**. The

Royal Botanic Gardens, Kew, 2005.

LIS, H.; SHARON, N., "Lectins: Carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition". **Chem. Rev.** v. 98, p. 637, 1998.

LIU, B., BIAN, H. J., BAO, J. K. Plant lectins: Potential antineoplastic drugs from bench to clinic. **Cancer Letters.** v. 28, p. 71–12, 2010.

LÓPEZ-VANCELL, R., ESPINOSA, R.A., GONZÁLEZ-CANTO, A., AVENDAÑO, M. N., M.C. LEÓN, G., OLIVOS-GARCÍA, A., LÓPEZ-VANCELL, D., PÉREZ-TAMAYO, R. Entamoeba histolytica: Expression and localization of Gal/GalNAc lectin in virulent and non-virulent variants from HM1:IMSS strain. **Experimental Parasitology.** v. 125, p. 244–250, 2010.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas.** São Paulo: Nova Odessa, 2002.

LUNA, D. M. N. et al. Electrochemical immunosensor for dengue virus serotypes based on 4-mercaptobenzoic acid modified gold nanoparticles on self-assembled cysteine monolayers. **Sensors and Actuators B: Chemical,** v. 220, p. 565-572, 2015.

MACCHERONI, W. J.; ARAÚJO, W. L.; LIMA, A. O. S. Ecologia: habitat e interações fúngicas com plantas, animais, fungos e bactérias. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. Fungos: **Uma introdução à Biologia, Bioquímica e Biotecnologia.** Caxias do Sul: EDUCS, 2004.

MACEDO, M. L. R.; FREIRE, M. G. M.; SILVA, M. B. R.; COELHO, L. C. B. B. Insecticidal action of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotes subfasciatus* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Comp. Biochem. Physiol. Part A: Mol. Integr. Physiol.** v. 146 p. 486-498, 2007.

MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E. **Plantas medicinais,** Viçosa, MG: UFV, Imprensa Universitária, p. 220, 1995.

MASSIMILIANO, M., OFIR, B., KALLIOPE, K. P., HOPKINS, D. L., AND ALEKSA, O. Editorial: role of endophytes in plant health and defense against pathogens. **Front. Plant Sci.** v. 11, p. 1312, 2020. doi: 10.3389/fpls.2020.01312

MASTRETTA, C. et al. Endophytic bacteria from seeds of *Nicotiana tabacum* can reduce cadmium phytotoxicity. **International Journal of Phytoremediation,** Boca Raton, v. 11, n. 3, p. 251-267, 2009.

MENEZES, F. S. et al. Hypoglycemic activity of two Brazilian *Bauhinia* species: *Bauhinia forficata* L. and *Bauhinia monandra* Kurz. **Revista Brasileira de Farmacognosia,** v. 17, p. 8-13, 2007.

MELNICK, R. L. et al. Bacterial endophytes: *Bacillus* spp. from annual crops as potential biological control agents of black pod rot of cacao. **Biological Control**. v. 46, n. 1, p. 46-56, 2008.

MELO, R. O. A. **Isolamento, avaliação e identificação de micro-organismos endofíticos de folhas de *Bauhinia monandra* e suas interações com a lectina de folhas (BmoLL)**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) Universidade Federal de Pernambuco - Centro de Biociências, Recife – Pernambuco, 127 f., 2017.

MILLER, M. C.; KLYOSOV, A. A.; MAYO, K. H. Structural features for α -galactomannan binding to galectin-1. **Glycobiology**. v. 22, p. 543-551, 2012.

MOYNA, P.; HEINZEN, H. Lipídios: química y productos naturales que los contienen. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETRIVICK, P. R. (Ed.). **Farmacognosia, da planta ao medicamento**. Florianópolis: Editora da UFRGS/UFSC, p. 435-466, 2003.

NANDAKUMAR, R.; BABU, S.; VISWANATHAN, R.; RAGUCHANDER, T. & SAMIYAPPAN, R. Induction of systemic resistance in rice against sheath blight disease by *Pseudomonas fluorescens* **Soil Biology Biochem.** v. 33, p. 603-612, 2001.

NASCIMENTO, K. S.; SANTIAGO, M. Q.; PINTO-JUNIOR, V. R.; OSTERNE, V. J. S.; MARTINS, F. W. V.; NASCIMENTO, A. Pa. M.; WOLIN, I. A. V.; HEINRICH, I. A.; MARTINS, M. G. Q.; SILVA, M. T. L.; LOSSIO, C. F.; ROCHA, C. R. C.; LEAL, R. B.; CAVADA, B. S. Structural analysis of Dioclea lasiocarpa lectin : A C6 cells apoptosis-inducing protein. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**. v. 92, p. 79–89, 2017.

NERO, T. L. et al. Oncogenic protein interfaces: small molecules, big challenges. **Nature Reviews Cancer**. v. 14, n. 4, p. 248-262, 2014.

NESAKUMAR, N. et al. Electrochemical acetylcholinesterase biosensor based on ZnO nanocuboids modified platinum electrode for the detection of carbosulfan in rice. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 77, p. 1070-1077, 2016.

NEUMANNA, D., LEHRB, C. M., LENHOFA, H. P., KOHLBACHER, O. Computational modeling of the sugar–lectin interaction. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 56, p. 437– 457, 2004.

NIA, P. M. et al. Electrodeposition of copper oxide/polypyrrole/reduced graphene oxide as a nonenzymatic glucose biosensor. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 209, p. 100-108, 2015.

NICHOLSON, R. S. Theory and application of cyclic voltammetry for measurement of electrode reaction kinetics. **Analytical Chemistry**, v. 37, n. 11, p. 1351-1355, 1965.

OLIVEIRA, A. C. **Efeitos da lectina de folhas de *Bauhinia monandra* (BmoLL) sobre a glicemia, parâmetros bioquímicos e histológicos de ratos wistar com diabetes mellitus tipo 2**. Tese (Doutorado em Biologia e Bioquímica). Universidade

do Estado do Rio Grande do Norte. - Mossoró – RN, 129 p., 2018.

OLIVEIRA, M. D. L.; NOGUEIRA, M. L.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B.; ANDRADE, C. A. S. Detection of dengue virus serotypes on the surface of gold electrode based on *Cratylia mollis* lectin affinity. **Sensors and Actuators**. v. 155, p. 789-795, 2011a.

OLIVEIRA, M. D. L. et al. Electrochemical evaluation of lectin–sugar interaction on gold electrode modified with colloidal gold and polyvinyl butyral. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 66, n. 1, p. 13-19, 2008.

OLIVEIRA, M. D. L. et al. Impedimetric biosensor based on self-assembled hybrid cystein-gold nanoparticles and CramoLL lectin for bacterial lipopolysaccharide recognition. **Journal of Colloid and Interface Science**. v. 362, p. 194–201, 2011b.

OLIVEIRA, W. F.; SANTOS, N. R. M.; CABRERA, M. P.; FERREIRA, S. A. O.; RAPOSO, B. L.; NAPOLEÃO, T. H.; PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. B. B.; CABRAL FILHO, P. E.; FONTES, A.; CORREIA, M. T. S. *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) conjugated with quantum dots as fluorescent nanoprobe for biological studies: application to red blood cells. **Methods Appl. Fluoresc.** v. 8: p. 035009, 2020.

PAJIC, I.; KLJAJIC, Z.; DOGOVIC, N.; SLADIC, D.; JURANIC, Z.; GASIC, M. J. A novel lectin from the sponge *Haliclona cratera*: isolation, characterization and biological activity. **Comparative Biochemistry and Physiology**. Part C; v. 132, p. 213-221, 2002.

PACHECO, W. F. et al. Voltametrias: Uma breve revisão sobre os conceitos. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 4, p. 516-537, 2013.

PAPIK, J.; FOLKMANOVA, M.; POLIVKOVA-MAJEROVA, M.; SUMAN, J.; UHLIK, O. The invisible life inside plants: Deciphering the riddles of endophytic bacterial diversity. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 44, n. August, p. 107614, 2020. Disponível em: . doi: 10.1016/j.biotechadv.2020.107614

PARKE, J. L.; GURIAN-SHERMAN, D. Diversity of the *Burkholderia cepacia* complex and implications for risk assessment of biological control strains. **Annu Rev Phytopathol**. v. 39, p. 225-58, 2001. doi: 10.1146/annurev.phyto.39.1.225.

PARTIDA-MARTINEZ, L. P.; GROTH, I.; SCHMITT, I.; RICHTER, W.; ROTH, M.; HERTWECK, C. *Burkholderia rhizoxinica* sp. nov. and *Burkholderia endofungorum* sp. nov., bacterial endosymbionts of the plant-pathogenic fungus *Rhizopus microsporus*. **Int J Syst Evol Microbiol**. v. 57, p. 2583–2590, 2007.

PENG, H., LV, H., WANG, Y., LIU, Y., LI, C., MENG, L., CHEN, F., BAO, J. *Clematis montana* lectin, a novel mannose-binding lectin from traditional Chinese medicine with antiviral and apoptosis-inducing activities. **Peptides**. v. 30, p. 1805–1815, 2009.

PÉREZ-GARCÍA, A. et al. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agriculture. **Current**

Opinion in Biotechnology. v. 22, n. 1, p. 187-193, 2011.

PERIN, L.; MARTÍNEZ-AGUILAR, L.; CASTRO-GONZÁLEZ, P.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; CABELLOS-AVELAR, T.; GUEDES, H. V.; REIS, V. M.; CABALLERO-MELLADO, J. Diazotrophic *Burkholderia* species associated with field-grown maize and sugarcane. **Appl Environ Microbiol.** v. 72, p. 3103–3110, 2006.

PEUMANS. W. J.; VAN DAMME, E.J.M. Plant lectins: Versatile proteins with important perspectives in biotechnology. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 15, p. 199-228, 1998.

PINTO, M. dos S. T.; RIBEIRO, J. M.; OLIVEIRA, E. A. G. de. O estudo de genes e proteínas de defesa em plantas. **Brazilian Journal of Biosciences.** v. 9, n. 2, p. 241–248, 2011.

PITTNER, E. **Fungos endofíticos de plantas daninhas no controle da mancha marrom do trigo.** Tese (Doutorado em Agronomia,) - Universidade Estadual do Centro-Oeste – Guarapuava. 156 f. 2016.

POVEDANO, E. et al. Decoration of reduced graphene oxide with rhodium nanoparticles for the design of a sensitive electrochemical enzyme biosensor for 17 β -estradiol. **Biosensors and Bioelectronics.** v. 89, p. 343-351, 2017.

QI, G.; ZHANG, X.; ZHAO, X. Endophytic *Bacillus subtilis* WH2 containing *Pinellia ternata* agglutinin showed insecticidal activity against whitebacked planthopper *Sogatella furcifera*. **BioControl**, v. 58, p. 233-246, 2013.

RAJENDRAN, G., SING, F., DESAI, A. J., ARCHANA, G. Enhanced growth and nodulation of pigeon pea by coinoculation of *Bacillus* strains with *Rhizobium* spp. **Bioresour. Technol.** v. 99, n. 11, p. 4544–4550, 2008.

RAMBARUTH, N. D. S.; DWEK, M. V. Cell surface glycan–lectin interactions in tumor metastasis. **Acta Histochemica.** v. 113, p. 591– 600, 2011.

RAMAMOORTHY, V.; VISWANATHAN, R.; RGGUCHANDER, T.; PRACKASAM, V. & SAMIYAPPAN, R. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. **Crop Protec.** v. 20, p. 1-20, 2001.

RAMOS, S. A. F.; SILVA, L. C. N.; CORREIA, M. T. S.; ARAÚJO, J. M.; COELHO, L. C. B. B. Endophytic microorganisms from *Bauhinia monandra* leaves: Isolation, antimicrobial activities and interaction with galactose-specific lectin BmoLL. **African Journal of Microbiology Research.** v. 10, p. 600-607, 2016.

RATANAPO, S.; NGAMJUNYAPORN, W.; CHULAVATNATOL, M. Interaction of a mulberry leaf lectin with a phytopathogenic bacterium, *P. syringae pv mori*. **Plant Sci.** v. 160, p. 739-744, 2001.

REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Living inside plants: bacterial endophytes. **Curr Opin Plant Biol.**, v. 14, n. 4, p. 435-443, 2011.

REIS, N. S. et al. Métodos eletroquímicos usados para avaliação da atividade antioxidante de produtos naturais. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, p. 71-78, 2009.

RESENDE, M. L. V.; BARRETI, P. B.; MEDEIROS, F. C. L.; SILVA, D.; PEREIRA, R. B.; LINS, S. R. O.; PEREIRA, L. M.; CAMPOS, M. A. Percepção e transdução de sinais para a ativação de respostas de defesa em plantas contra patógenos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. v. 15, p. 173-242, 2007.

RITTIDACH, W.; PAIJIT, N.; UTARABHAND, P. Purification and characterization of a lectin from the banana shrimp *Fenneropenaeus merguensis* hemolymph. *Biochimica et Biophysica Acta*. v. 1770, p. 106-114, 2007.

ROCHA, R.; LUZ, D. E.; ENGELS, C.; PILEGGI, S. A. V.; JACCOUD FILHO, D. S.; MATIELLO, R. R.; PILEGGI, M. Selection of endophytic fungi from comfrey (*Symphytum officinale* L.) for in vitro biological control of the phytopathogen *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 73-78, 2009.

ROMEIRO, R. Indução de resistência em plantas e patógenos. Viçosa: UFV, 1999.
ROUHI HR, ABOUTALEBIAN MA, SHARIF-ZADEH F. Effects of hydro and osmopriming on drought stress tolerance during germination in four grass species. **International journal of Agriscience**. v. 1, n. 2, p. 107-114, 2011.

RONKAINEN, N. J.; HALSALL, H. B.; HEINEMAN, W. R. Electrochemical biosensors. **Chem. Soc. Rev.** v. 39, p. 1747-1763, 2010.

SA, S. R.; SILVA JÚNIOR, A. G.; LIMA, R. G.; ANDRADE, C. A. S. OLIVEIRA, M. D. L. Lectin-based impedimetric biosensor for differentiation of pathogenic *Candida* species. **Talanta**. v. 220, p. 121-375, 2020.

SALLES, H. O.; VASCONCELOS, I. M.; SANTOS, L. F. L.; OLIVEIRA, H. D.; COSTA, P. P. C.; NASCIMENTO, N. R. F.; SANTOS, C. F.; SOUSA, D. F.; JORGE, A. R.C.; MENEZES, D. B.; MONTEIRO, H. S. A.; GONDIM, D. M. F.; OLIVEIRA, J. T. A. Towards a better understanding of *Ipomoea asarifolia* toxicity: Evidence of the involvement of a leaf lectin. **Toxicon**. v. 58, p. 502-508, 2011.

SANTOS, O. G.; PEREIRA, R. C. A.; SOUSA, F. J. B.; PAIVA, L. G. G.; BEZERRA, M. G. A. Análise de crescimento de mudas de *Bauhinia monandra*, Kurz. **Horticultura Brasileira**. v. 31 p. 2611 – 2618. 2014.

SANTOS, A. F. S.; NAPOLEÃO, T. H.; BEZERRA, R. F.; CARVALHO, E. V. M. M.; CORREIA, M. T. S.; PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. B. B. Strategies to Obtain Lectins from Distinct Sources. In: **Advances in Medicine and Biology**. v. 63, n. 2, p. 33-60, 2013.

SANTOS, T. T.; VARAVALLO, M. A. Application endophytic microorganisms in agriculture and production of substances of economic interest. Semina: **Ciências Biológicas e da Saúde**. v. 32, p. 199-212, 2011.

SEMENOVA, D.; ZUBOV, A.; SILINA, Y. E.; MICHELI, L.; KOCH, M.; FERNANDES, A. C.; GERNAEY, K. V.. Mechanistic modeling of cyclic voltammetry: A helpful tool for understanding biosensor principles and supporting design optimization. **Sensors and Actuators B: Chemical**. v. 12 p.088, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.snb>.

SESSITSCH, A.; REITER, B.; BERG, G. Endophytic bacterial communities of field-grown potato plants and their plant-growth-promoting and antagonistic abilities. **Can. J. Microbiol.** v. 50, p. 239–249, 2004.

SESSITSCH, A.; REITER, B.; PEIFER, U.; WILHELM, E. Cultivation independent population analysis of bacterial endophytes in three potato varieties based on eubacterial and Actinomycetes-specific PCR of 16S rRNA genes. **FEMS Microbiol. Ecol.** v.39, p. 23–32, 2002.

SHARON, N.; LIS, H. How proteins bind carbohydrates: lessons from legume lectins. *J. Agric. Food Chem.* v. 50, p. 6586–6591. 2002.

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

SILVA, C. D. C.; CORIOLANO, M. C.; LINO, M. A. S.; MELO, C. M. L.; BEZERRA, R. S.; CARVALHO, E. V. M. M.; SANTOS, A. J. G.; PEREIRA, V. R.; COELHO, L. C. B. Purification and characterization of a mannose recognition lectin from *Oreochromis niloticus* (Tilapia Fish): cytokine production in mice splenocytes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 166, p. 424-435, 2012.

SILVA JUNIOR, A. G.; OLIVEIRA, M. D. L.; OLIVEIRA, I. S. ; LIMA-NETO, R. G. ; SÁ, S. R.; FRANCO, O. L.; ANDRADE, C. A. S. A simple nanostructured impedimetric biosensor based on clavanin a peptide for bacterial detection. **Sensors and actuators b-chemical**. v. 255, p. 3267-3274, 2018.

SILVA, J. R., A. Í.; ARAÚJO FILHO, H. C.; SILVA, R. C. **Testes de desempenho de eletrodos: eletrodos de referência**. Química Nova, v. 23, n. 4, 2000.

SILVA, M. D. C. **Aplicações biotecnológicas das lectinas ClaveLL (Cladonia verticillaris Lichen Lectin) E BmoLL (Bauhinia monandra Leaf Lectin)**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) Centro de Biociências - Universidade Federal de Pernambuco – Recife, 211f., 2008.

SILVA, P. M.; SILVA, B. R.; SILVA, J. N. O.; MOURA, M. C. M.; SOARES, T.; FEITOSA, A. P. S.; BRAYNER, F. A.; ALVES, L. C.; PAIVA, P. M. G.; DAMBORG, P.; INGMER, H.; NAPOLEÃO, T. H. Punica granatum sarcotesta lectin (PgTeL) has antibacterial activity and synergistic effects with antibiotics against β -lactamase-producing *Escherichia coli*. **International Journal of Biological Macromolecules**. 135:931–939, 2019.

SILVA, P. M. S. **Desenvolvimento de bioensaios utilizando Cramoll 1,4 como alternativa para o diagnóstico do câncer de próstata**. Tese (Doutorado em

Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Pernambuco, 167 f. Recife, 2019.

SISENANDO, H. A. A. C. Avaliação do potencial de mutagenicidade e toxicidade da lectina hipoglicemiante de folha de bauhinia monandra (pata-de-vaca). **Rev. baiana saúde pública**, 2009.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de química analítica**. Tradução de Marco Tadeu Grassi. 8. ed. São Paulo: Cengage, 1124p., 2005.

SOUZA, C. R. et al. Trocas gasosas de mudas de videira, obtidas por dois porta-enxertos, submetidas à deficiência hídrica. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. DF, v. 36, n. 10, p. 1221-1230, 2001.

SOUZA, J. D. **Aplicações biotecnológicas da lectina de raízes de Bauhinia monandra (BmoRoL)** Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas – Recife – PE, 131 f., 2012.

SOUZA, J. D.; SILVA, M. B. R.; ARGOLLO, A. C. C.; NAPOLEÃO, T. H.; SÁ, R. A.; CORREIA, M. T. S.; PAIVA, P. M. G.; SILVA, M. D. C.; COELHO, L. C. B. B. A new Bauhinia monandra galactose-specific lectin purified in milligram quantities from secondary roots with antifungal and termiticidal activities. **International Biodeterioration & Biodegradation**. v. 65, p. 696-702, 2011.

SOUZA, G. A.; OLIVEIRA, P. S. L.; TRAPANI, S.; SANTOS, A. C. O.; ROSA, J. C.; LAURE, H. J. FAÇA, V. M.; CORREIA, M. T. S.; TAVARES, G. A.; OLIVA, G.; COELHO, L. C. B. B.; GREENE, L. J. Amino acid sequence and tertiary structure of Cratylia mollis seed lectin. **Glycobiology**. v. 13, p. 961-972, 2003.

SOUZA, R.; BENEDUZI, A.; AMBROSINI, A.; COSTA, P.B.; MEYER, J.; VARGAS, L.K.; SCHOENFELD, R.; PASSAGLIA, L.M.P. The effect of plant growth-promoting rhizobacteria on the growth of rice (*Oryza sativa* L.) cropped in southern Brazilian fields. **Plant and Soil**. v. 366, p. 585-603, 2013.

SOUZA, S. R.; CORREIA, M. T. S.; PESSOA, M.M.A.; KENNEDY, J.F.; LIMA-FILHO, J. L.; COELHO, L.C.B.B. A novel model to characterize the electric double layer of lectins from *Cratylia mollis* (Camaratu bean) and *Canavalia ensiformis* adsorbed on metallic surface. **Carbohydrate Polymers**. v. 46, p. 191-193, 2001.

STROBEL, G. et al. *Stegolerium kukenani* gen, et sp. nov. an endophytic taxol producing fungus from the Roraima *Stegolepsis guianensis* and *Kukenan tepuis* of Venezuela. **Mycotaxon**, 78:353-61, 2001.

TROGNITZ, F.; HACKL, E.; WIDHALM, S.; SESSITSCH, A. The role of plant–microbiome interactions in weed establishment and control. **FEMS Microbiology Ecology**. v. 92, n. 10, 138p., 2016. Disponível em: . doi: 10.1093/femsec/fiw138

UETA, R. R. **A espectroscopia de Impedância eletroquímica aplicada a ao estudo da interface Platina/Lectina**. Tese (Doutorado em Ciências) Departamento de Química Fundamental – Universidade Federal de Pernambuco – Recife, 2002.

VAN DAMME, E. J. M., LANNOO, N. & PEUMANS, W. J. **Plant lectins**. *Adv. Bot. Res.* v. 48, p. 107–209, 2008.

VANDENBORRE, G., SMAGGHE, G., VAN DAMME, E. J. M. Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects. **Phytochemistry**. v. 72, p. 1538–1550, 2011.

VAN PARIJS, J.; BROEKAERT, W. F.; GOLDSTEIN, I. J.; PEUMANS, W. F. Hevein: An antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) látex. **Planta**. v. 183, p. 258-264, 1991.

VAN'T SLOT, K. A. E.; KNOGGE, W. A dual role for microbial pathogen-derived effector proteins in plant disease and resistance. **Crit. Rev. Plant Sci.** v. 21, p. 229–271, 2002.

VAREJÃO, N.; ALMEIDA, M. S.; CICCIO, N. N. T.; ATELLA, G. C.; COELHO, L. C. B. B.; CORREIA, M. T. S.; FOGUEL, D. Heterologous expression and purification of a biologically active legume lectin from *Cratylia mollis* Seeds (CRAMOLL 1). **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1804, p. 1917-1924, 2010.

VIDOTTI, M.; TORRESI, R.; TORRESI, S. I. Eletrodos modificados por hidróxido de níquel: um estudo de revisão sobre suas propriedades estruturais e eletroquímicas visando suas aplicações em eletrocatalise, eletrocromismo e baterias secundárias. **Química Nova**, v. 33, p. 2176-2186, 2010.

YAO, D.; PAN, S.; ZHOU, M. Structural characterization and antitumor and mitogenic activity of a lectin from the gill of bighead carp (*Aristichthys nobilis*). **Fish Physiology and Biochemistry**. v. 234, p. 20, 2012. DOI: 10.1007/s10695-012-9678-1.

YAN, Q., ZHU, L., KUMAR, N., JIANG, Z., HUANG, L. Characterisation of a novel monomeric lectin (AML) from *Astragalus membranaceus* with anti-proliferative activity. **Food Chemistry**. v. 122, p. 589–595, 2010.

YUAN, J.; SUN, F.; TIAN, H.; CUI, L.; ZHAO, T. Isolation and screening of beneficial endophytic bacterial control bacterial ring rot of potato. **Acta Microbiol. Sin.** v. 42, p. 270–274, 2002.

WHIPPS, J. M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, p. 487-511, 2001.

WU, A. M., WU, J. H., SINGH, T., SINGHA, B., SUDAKEVITZ, D., GILBOA-GARBER, N. Multivalent human blood group ABH and Lewis glycotopes are key recognition factors for a LFucNMan binding lectin from phytopathogenic *Ralstonia solanacearum*. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1790, p. 249–259, 2009.

WANG, J. **Analytical electrochemistry**. 3 ed. New Jersey: John Wiley and Sons, 250p., 2006,

WU, Y.; WANG, H.; NG, T. B. Purification and characterization of a lectin with antiproliferative activity toward cancer cells from the dried fruit bodies of *Lactarius*

flavidulus. **Carbohydrate Research**. v. 346, p. 2576–2581, 2011.

ZHANG, Y. F. et al. Characterization of ACC deaminase-producing endophytic bacteria isolated from copper-tolerant plants and their potential in promoting the growth and copper accumulation of *Brassica napus*. **Chemosphere**. v. 83, n. 1, p. 57–62, 2011.

ZHANG, G., SUN, J., WANG, H., NG, T. B. First isolation and characterization of a novel lectin with potent antitumor activity from a *Russula* mushroom. **Phytomedicine**. v. 17, p. 775–781, 2010.

ZHANG, H.; WANG, H.; WANG, L.; SONG, X.; ZHAO, J.; QIU, L.; LI, L.; CONG, M.; SONG, L. A novel C-type lectin (Cflec-3) from *Chlamys farreri* with three carbohydrate recognition domains. **Fish & Shellfish Immunology**. v. 26, p. 707–715, 2009.

ZINGER-YOSOVICH, K.D., SUDAKEVITZ, D., ILUZ, D., GILBOA-GARBER, N. Analyses of diverse mammals' milk and lactoferrin glycans using five pathogenic bacterial lectins. **Food Chemistry**, 124:1335–1342, 2011.

ZUMDAHL, S. S.; ZUMDAHL, S. A. **Oxidation-Reduction Reactions**. In: *Chemistry*. 9. ed. Belmont, CA: Brooks/Cole, p. 170-175, 2014