

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

NATHÁLIA REGINA GALVÃO SILVA

**PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE UMA
LECTINA EXTRAÍDA DE SEMENTES DE *Adenantha pavonina L.***

Recife

2020

NATHÁLIA REGINA GALVÃO SILVA

**PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE UMA
LECTINA EXTRAÍDA DE SEMENTES DE *Adenanthera pavonina L.***

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

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva

Coorientador: Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Silva, Nathália Regina Galvão.

PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE UMA
LECTINA EXTRAÍDA DE SEMENTES DE *Adenantha pavonina* L. /

Nathália Regina Galvão Silva. - Recife, 2020.

105 : il., tab.

Orientador(a): Patrícia Maria Guedes Paiva

Coorientador(a): Thiago Henrique Napoleão

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de
Biotecnologia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2020.

Inclui referências.

1. Purificação de Proteínas. 2. Toxicologia. 3. Atividade Antimicrobiana. 4.
Farmacognosia. I. Paiva, Patrícia Maria Guedes. (Orientação). II. Napoleão,
Thiago Henrique. (Coorientação). IV. Título.

570 CDD (22.ed.)

NATHÁLIA REGINA GALVÃO SILVA

**PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE UMA
LECTINA EXTRAÍDA DE SEMENTES DE *Adenantha pavonina L.***

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

Aprovada em: 27/10/2020.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Patrícia Guedes Paiva (Membro interno)

Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho (Membro interno)

Universidade Federal de Pernambuco

Dr. José Dayvid Ferreira da Silva (Membro externo)

Universidade Federal de Pernambuco

“Nós somos uma impossibilidade
num universo impossível. “

- Ray Bradbury

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, por todo suporte na minha vida. Que sempre acreditaram em mim e me incentivaram a seguir meus sonhos. Sem eles eu não conseguiria estar onde estou. E aos amores da minha vida, Maria Alice e Heitor, meus sobrinhos queridos. Assim, como a minha família que sempre me apoiou: minhas avós e avô, minhas tias e tio, Bárbara, Leandro, Lourdinha, Mayra, Duda, Bruno e Thayse. Agradeço *in memoriam* ao meu a Avô Manoel que me ensinou tanto sobre plantas e animais que estou na biologia, e a Tia Rosa que cuidou de mim e que esteve presente em momentos importantes.

À Francielly, que me suportou desde a graduação. Obrigada por ser irmã, mãe, ouvinte e roommate. Obrigada por ter enfrentados minhas batalhas comigo e ter dado todo o apoio que eu precisava, assim como por todos os cafés. Agradeço à Jorge, por me apoiar, por cuidar de mim. Obrigada aos dois pela família que nos tornamos.

À Andressa, por ficar ao meu lado em 14 anos de amizade. Meu todo amor incondicional a você minha irmã. Obrigada por me apoiar, pelos conselhos e reclamações.

Aos integrantes do laboratório de bioquímica de proteínas (Bioprot), em especial Poliana Karla, meu muito obrigada amiga, por ser um suporte e ser tão prestativa, você foi essencial nessa caminhada. Assim como a Léo, que se transformou de um colega de trabalho para um grande amigo.

Aos Pós doutorandos Ana Patrícia, Thâmarah Albuquerque, Pollyana Michelle e Alisson Macário por sempre tirarem minhas dúvidas e me auxiliarem na pesquisa.

Ao Professor Thiago Napoleão pela co-orientação, por estar disposto a me ajudar nesse mestrado.

À Professora Patrícia Paiva, uma orientadora que enxerga além da vida científica e se preocupa com seus alunos. Meus sinceros agradecimentos por ter me apoiado na pesquisa, apesar de todos os problemas que me aconteceram, por ter confiado em mim como pesquisadora e na minha competência.

Agradeço a mim mesma. Por ter conseguido superar a depressão durante o mestrado e finalizado a pesquisa com todos os empecilhos, por não ter desisto de mim e continuado meu sonho.

À FACEPE e UFPE pelo apoio financeiro e incentivo à pesquisa.

RESUMO

As lectinas são proteínas capazes de se ligar reversível e especificamente a carboidratos através de um domínio reconhecedor de carboidratos (DRC). Essas proteínas estão presentes desde organismos mais simples até os mais complexos e, em decorrência dos DRC's, elas possuem diversas atividades biológicas, incluindo antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória, inseticida e cicatrizante de feridas cutâneas. O isolamento de lectina a partir de sementes de *Adenantha pavonina* pode identificar princípio ativo com potencial uso biotecnológico desde que essa espécie é popularmente conhecida na Ásia por seus princípios medicinais. O objetivo da presente dissertação foi investigar o extrato salino das sementes quanto a presença de proteína e metabólitos secundários, toxicidade aguda e atividade antimicrobiana e extrair, purificar, caracterizar estruturalmente e determinar a atividade antimicrobiana da lectina de semente de *A. pavonina* (ApSeL). O extrato salino foi obtido a partir da farinha fina do endosperma das sementes (1g:10mL), após homogeneização da mistura, centrifugação e coleta do sobrenadante (extrato). Flavonoides e derivados cinâmicos, alcaloides, saponinas, carboidratos, terpenos e esteroides foram identificados no extrato salino através de técnicas cromatografia de camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). No teste de toxicidade aguda, não foi observada mortalidade nem alterações bioquímicas ou hematológicas nos grupos tratados com o extrato (2000 e 5000 mg/kg) em relação ao controle. A presença de atividade hemaglutinante (AH) no extrato indicou a presença de lectinas. A AH do extrato foi inibida por N-acetilglicosamina, o que levou ao uso da cromatografia com matriz de quitina para isolamento da lectina. ApSeL foi isolada a partir da eluição com ácido acético 1,0 M. ApSeL é uma lectina termoestável, que necessita da presença de Ca^{2+} para hemaglutinação e tem sua AH presente na faixa de pH 3-10. Eletroforese para proteínas nativas básicas revelou uma única banda polipeptídica e a natureza catiônica de ApSeL foi confirmada por focalização isoelétrica, que demonstrou um ponto isoelétrico (pI) de 8,7. Eletroforese em condições desnaturantes indicou uma massa molecular de 28 kDa. Esta lectina também apresentou atividade proteolítica, indicando a presença de um sítio catalítico na sua estrutura. Tanto a lectina quanto o extrato salino não foram capazes de inibir cepas bacterianas, mas exibiram atividade fungistática para espécies do gênero *Candida*. Em conclusão, extrato salino das sementes de *A. pavonina* apresentou uma diversidade de compostos e baixa toxicidade e é uma fonte de lectina com atividade fungistática.

Palavras-chave: Antifúngico; Atividade Hemaglutinante; Protease; Toxicidade.

ABSTRACT

Lectins are proteins capable of binding reversibly and specifically to carbohydrates through a carbohydrate recognizing domain (CRD). These proteins are present from the simplest to the most complex organisms and, due to CRD's, they have several biological activities, including antibacterial, antifungal, anti-inflammatory, insecticide and healing of skin wounds. These proteins are present from the simplest to the most complex organisms and, due to CRD's, they have several biological activities, including antibacterial, antifungal, anti-inflammatory, insecticide and healing of skin wounds. The isolation of lectin from seeds of *Adenantha pavonina* can identify an active ingredient with potential biotechnological use since this species is popularly known in Asia for its medicinal principles. The objective of this dissertation was to investigate the saline extract of the seeds for the presence of protein and secondary metabolites, acute toxicity and antimicrobial activity and to extract, purify, structurally characterize and determine the antimicrobial activity of *A. pavonina* seed lectin (ApSeL). The saline extract was obtained from the fine flour of the seed endosperm (1g: 10mL), after homogenization of the mixture, centrifugation and collection of the supernatant (extract). Flavonoids and cinnamic derivatives, alkaloids, saponins, carbohydrates, terpenes and steroids were identified in the salt extract using techniques of thin layer chromatography (TLC) and high performance liquid chromatography (HPLC). In the acute toxicity test, mortality and biochemical or hematological changes were not observed in the groups treated with the extract (2000 and 5000 mg / kg) compared to the control. The presence of hemagglutinating activity (HA) in the extract indicated the presence of lectins. The extract's HA was inhibited by Nacetylglucosamine, which led to the use of chitin matrix chromatography to isolate lectin. ApSeL was isolated from the elution with 1.0 M acetic acid. ApSeL is a thermostable lectin, which requires the presence of Ca^{2+} for hemagglutination and has its HA present in the pH range 3-10. Electrophoresis for basic native proteins revealed a single polypeptide band and the cationic nature of ApSeL was confirmed by isoelectric focusing, which demonstrated an isoelectric point (pI) of 8.7. Electrophoresis under denaturing conditions indicated a molecular mass of 28 kDa. This lectin also showed proteolytic activity, indicating the presence of a catalytic site in its structure. Both the salt extract and the lectin were not able to inhibit bacterial strains, but exhibited fungistatic activity for species of the genus *Cryptococcus* and *Candida*, respectively. In conclusion, saline extract from *A. pavonina* seeds showed a diversity of compounds and low toxicity and is a source of lectin with fungistatic activity.

Keywords: Antifungal; Hemagglutinating Activity; Protease; Toxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Classificação das lectinas de acordo com o domínio de reconhecimento a carboidratos (DRC).	18
Figura 2: Representação esquemática de cromatografia de troca iônica.....	20
Figura 3: Representação esquemática de cromatografia de exclusão molecular	20
Figura 4: Representação esquemática de cromatografia de afinidade.....	21
Figura 5: Esquema da parede e membrana celular de fungos.	22
Figura 6: Sementes de <i>Adenantha pavonina</i> L.	25

ARTIGO 01: Caracterização do extrato salino das sementes de *Adenantha pavonina* L. e avaliação de toxicidade aguda e atividade antimicrobiana.

Figura 1. Cromatograma do extrato salino em 270 nm.	62
Figura 2. Espectros de varredura dos picos evidenciados no extrato salino.....	63
Figura 3. Zimografia para proteínas do extrato salino de sementes de <i>A. pavonina</i> em SDS-PAGE contendo caseína. A faixa clara contra o fundo escuro indica a atividade de protease, com cerca de 28 kDa	64
Figura 4: Fotomicrografias representativas dos fígados, rim, baço e pulmão de camundongos fêmeas dos grupos controle e tratados com dose única com o extrato salino das sementes de <i>A. pavonina</i> na dose de 2000mg/kg. Fígados: a veia centrolobular (cv) e espaço de Disse (ponta de seta) são vistos em todas as imagens. Rins: Glomérulos renais (Gr) e os tubos contorcidos (ponta de seta) são preservados e ordenados. Baço: Os linfonodos (Nd) são bem definidos nos grupos de controle e tratados. Pulmão: Podem ser visualizados bronquíolos (Br) e cavidade alveolar (As) com arquitetura preservada no controle e tratamento. Foi utilizada coloração com hematoxilina e eosina. Ampliação: 400x no fígado, rim e pulmão. Ampliação 100 x no baço....	

ARTIGO 02: Purificação e caracterização de uma lectina das sementes de *Adenantha pavonina* L. com sítio catalítico e atividade antifúngica

Figura 1. Purificação da lectina de sementes de *A. pavonina* (ApSeL) por cromatografia do extrato utilizando matriz de quitina de camarão. A etapa de lavagem usou NaCl 0,15M, que

apresentou o pico I sem hemaglutinação. O segundo pico foi eluído com ácido acético 1M, apresentou hemaglutinação e foi considerado a lectina ApSeL. As inserções mostram o perfil de ApSeL na focalização isoeétrica (1), SDS-PAGE (12%, p/v) (2) e PAGE para proteína nativa básica (3) 93

Figura 2. Caracterização da atividade hemaglutinante de ApSeL em diferentes valores de temperatura (A) e pH (B) 94

Figura 3. Zimografia da ApSeL pavonina utilizando caseína como substrato. Uma banda clara contra o fundo escuro indica a atividade de protease, correspondendo a um polipeptídeo de massa molecular de cerca de 28 kDa 95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Atividades biológicas de acordo com a anatomia vegetal de *Adenanthera pavonina*.
..... 26

ARTIGO 01: Caracterização do extrato salino das sementes de *Adenanthera pavonina* L. e avaliação de toxicidade aguda e atividade antimicrobiana.

Tabela 1. Sumário da caracterização do extrato salino quanto a concentração de proteína e atividade hemaglutinante na presença de carboidratos, glicoproteína e em diferentes valores de temperatura e pH. 55

Tabela 2. Caracterização do extrato salino quanto a atividade enzimática usando como substratos azocaseína (proteolítica) e N- α -benzoil-L-arginina-paranitroanilida (tripsina-like) 57

Tabela 3. Consumo de água e alimentos e ganho de peso de camundongos controle e tratados com o extrato salino de *A. pavonina*..... 58

Tabela 4: Parâmetros hematológicos de camundongos tratados com o extrato salino de *A. pavonina*. 59

Tabela 5: Parâmetros bioquímicos do sangue de camundongos tratados com o extrato salino de *A. pavonina*..... 58

Tabela 6: Avaliação do peso relativo (g/10 g de peso corporal do animal) de camundongos tratados com o extrato salino de *A. pavonina*..... 60

Tabela 7. Atividade antimicrobiana do extrato salino de *A. pavonina* 61

ARTIGO 02: Purificação e caracterização de uma lectina das sementes de *Adenanthera pavonina* L. com sítio catalítico e atividade antifúngica

Tabela 1. Purificação da lectina das sementes de *Adenanthera pavonina* (ApSeL) com base em suas atividades hemaglutinante, proteolítica e tripsina-like 90

Tabela 2. Atividade hemaglutinante de ApSeL, na presença de carboidratos e glicoproteínas, e redução da atividade enzimática frente a inibidores de proteases. 91

Tabela 3. Atividade antimicrobiana de ApSeL..... 92

LISTA DE ABREVIATURAS

AH – Atividade hemaglutinante

ApSeL – Lectina de Sementes de *A. pavonina*

ApTI - Inibidor de protease de *A. pavonina*

CG-EM - Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa

CCD - Cromatografia de Camada Delgada

CLAE – Cromatografia Líquido de Alta Eficiência

DRC – Domínio Reconhecedor de Carboidratos

EB – Extrato Bruto

EEAP - Extrato etanólico das folhas de *A. pavonina*

FPLC - Cromatografia líquida de rápida resolução

HPLC - Cromatografia líquida de alta resolução

PLSAp – Polissacarídeo nativo de *A. pavonina*

QS – *Quorum sensing*

SPLSAp - Polissacarídeo quimicamente sulfatado das sementes de *A. pavonina*

PCR – Reação em cadeia da polimerase

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio

CIM₅₀ – Concentração Inibitória Mínima de 50%

CI₅₀ – Concentração Inibitória de 50%

PV - 1 – Polivírus do tipo 1

HSV – Vírus da Herpes Simplex

CLRP – Cromatografia Líquida Rápida de Proteínas

SPAp – Polissacarídeo sulfatado das sementes de *A. pavonina*

ApKTI – Inibidor de Tripsina das sementes de *A. pavonina*

LPS – Lipopolissacarídeo

IFA – Ensaio de imunofluorescência

GAP - Galactomana extraído das sementes de *A. pavanina*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	16
2.1. Geral.....	16
2.2. Específicos.....	16
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
3.1. Lectinas	17
3.1.1. Purificação e caracterização	18
3.1.2. Atividade antifúngica	21
3.2. <i>Adenantha pavonina</i> L.....	24
4. ARTIGOS	34
CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO SALINO DAS SEMENTES DE <i>Adenantha pavonina</i> L. E AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	34
PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA LECTINA DAS SEMENTES DE <i>Adenantha pavonina</i> L. COM SÍTIO CATALÍTICO E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA.....	70
5. CONCLUSÃO	96
REFERÊNCIAS	97

1. INTRODUÇÃO

As lectinas são um grupo de proteínas heterogêneas encontradas desde organismos mais simples até os mais complexos. Elas são capazes de estabelecer ligações específicas e reversíveis com mono e oligossacarídeos (CAVADA *et al.*, 2018) e a especificidade da ligação possibilita que atuem como moléculas de reconhecimento. As plantas são consideradas a maior fonte de lectinas, sendo possível extrair e isolar essas proteínas de praticamente toda a sua anatomia, incluindo as sementes, cascas, folhas, frutos, raízes e tubérculos (SANTOS *et al.*, 2014).

Diversos estudos descrevem as atividades biológicas relacionadas às lectinas, como as atividades antinociceptiva, anti-inflamatória, antihemolítica, cicatrizante de feridas cutâneas, antibacteriana e antifúngica (BRUSTEIN *et al.*, 2012; LACERDA *et al.*, 2015; MOURA *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2018). As lectinas podem reagir com carboidratos expostos na superfície das células dos microrganismos, promovendo a atividade inibitória de crescimento ou promovendo morte celular (PROCÓPIO *et al.*, 2017).

Adenanthera pavonina, popularmente conhecida como Carolina ou falso pau brasil (OLAJIDE *et al.*, 2004), pertence à família Fabaceae e subfamília Mimosideae, sendo uma espécie nativa da Índia e China (ORWA *et al.*, 2015). Em alguns países, *A. pavonina* é utilizada na medicina tradicional para o combate de doenças como diabetes, diarreia, hemorragia e processos inflamatórios (WICKRAMARATNE *et al.*, 2016). Estudos recentes vêm explorando diversos compostos da *A. pavonina*, como os polissacarídeos presentes na semente, nativos ou quimicamente tratados, aos quais tem sido atribuída atividade antiviral, apresentando um potencial valioso para estudos pré-clínicos na terapia anti-herpética (GODOI *et al.*, 2015). Na Farmacologia, os experimentos realizados com o extrato das sementes de *A. pavonina* tem evidenciado as atividades antioxidante, citotóxica para linhagem de células de câncer cervical e de cólon e antimicrobiana (BHADRAN *et al.*, 2017; RODRIGUES *et al.*, 2018).

O uso popular de *A. pavonina* por suas propriedades medicinais e o fato de lectinas de plantas apresentarem efeitos benéficos a saúde humana, justificam a investigação das sementes dessa planta como fontes de lectina com potencial uso terapêutico.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Avaliar extrato salino das sementes de *A. pavonina* quanto a composição fitoquímica e proteica e toxicidade aguda, purificar e caracterizar lectina (ApSeL) a partir desse extrato, e avaliar o potencial antimicrobiano de extrato e lectina isolada.

2.2. Específicos

- Avaliar extrato salino das sementes de *A. pavonina* quanto à presença de metabólitos secundários.
- Investigar a presença de lectinas no extrato salino através de ensaio de hemaglutinação.
- Avaliar a toxicidade aguda do extrato em camundongos.
- Purificar a lectina de sementes de *A. pavonina* (ApSeL) a partir do extrato salino.
- Caracterizar ApSeL quanto a propriedades físico-químicas e bioquímicas.
- Avaliar a atividade antimicrobiana do extrato e de ApSeL frente a bactérias e fungos patogênicos de importância médica.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. Lectinas

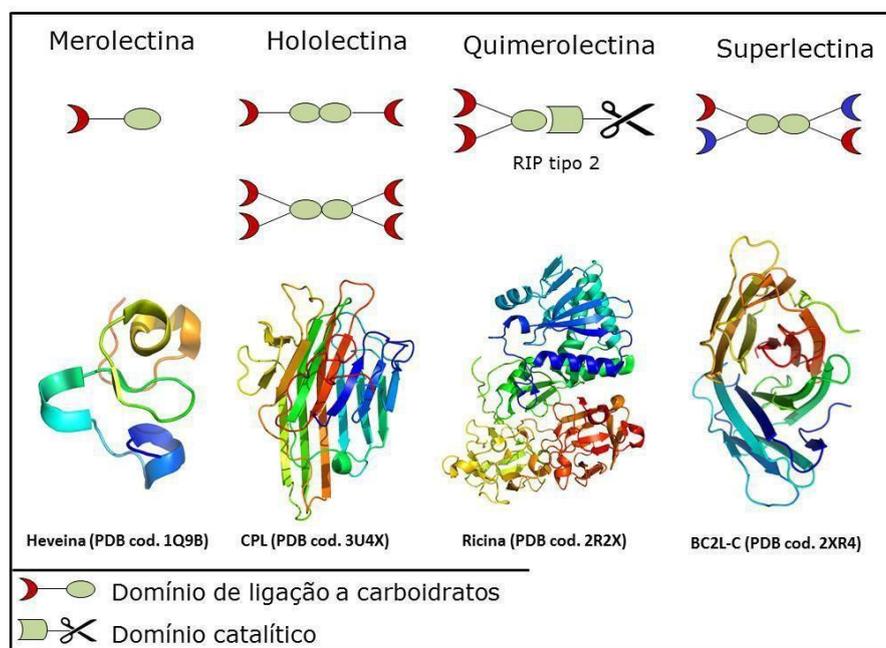
Em 1888, Stillmark isolou uma proteína de sementes de *Ricinus communis* (conhecida popularmente por mamona) que promovia a aglutinação de hemácias de animais; essa hemaglutinina, denominada ricina, foi uma das primeiras lectinas estudadas. A ricina apresenta três domínios sendo dois homólogos e ligadores de carboidratos e um terceiro domínio inativador de ribossomos, que inibe a síntese proteica (SELL, 2008). Atualmente diversos potenciais biotecnológicos dessa proteína são conhecidos (JUAN *et al.*, 2017).

Sharon e Lis (2002) definiram lectinas como proteínas que existem em fontes naturais, com origem não imunológica e que se ligam de forma específica e reversível a carboidratos. A origem não imunológica e a descoberta de lectinas com distinta composição de aminoácidos, peso molecular, estrutura tridimensional e características físico-químicas revelam que elas diferem dos anticorpos que são semelhantes estruturalmente e são produtos de uma resposta imune (PAIVA *et al.*, 2013; GAUTAM *et al.*, 2018). Desta forma, lectinas são um grupo de proteínas ou glicoproteínas que possui ao menos um domínio de ligação a carboidratos, o qual é capaz de estabelecer ligações diretas e reversíveis com mono e oligossacarídeos (CAVADA *et al.*, 2018). Essas proteínas são encontradas em microrganismos, algas, plantas e animais e participam de vários processos biológicos, tendo suas funções determinadas por suas propriedades estruturais e localização celular (GONG *et al.*, 2018), desempenhando um papel importante nos mecanismos de defesa tanto em animais quanto em vegetais (HIVRALE; INGALE, 2013).

Peumans e Van Damme (2001) classificaram as lectinas em merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas (Figura 1) de acordo com a estrutura geral e características do domínio de reconhecimento de carboidrato (DRC). As merolectinas apresentam um único domínio de ligação a carboidrato, são pequenas e monovalentes e, portanto, incapazes de precipitar glicoconjugados e aglutinar células. As hololectinas possuem dois ou mais domínios de ligação a carboidratos idênticos ou homólogos, apresentam-se geralmente como dímeros ou tetrâmeros e são capazes de aglutinar células e precipitar glicoconjugados. As quimerolectinas apresentam um ou mais domínios de ligação a carboidrato e outro sítio de ligação, o qual pode possuir atividade catalítica ou biológica independente do DRC; dependendo do número de domínios de ligação a carboidrato podem comportar-se como merolectinas ou hololectinas. As

superlectinas apresentam dois ou mais domínios de ligação a carboidratos e podem reconhecer carboidratos estruturalmente distintos. Essa classe de lectinas também é considerada um grupo particular das quimerolectinas por possuírem dois DRCs estrutural e funcionalmente diferentes.

Figura 1. Classificação das lectinas de acordo com o domínio de reconhecimento a carboidratos (DRC).



Fonte: Teixeira (2015)

Em plantas, as lectinas podem atuar na simbiose com microrganismos, na defesa contra fitopatógenos e herbívoros. Além de possuírem importante papel no estresse biótico, as lectinas também desempenham função no estresse abiótico, incluindo o estresse pela seca (LI *et al.*, 2014; SAHID *et al.*, 2020).

3.1.1. Purificação e caracterização

Lectinas podem apresentar propriedades biológicas interessantes do ponto de vista de saúde humana incluindo atividades antinociceptiva, anti-inflamatória, antihemolítica, cicatrizante e antimicrobiana (BRUSTEIN *et al.*, 2012; LACERDA *et al.*, 2015). Sendo assim, as lectinas têm perspectiva de uso biotecnológico e farmacológico, o que estimula a busca por fontes naturais destas proteínas. As lectinas são isoladas de microrganismos (SINGH; WALIA; KENNEDY, 2018; ZHAO *et al.*, 2009), invertebrados (CARNEIRO *et al.*, 2017) e vertebrados (MANIKANDAN *et al.*, 2017), mas as plantas são consideradas os organismos que possuem o

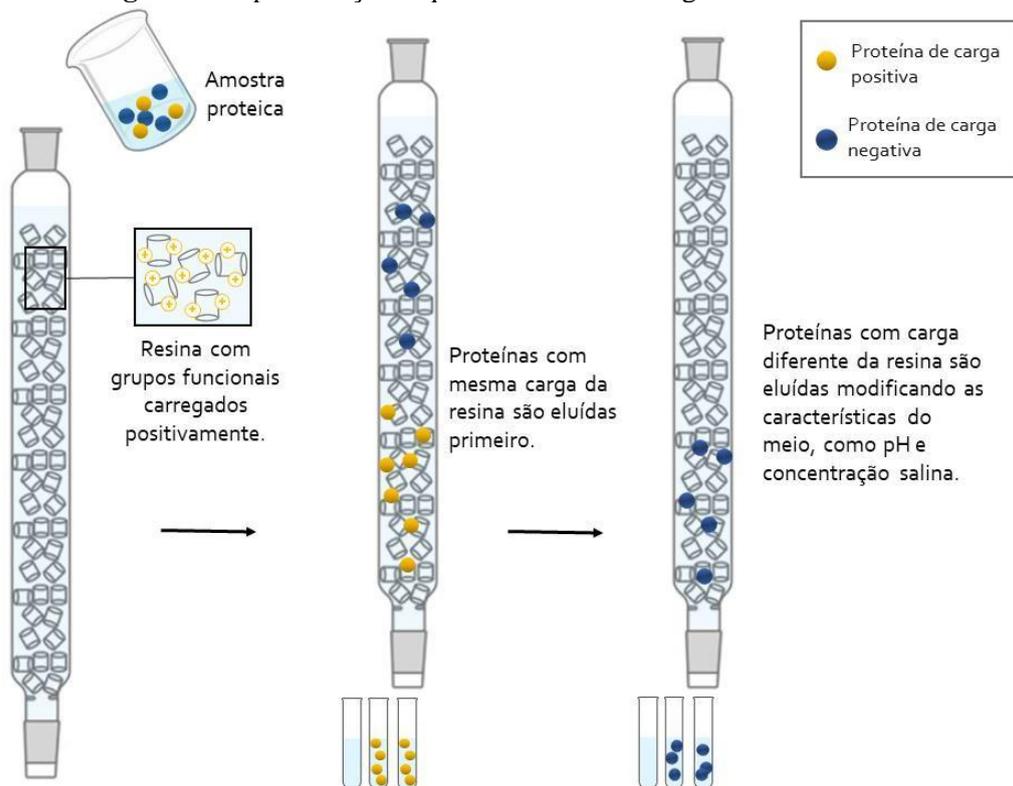
maior teor de lectinas em sua composição, tornando possível sua extração e isolamento a partir de toda a anatomia vegetal (SANTOS *et al.*, 2014).

O ponto de partida é um extrato bruto que corresponde a uma solução obtida após a extração proteica com solução aquosa, salina ou tampão (SOUZA *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2016; BRITO *et al.*, 2017). O primeiro passo no processo da purificação de lectinas é a detecção da presença dessas proteínas através do ensaio de atividade hemaglutinante. A hemaglutinação ocorre pela formação de uma rede devido à interação dos DRC's da lectina com carboidratos presentes na superfície dos eritrócitos (PROCÓPIO *et al.* 2017). A inibição da atividade hemaglutinante com carboidratos assegura que ela é devida a presença de lectina e não decorrente de hemólise causada por metabólitos secundários, como por exemplo os taninos (NAPOLEÃO *et al.*, 2013).

A precipitação diferencial de proteínas do extrato utilizando diferentes concentrações de sulfato de amônio é eficiente em promover purificação parcial e explora uma característica estrutural relacionada à solubilidade da proteína em meio aquoso. Os processos de aumento e diminuição da solubilidade em decorrência da adição do sal são conhecidos como *salting in* e *salting out*, respectivamente (COELHO; SILVA, 2000). No *salting out* o processo de adição de sal faz com que precipitem algumas proteínas enquanto outras permanecem em solução, essas proteínas são então separadas daquelas que continuaram em solução por meio de centrifugação. Os métodos de precipitação de proteínas que empregam ácidos ou solventes orgânicos (KAJIWARA *et al.*, 2020) são menos usados devido a possibilidade de alterarem a conformação nativa da proteína com dano a sua atividade biológica.

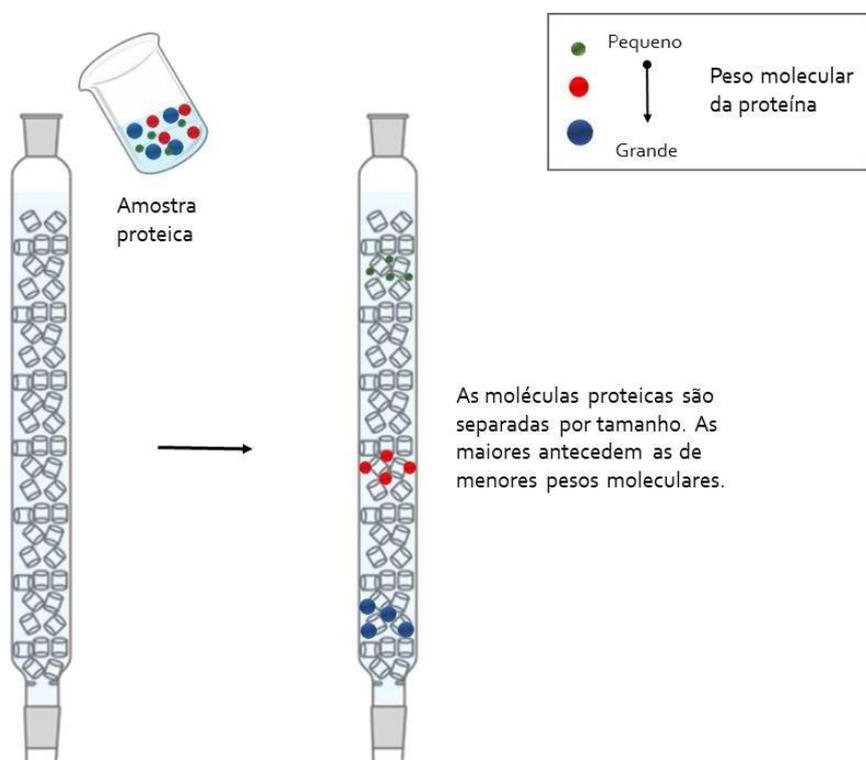
O extrato ou fração proteica com atividade hemaglutinante, em geral, é submetido a métodos cromatográficos (Figuras 2, 3 e 4) visando isolar a lectina presente. Os procedimentos de purificação de lectina podem incluir cromatografia de troca iônica (Figura 2), exclusão molecular (Figura 3) e afinidade (Figura 4) que tem como critérios de separação carga, massa molecular e especificidade a carboidrato, respectivamente (COELHO *et al.*, 2012, SANTOS *et al.*, 2013). As técnicas de cromatografia líquida rápida de proteínas (CLRP) e de alta eficiência (CLAE) são utilizadas geralmente como etapas finais do processo de purificação para determinação da homogeneidade (grau de purificação) e da massa molecular nativa da lectina (WONG; NG, 2003, JIANG *et al.*, 2009).

Figura 2: Representação esquemática de cromatografia de troca iônica.



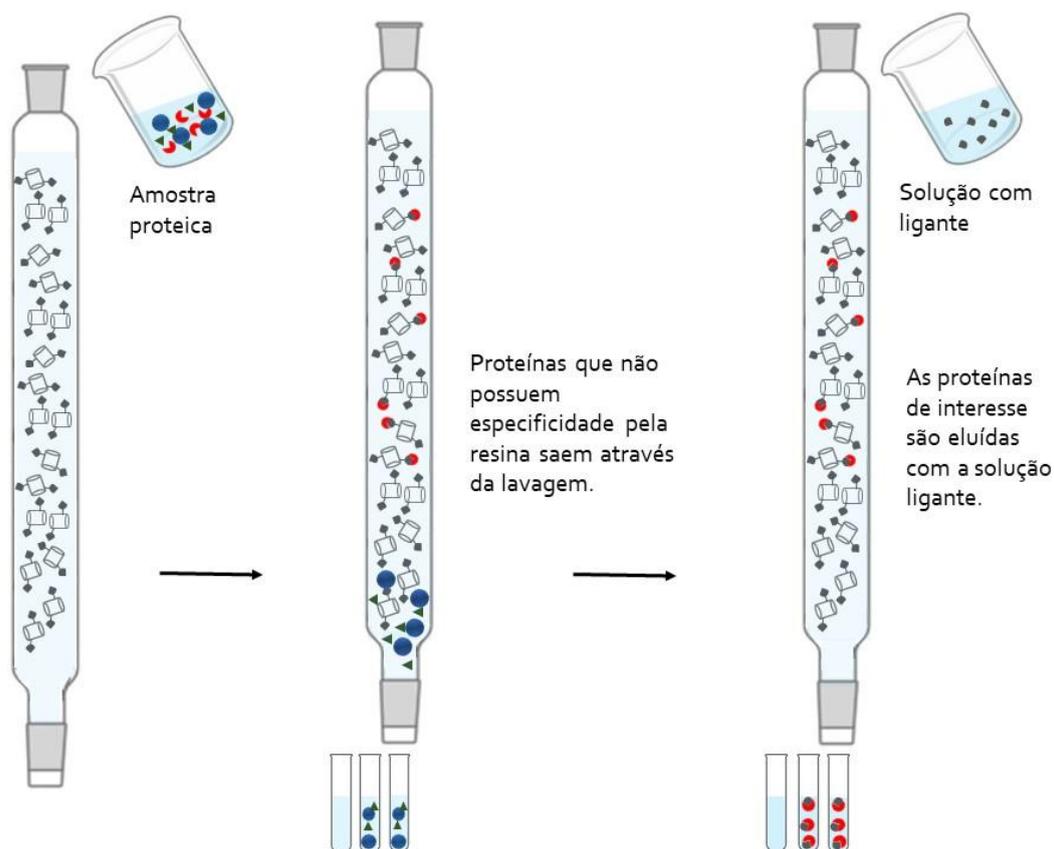
Fonte: Próprio autor (2020)

Figura 3: Representação esquemática de cromatografia de exclusão molecular.



Fonte: Próprio autor (2020)

Figura 4: Representação esquemática de cromatografia de afinidade.



Fonte: Próprio autor (2020)

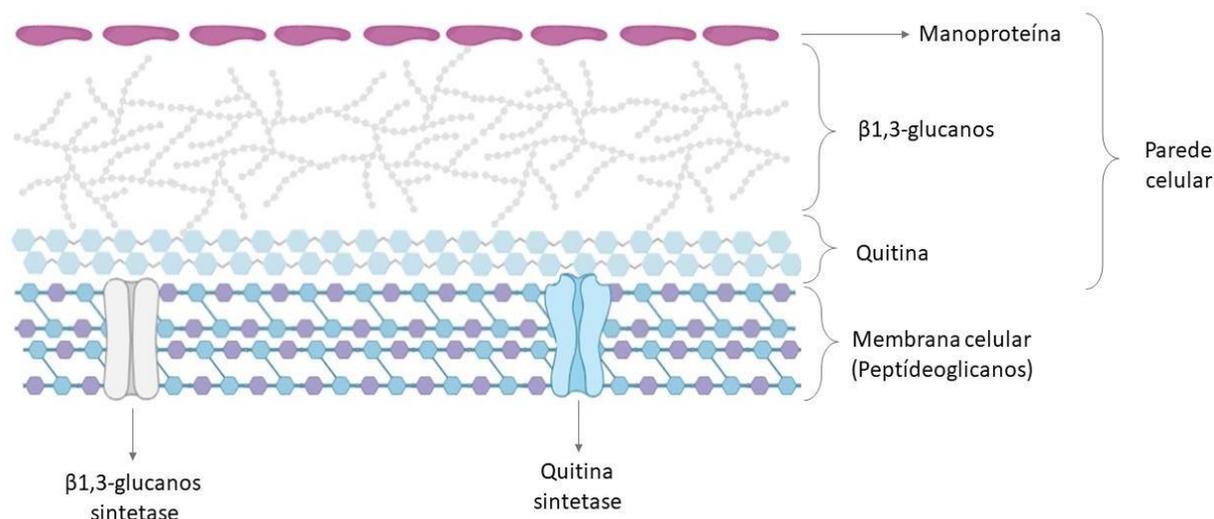
3.1.2. Atividade antifúngica

As lectinas podem inibir o crescimento e sobrevivência de ampla variedade de microrganismos patogênicos e, portanto, estas proteínas são elencadas como candidatas para a prevenção e tratamento de infecções (SILVA et al., 201; JIN; LEE; HONG, 2018). O sítio de ligação aos carboidratos das lectinas é fundamental para a atividade antimicrobiana, considerando que os microrganismos expressam diferentes carboidratos na superfície celular que podem ser alvos de ligação das lectinas (CHARUNGCHITRAK et al., 2011).

Os mecanismos moleculares da ação da atividade antifúngica das lectinas são menos elucidados, quando comparados aos estudos com atividade antibacteriana (DEL RIO *et al.*, 2020). Entretanto, é pressuposto que a capacidade de inibir o crescimento fúngico é referente ao reconhecimento de carboidratos específicos na parede celular (DANG; VAN DAMME, 2015). A parede celular fúngica é composta de quitina (polímeros de N-acetilglicosamina), glucanos, celulose e manoproteínas (Figura 5), que exercem papéis na interação com células hospedeiras, intermediando processos, como a adesão ou fagocitose, os quais possuem extrema

importância no desenvolvimento do quadro infeccioso (ARANA *et al.*,2009). Desta forma, alterações na estrutura da parede possibilitam a inibição do crescimento fúngico ou previnem sua interação com a célula hospedeira, diminuindo a patogenicidade (LIMA *et al.*,2019).

Figura 5: Esquema da parede e membrana celular de fungos.



Fonte: Próprio Autor (2020)

A quitina desempenha uma função crucial para atividades biológicas das lectinas, pois ela está ausente em células humanas, o que torna esse polissacarídeo um alvo favorável aos compostos antifúngicos (CAMPOY; ADRIO, 2016). As lectinas também podem desencadear estresse oxidativo, colapso energético (SILVA *et al.*,2018), adentrar nas células fúngicas e bloquear enzimas que atuam na síntese de polímeros de formação da parede celular (GAIDAMASHVILI; VAN STADEN, 2002).

Candida é um dos gêneros investigados nos testes de atividade contra fungos patogênicos para seres humanos, haja visto que elas podem ser patógenas oportunistas em casos como desequilíbrio da microbiota e de imunocomprometidos. Esse gênero possui mais de 200 espécies, porém, as mais relevantes para a saúde são: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* (SPAMPINATO; LEONARDI, 2013).

Silva Neto *et al.* (2017) demonstraram que a lectina de sementes de *Moringa oleifera*, Mo-CBP2, inibiu o crescimento de *C. krusei*, *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, com os valores de concentração inibitória mínima (CIM) variando de 9,45 a 37 µM. Mo-CBP2 alterou a permeabilidade da membrana celular de *C. albicans* e os autores observaram que Mo-CBP2 promoveu a geração de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS), mecanismo de ação que é semelhante ao antifúngico Nistatina, que também comprometeu a membrana celular e

aumentou níveis de ROS em *C. albicans*. Esta lectina também apresentou efeito anti-*Candida* através de interação do material genético do fungo e atividade semelhante a DNase I.

A lectina Helja, extraída das sementes de *Helianthus annuus*, espécie conhecida popularmente como girassol, inibiu o crescimento de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (DEL RIO *et al.*, 2019). Assim como Mo-CBP2, também induziu a produção de ROS e alterou a permeabilidade da membrana fúngica. Del Rio *et al.* (2019) constataram que Helja interage com as manoproteínas da parede celular, assim como inibem a transição da morfologia de leveduras para filamentos. MaL, lectina das sementes de *Machaerium acutifolium*, reduziu o crescimento das mesmas cepas que Helja, entretanto, MaL possui especificidade por N-acetil-D-glicosamina, o que pode explicar a redução da viabilidade celular através da ligação a quitina (DIAS *et al.*, 2020).

Ferreira *et al.* (2018) também apresentaram uma lectina antifúngica. ApuL, lectina de inflorescência de *Alpina purpurata*, obteve efeito fugiostático para *C. albicans* e *C. parapsilosis* com CIM de 200 e 400 µg/mL, respectivamente. Através de análise com microscópio de varredura, foi observado que ApuL ocasionou malformações nas células de *Candida*. ApuL também apresentou efeito sinérgico com fluconazol e atividade antibiofilme. CasuL, lectina de folíolos de *Calliandra surinamensis*, foi testada contra quatro cepas de *Candida* e possuiu atividade apenas para *C. krusei*, com CIM de 125 µg/mL e concentração fungicida de 250 µg/mL. Por meio da microscopia, foi verificado que ocorreu mudanças conformacionais intensas nas células de *C. krusei*, além da existência de restos celulares e células rompidas. PeRoL, lectina da raiz de *Portulaca elatior*, foi fungicida para *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. tropicalis*, com a concentração fungicida mínima de 16 µg/mL (SILVA *et al.*, 2019).

A lectina PgTeL, obtida da sarcotesta de *Punica granatum*, também apresentou atividade fungistática para *C. krusei* e *C. albicans* (SILVA *et al.*, 2018). As concentrações CIM₅₀, ½CIM₅₀, ¼ CIM₅₀ exibiram uma forte inibição do nível de ATP, revelando que as células tiveram suas funções prejudicadas. PgTeL também afetou o estado redox das células, desencadeando peroxidação lipídica. Tanto a inibição de níveis de ATP quanto a peroxidação lipídica estão associadas a deformidades estruturais e funcionais, através da observação a morfologia das células de *C. albicans* e *C. krusei* foi possível verificar que a lectina ocasionou alterações morfológicas drásticas, indicando que ocorreu a indução do desequilíbrio osmótico e desordem nas membranas celulares, bem como colapso energético e morte celular por lise (SILVA *et al.*, 2018).

O potencial antifúngico de lectinas contra fitopatógenos tem sido relatado através da investigação do efeito dessas proteínas em interação com hifas, desencadeando uma inibição

no crescimento e prevenindo a germinação de esporos (COELHO *et al.*, 2017). As lectinas das sementes de *Artocarpus integrifolia* e *Artocarpus incisa*, Jackin e frutackin, respectivamente, proporcionaram a inibição da germinação de esporos de *Fusarium moniliforme* com CIM de 2,25 mg/mL; essa atividade pode ter acontecido pela ligação da lectina à quitina, prejudicando o desenvolvimento das hifas e impedindo que os micélios formados produzissem esporos (TRINDADE *et al.*, 2006).

A lectina de *Phaseolus lunatis* (lunatin) apresentou atividade antifúngica para os fitopatógenos *Sclerotium rolfsii*, *Physalospora piricola*, *Fusarium oxysporum* e *Botrytis cinerea* (WU *et al.*, 2016). As lectinas das sementes de *Pisum sativum*, *Astragalus mongholicus* e *Annona muricata* inibiram o crescimento de *Aspergillus flavus*, *Trichoderma viride*, *F. oxysporum*, *B. cinerea*, *F. oxysporum* e *Drechslera turcia* (SITOHY; DOHEIM; BARD, 2007; YAN *et al.*, 2005).

Deste modo, as lectinas possuem um potencial antifúngico de relevância para a saúde e agricultura, tornando-se um alvo para pesquisas que visam uma alternativa natural para os antifúngicos e sua crescente resistência.

3.2. *Adenanthera pavonina* L.

Adenanthera pavonina L. é uma leguminosa pertencente à família Fabaceae e subfamília Mimosoideae. É uma espécie nativa da Ásia, porém disseminada por todo o mundo (OLAJIDE *et al.*, 2004). É caracterizada por ser uma espécie caducifólia, com altura variável de 18 a 24 m, tronco ereto, com 60 cm de diâmetro e com a particularidade de possuir uma semente com tegumento vermelho vibrante e casca bastante rígida (PANDHARE *et al.*, 2012). Mundialmente é conhecida como sândalo vermelho indiano, árvore de contas ou árvore coral. No Brasil é uma espécie comum e popularmente denominada de árvore-de-bico-vermelho, carolina, olho de pombo e olho de dragão. As suas denominações geralmente são em decorrência da peculiaridade da semente de coloração vermelha (Figura 6).

Figura 6: Sementes de *Adenanthera pavonina* L.



Fonte: Próprio autor (2020)

É uma espécie utilizada em sistemas agroflorestais para que atue como adubo verde, forragem animal e melhoramento do solo (PRACIAK, 2013). Em decorrência de suas características botânicas e visuais, essa espécie é comumente usada como ornamental em jardins e florestas urbanas, assim como em artesanato (PRACIAK, 2013).

A. pavonina é uma planta relevante na Ásia tropical, África e diversas ilhas no Pacífico e regiões caribenhas (GODOI *et al.*, 2014) por suas ações farmacológicas e nutricionais (AFOLABI *et al.*, 2018, GODOI *et al.*, 2014, MONIRUZZAMAN; KHATUN; IMAM, 2015). As folhas são usadas para inflamação e reumatismo (MONIRUZZAMAN; KHATUN; IMAM, 2015). A semente tem sabor semelhante a soja e é utilizada na alimentação de seres humanos e animais. A população consome as sementes, as quais são altamente nutritivas devido ao alto teor de aminoácidos essenciais e não proteicos, ácido gama-metileno-glutâmico e o gama-metileno-glutamina (OWOEYE *et al.*, 2017). O núcleo da semente possui uma gordura amarela pálida, que é constituída de ácidos palmítico, araquidônico, lignocérico, oleico, linoleico, eicosanoico e octacosanoico e de estigmasterol e seu glucosídeo e dulcitol (PANDHARE *et al.*, 2012). Além disto, uma análise do óleo extraído das sementes revelou a presença de saponinas, alcaloides, terpenoides, alto teor proteico, fibra bruta, manganês e ferro (OWOEYE *et al.*, 2017).

Os tecidos de *A. pavonina* são vastamente estudados com relação aos seus compostos e diversas propriedades biológicas com relevância nutricional, biotecnológica e farmacológica já foram reportadas (Tabela 1).

Tabela 1: Atividades biológicas de acordo com a anatomia vegetal de *Adenanthera pavonina*.

Autores	Ano	Tecido/órgão	Propriedade biológica
Moniruzzaman <i>et al.</i>	2015	Folha	Atividade antinociceptiva
Wickramaratne; Puchihewa; Wickramaratne	2016	Folha	Atividade antioxidante e antidiabética
Vasavi; Arun; Rekha	2015	Folha	Atividade anti-Quorum Sensing Atividade antioxidante, atividade
Bhadran <i>et al.</i>	2017	Caule	citotóxica para linhagem de células de câncer cervical e de cólon
Sasaki <i>et al.</i>	2015	Semente	Atividade larvicida contra <i>Aedes aegypti</i>
Afolabi <i>et al.</i>	2018	Semente	Produção de pró-leite com altos valores nutricionais e atividades bioquímicas relevantes na área de doenças neurológicas, como o desenvolvimento de Alzheimer.
Owoeye <i>et al.</i>	2017	Semente	Caracterização do óleo da semente e importância nutricional, apresentando alto nível de proteínas (27,72%) e fibra bruta (5,82%).

Godoi <i>et al.</i>	2014	Semente	Atividade antiviral do polissacarídeo sulfatado (SPLSAp) contra o poliovírus tipo 1 (PV-1)
Godoi <i>et al.</i>	2015	Semente	Atividade antiviral do polissacarídeo sulfatado (SPLSAp) e nativo (PLSAp) frente ao vírus do herpes simplex (HSV)
Marques <i>et al.</i>	2015	Semente	Atividade antioxidante e antiviral contra o vírus da dengue de sorotipo DENV-2
Melo <i>et al.</i>	2018	Semente	Caracterização de um biopolímero de galactomonana (Atividade antioxidante, toxicidade)
Rodrigues <i>et al.</i>	2018	Semente	Atividade antimicrobiana (<i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> KpC+ e <i>Staphylococcus aureus</i>) e citotóxica do peptídeo adevonin

Koodalingam et al.	2016	Semente	Atividade anti-inflamatória
Araújo et al.	2019	Semente	Atividade antioxidante e antiproliferativa (linhagens tumorais de próstata e rim)
Rechenchoski et al.	2019	Semente	Atividade antiviral do polissacarídeo sulfatado (SPAp) contra cepas de herpes simplex resistente e sensível a ciclovir
Oliveira et al.	2019	Semente	Atividade inseticida de ApKTI para <i>Plodia interpunctella</i> Peptídeo antimicrobiano contra <i>E. coli</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Candida albicans</i> e <i>Candida tropicalis</i> .
Almeida et al.	2020	Semente	Análise nutricional e de compostos capazes de reduzir riscos de saúde relacionados ao excesso de peso e à obesidade.
Huml et al.	2020	Semente	

Fonte: Próprio Autor (2019)

As folhas de *A. pavonina* apresentam atividade antinociceptiva. Moniruzzaman e colaboradores (2015) demonstraram que o extrato etanólico aumentou significativamente o tempo de permanência dos animais em placa quente e o tempo de retirada da cauda e diminuiu as contorções abdominais induzidas por ácido acético. O estudo também revelou que o extrato

inibiu as respostas nociceptivas nas duas fases do teste da formalina e que receptores opioides estavam envolvidos no efeito.

As folhas de *A. pavonina* possuem propriedades interessantes do ponto de vista de tratamento do diabetes mellitus tipo II. O extrato metanólico inibiu a α -amilase com concentração inibitória de 50% (CI₅₀) de 16,16 μ g/mL e inibiu a absorção de amido. A CI₅₀ do extrato foi similar àquela do acarbose (18,63 μ g/mL), medicamento utilizado no tratamento da diabetes (WICKRAMARATNE; PUCHIHEWA; WICKRAMARATNE, 2016). O estudo também revelou que frações obtidas a partir de extratos etanólicos e aquosos das folhas apresentaram atividade antioxidante pelo método de captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) (WICKRAMARATNE; PUCHIHEWA; WICKRAMARATNE, 2016).

As folhas de *A. pavonina* também possuem efeito antibacteriano. Extrato etanólico apresentou atividade anti-*quorum sensing* (QS) contra a cepa PAO1 de *Pseudomonas aeruginosa*, inibindo completamente a produção de piocianina e atividades proteolítica e elastolítica (VASAVI; ARUN; REKHA, 2015). As bactérias produzem e liberam moléculas de sinalização química, chamadas de sinais auto-indutores, que fazem parte do processo denominado QS, que media a comunicação interespecies ou intraespecies. A concentração de tais moléculas aumenta proporcionalmente à densidade da população celular. O QS bacteriano permite que um determinado grupo de células regule uniformemente a expressão gênica e este processo é relevante para a formação de biofilme, troca de genes e expressão de fatores de virulência (WATERS *et al.*, 2005).

Extrato metanólico do caule de *A. pavonina* foi avaliado por Bhadran *et al.* (2017) quanto a constituintes e atividades biológicas. Dezesete compostos foram detectados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM), os principais foram: nitrato de isobutila; 3,4-hexanodiona; ácido oxálico butil propil éster; isonitropropano; ácido oxálico; alipentil éster; 1,3-dioxolano; 2-benzil-1,3-dioxolano; ciclopentasiloxano; [(2,4,4,6,6,8,8,8-heptametilciclotetrasiloxan-2-il)oxi]nonametil-; 2-heptil-1,3-dioxolano; 3-etoxi-1,1,1,7,7,7-hexametil-3,5,5-tris tetrasiloxano; ácido malônico; bis (2-trimetilsililetil éster,); ácido acético; [o- (trimetilsiloxi) pentil]-; trimetilsilil éster; metil-alfa-dribofuranosídeo; 3-metilmanosídeo; 2,3,4,5-tetrahidroxipentanal e metil 4-o-metil-d-arabinopiranosídeo. A atividade antioxidante foi determinada utilizando os métodos de captura dos radicais livres DPPH e ABTS [ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)]. Esse extrato também reduziu a viabilidade de células de câncer cervical (HeLa) e de cólon (HCT116) com concentração que inibe o crescimento celular em 50% (CI₅₀) de 25,86 μ g/mL e 39,89

µg/mL, respectivamente. O estudo também mostrou que o extrato causou a parada na fase G2-M do ciclo celular.

As sementes de *A. pavonina* foram utilizadas para a produção de extratos aquoso e metanólico e foi avaliado o efeito citoprotetor e anti-inflamatório dos extratos em macrófagos peritoneais de ratos estimulados por lipopolissacarídeos (LPS) (KODALINGAM *et al.*, 2015). O estudo avaliou a produção de ânion superóxido por macrófagos estimulados por LPS pré-tratados ou não com os extratos. Alta concentração de espécies reativas de oxigênio foi detectada em macrófagos não tratados, enquanto os dois extratos inibiram significativamente a geração de ânion superóxido. Os autores concluíram que a propriedade citoprotetora dos extratos pode ser útil no combate de doenças inflamatórias.

Araújo e colaboradores (2019) avaliaram o efeito antioxidante e antiproliferativo da farinha de semente de *A. pavonina* tratada com amilase, celulase e protease. Os autores demonstraram aumento de atividade antioxidante e antiproliferativa sobre linhagens tumorais de próstata (PC-3) e rim (786-0) e sugeriram ser isso devido ao aumento de disponibilidade de compostos fenólicos.

O leite vegetal produzido a partir das sementes de *A. pavonina* foi avaliado quanto ao seu valor nutricional e toxicidade após administração diária por 14 dias em camundongos (AFOLABI *et al.*, 2018). O leite, em comparação ao leite de soja, apresentou maior concentração de proteínas (36,14%), Mg (96 mg/L), Ca (441 mg/L), K (190 mg/L), Na (64 mg/L) e Cu (55 mg/L) e menor concentração de Mn (0,004 mg/L) e das vitaminas A (indetectável), C (1,87 mg/100g) e E (12 mg/100g). A toxicidade do pró-leite foi feita através de sua administração diária por 14 dias em camundongos e avaliação de acetilcolinesterase, citocromo P450 e as ATPases (Ca²⁺-ATPase e Mg²⁺-ATPase). Os dados experimentais obtidos demonstraram que o leite tem valor nutricional pois aumentou a concentração de proteínas em todos os órgãos (menos o cérebro). O extrato promoveu diminuição na atividade da acetilcolinesterase no fígado, intestino, coração e rim. A acetilcolinesterase degrada o neurotransmissor acetilcolina que tem importância ímpar na memória, pensamento, atividades comportamentais e psicológicas. Caso ocorra um aumento da acetilcolinesterase existe um declínio direto desse neurotransmissor, o que pode levar a doenças associadas a disfunções neuronais (POLACHINI *et al.*, 2014). A pesquisa de Afolabi *et al.* (2018) indica que é recomendável a fortificação de vitaminas no pró-leite durante sua produção e que o leite tem efeitos promissores do leite na área de doenças neurológicas.

Huml *et al.* (2020) investigaram os nutrientes e compostos de sementes torradas e cruas de *A. pavonina*. As análises mostraram que os ácidos lignocérico, linoléico e oléico foram os

mais abundantes no óleo das sementes cruas e torradas, e que as suas quantidades em formas insaturadas foram maiores que saturadas. Ainda, foi indicado que as sementes são fontes ricas de vitamina E e ácido salicílico. Em decorrência de seus compostos, esse alimento é um potencial para a redução do risco de excesso de peso e doenças relacionadas à obesidade.

Owoeye *et al.* (2017) investigaram o óleo da semente de *A. pavonina* e determinaram que ele é rico em proteínas (27,72%) e fibra bruta (5,82%), tem pH 5,96 e possui teor de umidade, matéria orgânica e carboidratos de 13,34%, 97,49% e 54,36%, respectivamente. A caracterização mineral revelou a presença de manganês e ferro.

Os inibidores de tripsina são ferramentas utilizadas pelas plantas contra parasitas e, uma vez isolados, podem ser direcionados para aplicações biotecnológicas. A atividade larvicida do inibidor de protease de *A. pavonina* (ApTI) frente a *Aedes aegypti* foi testada por Sasaki *et al.* (2015). Os resultados mostraram que enzimas digestivas larvais não foram capazes de degradar o inibidor e que ele retardou o tempo de desenvolvimento larval, bem como, causou degeneração dos microvilos das células epiteliais da região posterior do intestino médio, hipertrofia das células gástricas e aumento do espaço ectoperitrófico.

O inibidor de tripsina das sementes de *A. pavonina* (ApKTI) apresentou atividade larvicida contra uma praga nociva a produtos que ficam em armazenamento, a traça *Plodia interpunctella*. ApKTI prejudicou o processo digestivo das larvas, acarretando na morte antes delas atingirem o estágio de pupa (OLIVEIRA *et al.*, 2019).

As sementes contêm carboidratos bioativos. O polissacarídeo quimicamente sulfatado denominado SPLSAp apresentou atividade antiviral (CI₅₀ de 1,18 µg/mL) contra o poliovírus tipo 1 (PV-1) em cultura de células HEP-2 (GODOI *et al.*, 2014). SPLSAp e o polissacarídeo nativo de *A. pavonina* (PLSAp) foram testados como potenciais compostos de terapia anti-herpética para o vírus do herpes simplex (HSV). Ambos tiveram atividade antiviral, entretanto, o SPLSAp apresentou um resultado mais significativo. Através das técnicas de reação de cadeia da polimerase (PCR) e ensaio de imunofluorescência (IFA) foi possível verificar a inibição da síntese de DNA e proteínas virais ocasionada por SPLSAp, demonstrando que esse composto conseguiu inibir HSV-1 em distintas fases de replicação (GODOI *et al.*, 2015).

Rechenchoski *et al.* (2019) também trabalharam com o polissacarídeo sulfatado das sementes de *A. pavonina* (SPAp) e investigaram sua ação *in vivo* contra vírus de herpes simplex resistentes e sensíveis a aciclovir. O SPAp demonstrou uma CI₅₀ de 0,49 µg/mL e 0,54 µg/mL para a cepa sensível e resistente, respectivamente. Os autores demonstraram que os camundongos que receberam o tratamento com SPAp tiveram um retardo no desenvolvimento e progressão das lesões cutâneas quando comparados ao grupo controle.

Outro carboidrato com atividade biológica presente em sementes de *A. pavonina* é o galactomanano (GAP). Marques *et al.* (2015) extraíram e isolaram o galactomanano a partir do endosperma das sementes e em seguida sulfataram o mesmo e avaliaram suas bioatividades. GAP sulfatado (25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) não foi citotóxico frente as células Vero, apresentou atividade antiviral (atividade inibitória de 77%) contra o vírus da dengue de sorotipo DENV-2 na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ e foi um agente antioxidante sequestrando o radical DPPH. É importante ressaltar que a infecção viral acarreta profundas mudanças no metabolismo do corpo que levam à geração de espécies reativas de oxigênio e, portanto, pode melhorar a patogenicidade da infecção. Sendo assim, a utilização do antioxidante pode auxiliar na prevenção ou na progressão da doença viral, o que faz do GAP sulfatado de *A. pavonina* um importante composto contra a o sorotipo DENV-2 (MARQUES *et al.*, 2015)

Melo e colaboradores (2018) utilizaram a semente de *A. pavonina* para extrair um heteropolissacarídeo galactomanano e avaliaram seu potencial como biopolímero através da caracterização de suas propriedades térmicas, fotoestabilidade, atividade antioxidante e toxicidade. Esse estudo demonstrou resultados significativos de atividade antioxidante pelo método do DPPH. Em relação à toxicidade, foi realizado um bioensaio com uma espécie de crustáceo (*Artemia salina* L.), o qual indicou que o biopolímero não é tóxico. O GAP foi fotoestável frente a irradiação UV. Todos esses resultados são comercialmente atraentes e sugerem a aplicação nas indústrias alimentícia e farmacêutica.

O surgimento de espécies bacterianas resistentes aos antibióticos disponíveis comercialmente tem estimulado a busca por proteínas naturais com atividade antibacteriana (SILVA *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2018). As sementes também têm o inibidor de tripsina denominado ApTI e a sequência aminoacídica dele foi utilizada por Rodrigues *et al.* (2018) para a formação de um peptídeo contendo 18 resíduos de aminoácidos. Rodrigues e colaboradores (2018) efetuaram alterações nos resíduos e suas localizações visando construir o peptídeo adevonina com carga líquida positiva e uma porção hidrofóbica e determinaram sua atividade antibacteriana. Adevonina inibiu o crescimento de cepas Gram-positivas e negativas com CIM variando de 1,86 a 7,35 μM . A atividade antimicrobiana da adevonina foi ainda avaliada contra uma cepa de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase. A CIM da adevonina contra *K. pneumoniae* foi de 25,6 μM , em contraste, o antibiótico comercial Imipenem não foi capaz de controlar o crescimento bacteriano na concentração de 250 μM (RODRIGUES *et al.*, 2018). Através de ensaios de efluxo de ácido nucleico, captação de violeta de genciana e cinética foi possível visualizar que o possível mecanismo de ação de adenovina é por promoção de danos na membrana bacteriana. Os autores realizaram o teste hemolítico

com eritrócitos humanos tipo O com a concentração de CIM e a adevonina não exerceu efeitos hemolíticos. Com o aumento da concentração foi visualizado hemólise a 175 μ M, valor 24 vezes maior que a CIM (RODRIGUES *et al.*, 2018).

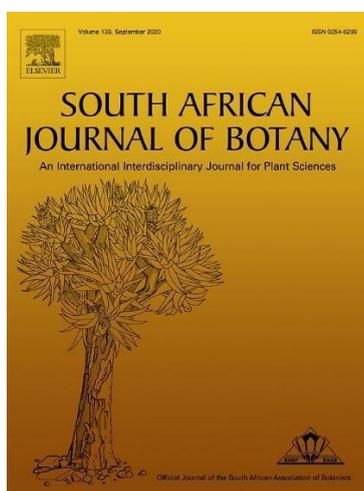
Almeida *et al.* (2020) também produziram um peptídeo antimicrobiano através da sequência de aminoácidos do inibidor de tripsina oriundo das sementes de *A. pavonina* (ApTI). O peptídeo resultante foi denominado adepamicina que mostrou atividade antimicrobiana de 0,9 a 3,6 μ M contra as cepas de *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Além de atividade frente *Candida albicans* e *Candida tropicalis*. O peptídeo não demonstrou ser tóxico em células humanas saudáveis.

4. ARTIGO 01

CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO SALINO DAS SEMENTES DE *Adenantha pavonina* L. E AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.

Artigo a ser submetido ao periódico

“South African Journal of Botany”



Fator de impacto: 1.792

Caracterização do extrato salino das sementes de *Adenantha pavonina* L. e avaliação da toxicidade aguda e atividade antimicrobiana.

Nathália Regina Galvão Silva^a, Leydianne Leite de Siqueira Patriota^a, Pollyanna Michelle da Silva^a, Alisson Macário de Oliveira^a, Magda Rhayanny Assunção Ferreira^b, Luiz Alberto Lira Soares^b, Thiago Henrique Napoleão^a, Patrícia Maria Guedes Paiva^{a,*}

^aDepartamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brazil.

^bDepartamento de Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, 50740-520, Recife, Pernambuco, Brazil.

*Corresponding author. Tel: +558121268540; fax: +558121268576.

E-mail address: ppaivaufpe@yahoo.com.br

Resumo

Adenanthera pavonina (Fabaceae) é uma espécie nativa da Ásia e popularmente utilizada como fonte nutricional e medicinal. A planta é amplamente estudada e diversas atividades foram comprovadas, como antiviral, antibacteriana, antioxidante, larvicida e sua utilidade para produção de pró-leite vegetal com alto teor nutricional. As plantas medicinais podem ter seu potencial farmacêutico e biotecnológico limitados devido a toxicidade e constituição fitoquímica. Este estudo investigou o extrato salino de sementes de *A. pavonina* quanto a presença de metabólitos secundários e proteína, toxicidade aguda e atividade antimicrobiana. O extrato salino foi obtido a partir do endosperma das sementes (1g:10 mL NaCl 0,5 M). Metabólitos secundários (flavonoides e derivados cinâmicos, alcaloides, saponinas, carboidratos, terpenos e esteroides) foram detectados através de cromatografia de camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A presença de atividade hemaglutinante (lectina), protease e tripsina-like foi detectada utilizando-se eritrócitos de coelho, azocaseína e o substrato sintético N-benzoil-DL-arginil-p-nitroanilida, respectivamente. Atividade enzimática também foi identificada após zimografia em gel. Os dados obtidos revelaram ausência de toxicidade aguda nas doses de 2000 e 5000 mg/kg e de atividade antibacteriana. O extrato apresentou atividade fungistática contra para *Cryptococcus neoformans* B3501, *Cryptococcus neoformans* H99 e *Cryptococcus gattii* com CMI de 92, 183 e 92 µg/mL, respectivamente. Em conclusão, o extrato de *A. pavonina* contendo metabólitos secundários e proteínas não é tóxico em elevadas doses e tem potencial uso como agente anti-*Cryptococcus*.

Keywords: lectina; *Cryptococcus*; fitoquímicos; toxicidade aguda.

1. Introdução

Adenanthera pavonina L. é uma leguminosa pertencente à família Fabaceae e subfamília Mimosoideae. É uma espécie nativa da Ásia, porém disseminada por toda região tropical e subtropical (Olajide et al., 2004). *A. pavonina* é uma planta relevante na Ásia tropical, África e diversas ilhas no Pacífico e regiões caribenhas (Godoi et al., 2014) por suas ações farmacológicas e nutricionais (Moniruzzaman et al., 2015, Afolabi et al., 2018). As folhas são usadas para inflamação e reumatismo (Moniruzzaman et al., 2015). A semente tem sabor semelhante a soja e é usada na alimentação de seres humanos e animais. A população consome as sementes torradas por serem altamente nutritivas devido ao alto teor de aminoácidos essenciais e não proteicos, ácido gama-metileno-glutâmico e o gama-metileno-glutamina (Owoeye et al., 2017). O consumo dessas sementes torradas pode também reduzir efeitos da obesidade (Huml et al., 2020)

Os tecidos de *A. pavonina* são vastamente estudados com relação aos seus compostos e diversas propriedades biológicas com potencial uso nutricional, biotecnológico e farmacológico já foram reportados, incluindo, antinociceptiva (Moniruzzaman et al., 2015); larvicida contra *Aedes aegypti* (Sasaki et al., 2015) e *Plodia interpunctella* (Oliveira et al., 2019); antioxidante e antidiabética (Wickramaratne et al., 2016); antibacteriana (Rodrigues et al., 2018; Almeida et al., 2020); produção de pró-leite com altos valores nutricionais e atividades bioquímicas relevantes na área de doenças neurológicas, tendo em vista que o pró-leite promoveu diminuição na atividade da acetilcolinesterase no fígado, intestino, coração e rim (Afolabi et al., 2018).

Apesar de todos os efeitos benéficos dessa espécie, no uso popular e os atribuídos cientificamente, é importante ressaltar a necessidade de entender e determinar a toxicidade de

produtos naturais, tendo em vista que esse fato pode restringir o potencial biotecnológico e farmacêutico do mesmo (Araújo et al., 2013).

Em decorrência do uso popular e nutricional desta espécie, este trabalho visou identificar a composição fitoquímica e proteica do extrato salino das sementes de *Adenantha pavonina* e avaliar sua toxicidade aguda e atividade antimicrobiana.

2. Material e métodos

2.1. Preparação do extrato salino

As sementes de *A. pavonina* L. foram coletadas em João Pessoa, Paraíba, nordeste do Brasil. A espécie foi identificada e cadastrada com o número JPB0063859 no herbário Lauro Pires Xavier da Universidade Federal da Paraíba. As sementes foram quebradas e o endosperma retirado foi triturado até a obtenção de uma farinha fina. Após extração (4 h, 28°C) da farinha com NaCl 0,5 M (1:10, p/v) e centrifugação (5000g, 30 min, 4°C), o sobrenadante coletado (extrato salino) foi dialisado contra água destilada por 3 h a 28°C.

2.2. Estudo de perfil químico por cromatografia em camada delgada (CCD)

Extrato salino solubilizado em 2 mL de metanol e duas gotas de dimetilsufóxido, foi submetida a sonicação em banho de ultrassom por 15 min e agitação em vortex. O extrato foi aplicado manualmente em placas cromatográficas de sílica gel 60 F254 (Merck®) e os sistemas de eluição, padrões e reveladores foram selecionados de acordo com o grupo de metabólito pesquisado. Os padrões foram preparados a 0,5 mg/mL em metanol, exceto ácido elágico que foi solubilizado a 2 mg/mL em dimetilsufóxido e diluído para 0,5 mg/mL com uma mistura 3:2 metanol:água. As amostras foram eluídas em cuba Camag® (10x10cm) com saturação prévia

de 30 min e ao final, reveladas com os reagentes descritos no quadro 1 e em seguida, observadas sob luz ultravioleta de 365 nm e luz visível.

2.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A análise por CLAE foi realizada num sistema de HPLC Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, EUA), acoplado a um detector arranjo de fotodiodo (DAD; Thermo Fisher Scientific) e equipado com bomba binária (HPG-3x00RS, Thermo Fisher Scientific), degaseificador e amostrador automático equipado com um loop de 20 µL (ACC-3000, Thermo Fisher Scientific). O comprimento de onda foi fixado em 270 nm para a detecção dos compostos fitoquímicos. As separações cromatográficas foram obtidas com uma coluna C18 (250 mm x 4,6 mm d.i., 5 µm) Dionex® equipada com pré-coluna (C18 de 4 mm x 3,9 m; Phenomenex®). As separações foram efetuadas a temperatura de 28 ± 1 °C. A fase móvel foi constituída por água ultrapura (A) e metanol (B), ambos acidificados com ácido trifluoroacético a 0,05%, e o fluxo ajustado a 0,8 mL/min. Um programa de gradiente foi aplicado como segue: 0-10 min, 12,5-25% de B; 10-17 min, 25-40% de B; 17-30 min, 40-75% de B; 30-33 min, 75% de B; 33-38 min, 75-12,5% de B. Os dados foram analisados, após a injeção em triplicata, e processados usando o software Chromeleon 6.8 (Dionex/Thermo Fisher Scientific, EUA).

2.4. Identificação de proteínas

A concentração de proteínas foi determinada de acordo com Lowry et al. (1951), utilizando uma curva padrão de albumina sérica bovina (31,25 a 500 µg/mL). A atividade hemaglutinante (AH) foi determinada a 27 °C de acordo com Paiva e Coelho (1992) em microplaca de 96 poços com fundo em V utilizando-se 50 µL da amostra e eritrócitos de coelhos (2,5%/v/v). A AH foi definida como a maior diluição da amostra que conseguiu promover

aglutinação das hemácias e a AH específica (AHE) foi estimada através da razão entre a AH e a concentração de proteína (mg/mL). Para a confirmação de que a atividade hemaglutinante era referente a lectinas, foi realizado o teste de inibição de carboidratos e glicoproteínas. Após a diluição seriada com o extrato e sacarídeos/glicoproteína, o ensaio foi incubado por 15 min e em seguida ocorreu a adição da suspensão de eritrócitos de coelho.

A AH foi caracterizada quanto aos efeitos: de íons com o uso de CaCl_2 20mM, MnCl_2 20mM e MgCl_2 20mM; temperatura de 30 a 100°C; e por fim o efeito do pH utilizando as seguintes soluções tampões para a faixa de pH: glicina-HCl 10 mM pH 4; Tampão de citrato fosfato 10 mM, pH 5 e 6; Fosfato de sódio 10 mM, pH 7; Tris-HCl 10 mM, pH 8, 9 e 10; e NaOH pH 11 e 12.

A atividade proteolítica foi determinada a 37°C de acordo com Azeez et al. (2007), utilizando extrato salino (100 µL), azocaseína 0,6% (p/v) (50 µL), triton X-100 0,1% (v/v) (100 µL) e tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,5 (50 µL); ao branco da reação foi adicionado 200 µL de ácido tricloroacético (TCA) 10% (p/v). Para parar a reação foi acrescentado 200 µL de TCA 10% (p/v) e após incubação (4 °C, 30 min), as misturas foram centrifugadas (9,000 g, 10 min) e o sobrenadante foi avaliado por absorvância a 366 nm. Uma unidade de atividade proteolítica (U) correspondeu à quantidade enzimática capaz de produzir peptídeos em concentração necessária para o aumento da absorvância em 0,01 nm em comparação ao branco. Também foi analisado os efeitos dos inibidores de proteases (Pepstatina A 8mM, E-64 8mM, PMSF 8mM e EDTA 8mM), a atividade residual da protease foi calculada de acordo com a fórmula: % inibição = 100 – [100 x (atividade na presença do inibidor / atividade no controle sem inibidor)]. Os ensaios foram realizados em triplicatas.

A atividade tripsina-*like* foi avaliada utilizando-se o substrato sintético N-benzoil-DL-arginil-p-nitroanilida (BAPNA). O extrato bruto (50 µL, 0,283 mg de proteína) foi incubado (60 min, 37 °C) com Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 (135 µL) e o substrato (8 mM, 15 µL). Também

foi realizado um branco para que ao final fosse descontado o valor da absorbância referente a coloração do extrato. A hidrólise do substrato foi seguida pela medição da absorbância a 405 nm. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 1 μ mol do substrato por minuto.

Zimografia foi realizada conforme descrito por García-Carreño et al. (1993). A amostra foi diluída no tampão de amostra [água; Tris HCl 0,5M pH 6,8; glicerol; 10% SDS, p/v; 0,5% de azul de bromefenol, v/v (38:13:26:20:2)] e submetido a eletroforese em gel de poliácridamida (PAGE) em presença de sulfato sódico de dodecila (SDS), usando gel a 12% (p/v), como descrito por Laemmli (1970). A corrida foi realizada a 4 °C e em seguida, o gel foi imerso em 2,5% de Triton X-100 em Tris-HCl 0,1M pH 8,0 para remoção do SDS. Então, o gel foi incubado com 3% de caseína (p/v) em Tris-HCl 0,1M pH 8,0 por 30 min a 4°C e depois por 90 min a 37 °C. Por fim, o gel foi corado usando 0,2% (p/v) de Coomassie Blue R-250 em metanol, água, ácido acético (40:50:10) por 3h e descorado com solução de metanol, água e ácido acético na mesma proporção. As faixas de luzes em destaque no fundo escuro indicam a atividade proteolítica.

2.5. Toxicidade aguda *in vivo*

2.5.1. Animais e grupos experimentais

Os experimentos foram realizados utilizando camundongos Swiss fêmeas (*Mus musculus*) pesando 30-35 g e obtidos no biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Assami (LIKA) da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram mantidos à temperatura de 21 ± 1 °C, ciclo claro escuro 12C: 12E com acesso ad libitum a comida (Purina®) e água. Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Pernambuco (processo número 0089/2019).

Os camundongos foram separados em três grupos ($n = 5$), de acordo com as instruções da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD): grupo controle, recebeu solução salina (veículo), e dois grupo de teste, que receberam 2000 ou 5000 mg/kg por via oral. Os camundongos foram observados inicialmente por 4 h e diariamente por 14 dias. Quanto aos sinais estado de consciência e disposição, atividade e coordenação do sistema motor e reflexos.

2.5.2. Análises bioquímica e hematológica

No final de ensaios de toxicidade, o sangue dos animais foi colhido e os seguintes parâmetros bioquímicos foram avaliados: proteína total, albumina, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina, gama-glutamil transferase (GGT), uréia e creatinina, usando kits específicos (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, Brasil) e um analisador COBAS Mira Plus (Roche Diagnostics Systems, Basel, Suíça). Análise hematológica foi realizada utilizando um analisador automático (Sangue de animal Counter-ABC Vet, Montpellier, França) e microscopia óptica; os parâmetros avaliados foram: eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e análise total e diferenciada dos leucócitos.

2.5.3. Massas dos órgãos

Após eutanásia dos animais, o fígado, rins, baço, pulmão, coração e estômago e cérebro foram retirados e pesados. O cálculo da massa dos órgãos de cada animal foi realizado pelo peso relativo de cada órgão (g) por 10 g animal no dia da coleta.

2.5.4. Análise histopatológica

A análise histológica do fígado, rim, baço, pulmão e estômago de animais do controle e de tratados com a substância teste foram realizadas por microscopia óptica. Fragmentos dos órgãos foram fixados em formalina tamponada (10%, v / v) e em seguida desidratadas através de uma série gradual de etanol (70-100%), diafanizado em xilol, e incluídos em parafina. Os cortes histológicos (5 mm) foram corados com hematoxilina-eosina e montado usando lamínulas com resina Entellan (Merck, Alemanha). Os materiais foram observados sob um microscópio Motic BA200 acoplado a um Moticom 1.000 1.3 MP câmera digital (Motic Incorporação Ltd, Causeway Bay, Hong Kong).

2.5.5. Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm SD e submetidos a ANOVA de um fator seguido de teste de Bonferroni, com nível de significância de $p < 0,05$.

2.6. Atividade antimicrobiana

2.6.1. Mircorganismos

As bactérias *Staphylococcus aureus* UFPEDA 02, *Micrococcus luteus* F00112, *Bacillus megaterium* ATCC 14945, *Escherichia coli* UFPEDA 224, *Enterococcus faecalis* ATCC-6057 e *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 416 foram da coleção de culturas (WDCM114) do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. Também foram avaliadas as cepas fúngicas *Candida albicans* URM 5901, *Candida krusei* URM 6391, *Candida glabrata* URM 4246, *Criptococcus Neoformans* (Sorotipo D) B3501, *Criptococcus*

Neoformans (sorotipo A) H99 e *Cryptococcus gattii* (Sorotipo B) R265 foram provenientes da coleção de culturas do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco e do Laboratório de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Para realização dos experimentos, as bactérias foram cultivadas em meio ágar Mueller Hinton e os fungos em ágar Sabouraud Dextrose overnight a 37 °C e 30 °C, respectivamente. Em seguida, as colônias foram ressuspensas em solução salina estéril (NaCl 0,15 M) e ajustadas turbidimetricamente a um comprimento de onda de 600 nm (DO_{600}) para a obtenção de suspensão bacteriana de 10^6 unidades formadoras de colônia (UFC) por mL e fúngica de 5×10^4 UFC/mL. Para o ensaio, as amostras foram filtradas em filtro de seringa PVDF (13 mm x 0,22 μ m) estéreis.

2.6.2. Determinação das concentrações mínima inibitória (CMI), bactericida (CMB) e fungicida (CMF)

A concentração mínima inibitória (CMI) foi determinada pelo ensaio de microdiluição proposto pelo Instituto de Normas Laboratoriais e Clínicas (CLSI, 2017, 2018). Em placas de microtitulação de 96 poços, a amostra foi adicionada (80 μ L) no terceiro e quarto poço a partir do qual foi diluída seriadamente em água destilada estéril até o décimo segundo poço da mesma fileira. Posteriormente, 40 μ L do meio caldo Mueller Hinton ou caldo Sabouraud Dextrose foram adicionados em todos os poços, exceto no primeiro, que foi preenchido com 200 μ L do meio de cultura, correspondendo ao controle de esterilidade. A suspensão bacteriana (80 μ L; 10^6 UFC/mL) ou fúngica (80 μ L; 5×10^4 UFC/mL) foram acrescentadas do segundo poço até o último poço da fileira. O segundo poço (que contém microrganismos na ausência da amostra) correspondeu ao controle de crescimento de 100%. As placas foram incubadas a 37 °C ou 30°C e a densidade óptica foi medida no tempo zero e após 24 h de incubação usando um leitor de microplacas. A concentração mínima inibitória (CMI) à correspondeu a menor concentração da

amostra capaz de promover a redução $\geq 50\%$ na densidade óptica, em comparação ao controle de crescimento 100%.

Para a determinação do CMB/CMF, alíquotas (10 μL) dos poços contendo concentrações das amostras $\geq \text{CMI}$ foram inoculados em placas de petri contendo meio agar Mueller Hinton ou agar Sabouraud Dextrose, que foram posteriormente incubados a 37 °C ou 30°C por 24 h. A CMB/CMF correspondeu a menor concentração da amostra capaz de reduzir o número de UFC em 99,9% em relação ao inóculo inicial. Cada ensaio foi realizado em triplicata e três experimentos independentes foram realizados.

3. Resultados e Discussão

A avaliação do uso de plantas medicinais e produtos naturais requer a identificação e quantificação de compostos fitoquímicos, com a finalidade de ser compreendida possíveis toxicidades e/ou ações biotecnológicas e farmacêutica.

Neste estudo a análise do extrato salino de *A. pavonina* por CCD revelou a presença de flavonoides e derivados cinâmicos, alcaloides, saponinas, carboidratos, terpenos e esteroides. Não foram observados taninos, derivados de antracênicos e cumarinas. Análise por CLAE (Figura 1) que revelou seis picos que estão evidenciados na figura 2.

Estudos com sementes de *A. pavonina* relataram presença de carboidratos no óleo extraído das sementes (Owoeye et al., 2017; Huml et al., 2020). Essa espécie possui uma riqueza de polissacarídeos, o que a torna alvo para a extração dos mesmos, carboidratos de *A. pavonina* tiveram apresentam atividades biológicas como: atividade antiviral para herpes simplex sensível e resistente a ciclovir, poliovirus tipo 1 (PV-1) e atividade antioxidante (Godoi et al., 2014, 2015; Melo et al., 2018; Rechenchoski et al., 2019).

As lectinas são um grupo de proteínas heterogêneas encontradas desde organismos mais simples até os mais complexos. As lectinas são capazes de estabelecer ligações específicas e

reversíveis com mono e oligossacarídeos (Cavada et al., 2018) e a especificidade da ligação possibilita que atuem como moléculas de reconhecimento. As plantas são consideradas a maior fonte de lectinas, sendo possível extrair e isolar essas proteínas de praticamente toda a sua anatomia, incluindo as sementes, cascas, folhas, frutos, raízes e tubérculos (Santos et al., 2014). Essas proteínas desempenham diversas atividades biológicas, como: antibacteriana (Coriolano et al., 2020), antifúngica (Silva et al., 2019), cicatrizante de feridas cutâneas (Moura et al., 2017).

O extrato salino de *A. pavonina* apresentou concentração de proteínas de 11,75 mg/mL. O extrato foi capaz de aglutinar eritrócitos de coelhos na presença de Ca^{2+} (21,78 U/mg) (Tabela 1). Para confirmar que o fenômeno observado era uma aglutinação promovida por lectinas e não uma dispersão das células induzida por outros compostos, foi feito o ensaio de inibição na presença de carboidratos e glicoproteínas (Coelho et al., 2017). A hemaglutinação foi inibida por N-acetilglicosamina e ovoalbumina, confirmando a presença de lectina. A tabela 1 mostra que a AH do extrato salino foi mantida até a temperatura de 50 °C, estável em pH 3-7 e completamente perdida em pH igual ou superior a 9.

Além de lectina, o extrato contém atividade proteolítica (115 U/mg). Proteases são enzimas capazes de catalisarem a hidrólise de ligações peptídicas, por consequência ocorre a degradação de proteínas (Thomas e Van der Hoorn, 2018). Algumas atividades relevantes para a pesquisa na saúde e biotecnologia foram descritas para as proteases, como efeito protetor contra tromboembolismo pulmonar (Choi et al., 2017), síntese de peptídeos com características antioxidante, antidiabética, anti-hipertensivas e anticarcinogências (Bah et al., 2016), atividade antimicrobiana (Dornelles et al., 2018), aplicação no processamento de carne para intensificar maciez e sabor (Sullivan e Calkins, 2010), embalagens de alimentos (Galet et al., 2012) e indústria cervejeira (Benucci et al., 2011).

As classes proteolíticas mais abundante nas plantas são as cisteínas, serina, treonina e asproteases aspárticas e metaloproteases (Dayanand, 2013). Os inibidores de proteases EDTA e PMSF diminuíram a atividade enzimática do extrato em 57,37% e 38,4%, respectivamente, sugerindo a presença de serina e metaloproteases. Em decorrência desses resultados, o extrato salino foi testado para atividade tripsina-*like* na presença do substrato BApNA (Tabela 2). Os dados revelam que o extrato salino possui atividade proteolítica capaz de quebrar ligações peptídicas que envolvem resíduos de arginina. A zimografia do extrato salino detectou a atividade proteolítica para uma banda polipeptídica com uma massa molecular de cerca de 28 kDa (Figura 3).

A. pavonina é uma planta utilizada na alimentação (Huml et al., 2020) e para tratamento de diversas doenças, como febre, reumatismo, diarreia, úlceras e asma (Rechenchoski et al., 2019). Considerando a importância desta espécie, é relevante avaliar sua segurança como planta medicinal e comestível. O ensaio de toxicidade aguda é geralmente utilizado para determinar a segurança de uma substância, além de fornecer bases iniciais para os mecanismos de toxicidade (Oliveira et al., 2018).

Nos ensaios de toxicidade aguda, não ocorreu morte ou alterações nos comportamentos observados nos grupos tratados com 2000 mg/kg e 5000 mg/kg do extrato comparado com o grupo controle. Também não ocorreu diferenças significativas no consumo de água, e comida ou no ganho de peso (Tabela 3).

Nas avaliações dos parâmetros hematológicos e bioquímicos (Tabela 4 e 5) não ocorreram mudanças significativas. As análises hematológicas são significativas para avaliar a toxicidade em mamíferos e os resultados em camundongos podem ser traduzidos para humanos (Olson et a., 2000). Ademais, esses parâmetros proporcionam dados acerca do sistema hematopoiético e as respostas imunológicas ocasionadas pela substância testada. Por exemplo,

níveis elevados de leucócitos podem indicar uma resposta imune e ser um marcador de estresse (Oliveira et al., 2019).

A análise macroscópica dos órgãos de animais tratados com *A. pavonina* não exibiram alteração de cor e textura quando comparado ao controle. Adicionalmente, não houve diferença significativa dos pesos relativos dos órgãos dos animais tratados com extrato salino em comparação com o grupo controle (Tabela 6). Na figura 4 temos a fotomicrografia de fígado, rim, baço e pulmão de animais controle e tratados com extrato de *A. pavonina*. O fígado de animais tratados com extrato de *A. pavonina* revelaram hepatócitos bem delimitados, núcleo com cromatina visível, bem como ducto biliares e veias centrolobulares preservadas. Nenhuma alteração foi observada no rim de animais tratados em comparação ao controle, se mostrando com néfrons preservados. Adicionalmente, o parênquima e septos intraveolares do grupo tratado com extrato não exibiram alterações. Ainda, o baço apresentou polpa branca e vermelha em sua arquitetura preservada. Desta forma, o extrato salino de *A. pavonina* não apresentou toxicidade aguda, sendo seguro para consumo humano e como planta medicinal.

As sementes de *A. pavonina* são alvos de diversos estudos e fonte para compostos bioativos. Desta forma, avaliamos a atividade antimicrobiana do extrato salino de *A. pavonina* frente cepas bacterianas e fúngicas. O extrato não apresentou atividade antibacteriana para as cepas *S. aureus*, *E. faecalis*, *M. luteus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *B. megaterium*.

Apesar de não termos obtido resultados frente cepas bacterianas, estudos demonstraram que peptídeos antimicrobianos foram isolados das sementes de *A. pavonina*. Rodrigues et al. (2018) apresentaram um peptídeo (adenovinn, o qual foi sintetizado através de um inibidor de tripsina extraído das sementes) com atividade antibacteriana para *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcesens*, *Klebsiella pneumoniae* KpC+ e *Staphylococcus aureus*. Tal como, Almeida et al. (2020) exibiu atividade antibacteriana para

um peptídeo oriundo de *A. pavonina* (adepamacina) contra as cepas *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*.

O extrato salino de *A. pavonina* diminuiu o crescimento de *C. neoformans* B3501, *C. neoformans* H99, *C. gattii* R265, com CMI de 92, 183 e 92 µg/mL, respectivamente (Tabela 7). O extrato não interferiu na sobrevivência dos fungos. Atividade antifúngica também foi relatada por Almeida et al. (2020) que utilizou as sementes como fonte para o isolamento do peptídeo adepamacina, o qual possuiu atividade para os fungos *Candida albicans* e *Candida tropicalis*.

4. Conclusão

O extrato salino de *A. pavonina* é uma mistura de metabólitos secundários, lectina e proteases (serinos e metaloproteases). O extrato salino não apresentou toxicidade aguda nas doses de 2000 e 50000 mg/kg desde que não induziu alterações hematológicas e bioquímicas em animais tratados. O extrato é um agente fungistático e possível alvo para investigações como produto natural contra *Criptococcus neoformans* e *Criptococcus gattii*.

Agradecimentos

Os autores expressam sua gratidão à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (IBPG-0921-2.08/18 ; APQ-0493-4.03/14) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - 405297/2018-1; CNPq - 307110/2018-4) pelo suporte financeiro.

Referências

- Afolabi, I. S., Nwachukwu, I. C., Ezeoke, C. S., Woke, R. C., Adegbite, O. A., Olawole, T. D., & Martins, O. C., 2018. Production of a new Plant-Based Milk from *Adenanthera pavonina* seed and evaluation of its nutritional and health Benefits. *Frontiers in nutrition*, 5, 9.
- Ara, A., Saleh-E-In, M. M., Hashem, M. A., Ahmad, M., & Hasan, C. M., 2019. Phytoconstituents of *Adenanthera pavonina* Linn from the bark extracts. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 8(1), 20.
- Araújo, L. C. C., Aguiar, J. S., Napoleão, T. H., Mota, F. V. B., Barros, A. L. S., Moura, M. C., et al., 2013. Evaluation of cytotoxic and anti-inflammatory activities of extracts and lectins from *Moringa oleifera* seeds. *PloS one*, 8(12), e81973.
- Araujo, N. M. P., Pereira, G. A., Arruda, H. S., Prado, L. G., Ruiz, A. L. T. G., Eberlin, M. N., et al., 2019. Enzymatic treatment improves the antioxidant and antiproliferative activities of *Adenanthera pavonina* L. seeds. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 18, 101002.
- Azeez, A., Sane, A. P., Bhatnagar, D., & Nath, P., 2007. Enhanced expression of serine proteases during floral senescence in *Gladiolus*. *Phytochemistry*, 68(10), 1352–1357
- Bah, C. S., Carne, A., McConnell, M. A., Mros, S., & Bekhit, A. E. D. A., 2016. Production of bioactive peptide hydrolysates from deer, sheep, pig and cattle red blood cell fractions using plant and fungal protease preparations. *Food Chemistry*, 202, 458-466.
- Benucci, I., Liburdi, K., Garzillo, A. M. V., & Esti, M., 2011. Bromelain from pineapple stem in alcoholic–acidic buffers for wine application. *Food Chemistry*, 124(4), 1349-1353.
- Cavada, B. S., Silva, M. T. L., Osterne, V. J. S., Pinto-Junior, V. R., Nascimento, A. P. M., Wolin, I. A. V., ... & Rocha, C. R. C., 2018. *Canavalia bonariensis* lectin: Molecular bases of glycoconjugates interaction and antiglioma potential. *International journal of biological macromolecules*, 106, 369-378.

- Choi, J. H., Kim, K. J., Kim, S. J., & Kim, S., 2017. Novel protease from the leaves of edible medicinal plant *Aster koraiensis* Nakai with antithrombotic activity: Purification and partial characterization. *Journal of Food Biochemistry*, 41(2), e12334.
- Coelho, L. C. B. B., Silva, P. M. D. S., Lima, V. L. D. M., Pontual, E. V., Paiva, P. M. G., Napoleao, T. H., & Correia, M. T. D. S., 2017. Lectins, interconnecting proteins with biotechnological/pharmacological and therapeutic applications. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017.
- Coriolano, M. C., Brito, J. S., Ferreira, G. R. S., Moura, M. C., Melo, C. M. L., Soares, A. K. A., et al., 2020. Antibacterial lectin from *Moringa oleifera* seeds (WSMoL) has differential action on growth, membrane permeability and protease secretory ability of Gram-positive and Gram-negative pathogens. *South African Journal of Botany*, 129, 198-205.
- Dayanand, C. D., 2013. Evaluation of comparative total proteolytic activity in plant lattices. *Int J Life Sci Biotech Pharm Res*, 2(1), 47-55.
- Dornelles, L. P., de Souza, M. D. F. D., da Silva, P. M., Procópio, T. F., Roldan Filho, R. S., de Albuquerque Lima, T., et al., 2018. Purification and characterization of a protease from the visceral mass of *Mytella charruana* and its evaluation to obtain antimicrobial peptides. *Food chemistry*, 245, 1169-1175.
- Garcia-Carreno, F. L., Dimes, L. E., & Haard, N. F., 1993. Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. *Analytical biochemistry*, 214(1), 65-69.
- Godoi, A. M, Faccin-Galhardi, L. C., Lopes, N., Nozawa, C., R de Almeida, R. R, MPS Ricardo, N., & Linhares, R E.C., 2015. Characterization and antiherpetic activity of native and chemically sulfated polysaccharide from *Adenanthera pavonina*. *Current pharmaceutical biotechnology*, 16(11), 1024-1031.

- Godoi, A. M. D., Faccin-Galhardi, L. C., Lopes, N., Rechenchoski, D. Z., de Almeida, R. R., Ricardo, N. M. P. S., et al., 2014. Antiviral activity of sulfated polysaccharide of *Adenantha pavonina* against poliovirus in HEP-2 cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014.
- Huml, L., Drabek, O., Pohorela, B., Kotikova, Z., Umar, M., Miksatkova, P., & Kokoska, L., 2020. Analysis of nutrients and compounds potentially reducing risks of overweightness and obesity-related diseases in raw and roasted *Adenantha pavonina* seeds from Samoa. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 100-108.
- Koodalingam, A., Manikandan, R., Indhumathi, M., & Kaviya, E. S., 2015. Cytoprotective and anti-inflammatory effects of kernel extract from *Adenantha pavonina* on lipopolysaccharide-stimulated rat peritoneal macrophages. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 8(2), 112-119.
- Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193(1): 265-75.
- Marques, M. M. M., Morais, S. M. D., Silva, A. R. A. D., Barroso, N. D., Pontes Filho, T. R., Araújo, F. M. D. C., ... & Guedes, M. I. F., 2015. Antiviral and antioxidant activities of sulfated galactomannans from plants of Caatinga Biome. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015.
- Melo, R. C., Geronço, M. S., Sousa, R. W. R., Ramos, L. P. S., Araújo, F. P., Ribeiro, A. B., ... & Costa, M. P., 2018. Biopolymer from *Adenantha pavonina* L. seeds: characterization, photostability, antioxidant activity, and biotoxicity evaluation. *International Journal of Polymer Science*, 2018.
- Moniruzzaman, M., Khatun, A., & Imam, M. Z., 2015. Evaluation of antinociceptive activity of ethanol extract of leaves of *Adenantha pavonina*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015.

- Muriel-Galet, V., López-Carballo, G., Gavara, R., & Hernández-Muñoz, P., 2012. Antimicrobial food packaging film based on the release of LAE from EVOH. *International Journal of Food Microbiology*, 157(2), 239-244.
- Olajide, O. A., Echianu, C. A., Adedapo, A. D., & Makinde, J. M., 2004. Anti-inflammatory studies on *Adenantha pavonina* seed extract. *Inflammopharmacology*, 12(2), 196-201.
- Oliveira, A. M., da Silva, W. A. V., Ferreira, M. R. A., Paiva, P. M. G., de Medeiros, P. L., Soares, L. A. L., ... & Napoleão, T. H., 2019. Assessment of 28-day oral toxicity and antipyretic activity of the saline extract from *Pilosocereus gounellei* (Cactaceae) stem in mice. *Journal of ethnopharmacology*
- Oliveira, C. F. R., de Oliveira Flores, T. M., Henrique Cardoso, M., Garcia Nogueira Oshiro, K., Russi, R., de França, A. F. J., et al., 2019. Dual insecticidal effects of *Adenantha pavonina* kunitz-type inhibitor on *Plodia interpunctella* is mediated by digestive enzymes inhibition and chitin-binding properties. *Molecules*, 24(23), 4344.
- Oliveira, L. H. A., Oliveira, C. F. R., Rodrigues, M. S., Neto, S. M., Boleti, A. P. A., Taveira, G. B., et al., 2020. Adepamycin: design, synthesis and biological properties of a new peptide with antimicrobial properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 691, 108487.
- Olson, H., Betton, G., Robinson, D., et al., 2000. Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 32, 56–67.
- rmacology, 234, 96-105.
- Owoeye T. F, Ajani O. O, Akinlabu D. K, & Ayanda O. I., 2017. Proximate composition, structural characterization and phytochemical screening of the seed oil of *Adenantha pavonina* Linn. *Rasayan J Chem*, 10 (3), p. 807-814.

- Paiva, P. M., & Coelho, L. C., 1992. Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (amarante bean). *Applied biochemistry and biotechnology*, 36(2), 113-118.
- Rechenchoski, D. Z., Agostinho, K. F., Faccin-Galhardi, L. C., Lonni, A. A. S. G., Cunha, A. P., Ricardo, N. M. P. S., et al., 2019. Antiherpetic Effect of Topical Formulations Containing Sulfated Polysaccharide from *Adenantha pavonina*. *Indian journal of microbiology*, 59(4), 417-421
- Rodrigues, M. S., Oliveira, C. F. D., Almeida, L. H., Neto, S. M., Boleti, A. P. A., Santos, E. L. D., et al., 2018. Adevonin, a novel synthetic antimicrobial peptide designed from the *Adenantha pavonina* trypsin inhibitor (ApTI) sequence. *Pathogens and global health*, 112(8), 438-447.
- Santos, A. F., Da Silva, M. D. C., Napoleão, T. H., Paiva, P. M. G., Correia, M. D. S., & Coelho, L. C. B. B., 2014. Lectins: Function, structure, biological properties and potential applications.
- Sasaki, D. Y., Jacobowski, A. C., de Souza, A. P., Cardoso, M. H., Franco, O. L., & Macedo, M. L. R., 2015. Effects of proteinase inhibitor from *Adenantha pavonina* seeds on short- and long-term larval development of *Aedes aegypti*. *Biochimie*, 112, 172-186.
- Silva, J. D. F., da Silva, S. P., da Silva, P. M., Vieira, A. M., de Araújo, L. C. C., de Albuquerque Lima, T., et al., 2019. *Portulaca elatior* root contains a trehalose-binding lectin with antibacterial and antifungal activities. *International journal of biological macromolecules*, 126, 291-297.
- Silva, G. C., de Oliveira, A. M., Machado, J. C. B., Ferreira, M. R. A., de Medeiros, P. L., Soares, L. A. L., ... & Napoleão, T. H., 2020. Toxicity assessment of saline extract and lectin-rich fraction from *Microgramma vacciniifolia* rhizome. *Toxicon*, 187, 65-74.

- Sullivan, G. A., & Calkins, C. R., 2010. Application of exogenous enzymes to beef muscle of high and low-connective tissue. *Meat science*, 85(4), 730-734.
- Thomas, E. L., & Van der Hoorn, R. A., 2018. Ten prominent host proteases in plant-pathogen interactions. *International journal of molecular sciences*, 19(2), 639.
- Wickramaratne, M. N., Punchihewa, J. C., & Wickramaratne, D. B. M., 2016. In-vitro alpha amylase inhibitory activity of the leaf extracts of *Adenantha pavonina*. *BMC complementary and alternative medicine*, 16(1), 466.

Legendas das figuras

Figura 1. Cromatograma a 350nm do salino das sementes de *Adenantha pavonina* por Cromatografia Líquida de Alta Performasse (CLAE).

Figura 2 Espectro UV dos picos detectados no extrato salino de *A. pavonina*.

Figura 3. Zimografia para proteases do extrato salino de sementes de *A. pavonina* utilizando caseína como substrato. Uma banda clara contra o fundo escuro indica a atividade de protease, correspondendo a um polipeptídeo de massa molecular de cerca de 28 kDa.

Figura 4: Fotomicrografias representativas dos fígados, rim, baço e pulmão de camundongos fêmeas dos grupos controle e tratados com dose única com o extrato salino das sementes de *A. pavonina* na dose de 2000mg/kg. Fígados: a veia centrolobular (cv) e espaço de Disse (ponta de seta) são vistos em todas as imagens. Rins: Glomérulos renais (Gr) e os tubos contorcidos (ponta de seta) são preservados e ordenados. Baço: Os linfonodos (Nd) são bem definidos nos

grupos de controle e tratados. Pulmão: Podem ser visualizados bronquíolos (Br) e cavidade alveolar (As) com arquitetura preservada no controle e tratamento. Foi utilizada coloração com hematoxilina e eosina. Ampliação: 400x no fígado, rim e pulmão. Ampliação 100 x no baço.

Tabela 1. Sumário da caracterização do extrato salino quanto a concentração de proteína e atividade hemaglutinante na presença de carboidratos, glicoproteína e em diferentes valores de temperatura e pH.

Atividade hemaglutinante (AH)	
<i>Proteínas (mg/mL)</i>	11,75
<i>Unidades (U)</i>	256
<i>AH específica (U/mg)</i>	21,78
<i>Carboidratos (0,2M) /glicoproteína (500 µg/mL)</i>	<i>AH específica (U/mg)</i>
Galactose	10,89
Glicose	21,78
Manose	10,89
<i>N</i> -acetilglicosamina	2,75
Ribose	10,89
Arabinose	21,78
Frutose	10,89
Maltose	21,78
Glicopiranoose	21,78
Lactose	21,78
Ovalbumina	2,72
<i>Temperatura (°C)</i>	
30	21,78
40	21,78
50	2,72
60 - 100	ND

<i>pH</i>	
3,0	21,78
4,0	21,78
5,0	21,78
6,0	21,78
7,0	21,78
8,0	2,72
9,0	0,680
10,0 – 12,0	ND

AH específica corresponde à razão entre o número de unidades e a concentração de proteína (mg/mL). ND – Não apresentou hemaglutinação.

Tabela 2. Caracterização do extrato salino quanto a atividade enzimática usando como substratos azocaseína (proteolítica) e N- α -benzoil-L-arginina-paranitroanilida (tripsina-like)

Atividade proteolítica (AP)	
<i>Proteínas (mg/mL)</i>	11,75
<i>Unidades (U)</i>	32,6
<i>AP específica (U/mg)</i>	115,2
Inibidores de atividade proteolítica	
	% de inibição
Pepstina A	17,49
EDTA	57,37
E-64	25,43
PMSF	38,4
Atividade tripsina-like (AT)	
<i>Proteína (mg)</i>	0,283
<i>Miliunidades (mU)</i>	0,755
<i>AT específica (mU/mg)</i>	2,670

Tabela 3. Consumo de água e alimentos e ganho de peso de camundongos controle e tratados com o extrato salino de *A. pavonina*

Parâmetro	Via de administração					
	Oral			Intraperitoneal		
	Controle	Extrato		Controle	Extrato	
		2000 mg/kg	5000 mg/kg		2000 mg/kg	5000 mg/kg
Consumo de água (mL)	30.44±0.14	30.21±0.16	30.50±0.11	29.89±0.64	30.09±0.55	32.55±0.22
Consumo de comida (g)	11.50±0.20	11.72±0.18	11.41±0.24	10.95±0.36	11.10±0.57	10.86±0.72
Ganho de peso (g)	4.51± 0.15	4.44±0.17	4.53±0.18	4.09±0.52	4.14±0.66	4.11±0.45

Os valores representam a média ± SEM (n = 3/grupo). Não foram encontradas diferenças significativas ($p > 0,05$) em comparação com os controles

Tabela 4: Parâmetros hematológicos de camundongos tratados com o extrato salino de *A. pavonina*.

Parâmetro	Via de administração					
	Oral			Intraperitoneal		
	Controle	Extrato		Controle	Extrato	
		2000 mg/kg	5000mg/kg		2000 mg/kg	5000 mg/kg
Eritrócitos ($10^6/\text{mm}^3$)	8.31±0.17	8.20±0.29	8.26±0.45	8.20±0.60	8.50±0.72	8.39±0.45
Hematócrito (%)	40.10±2.85	41.52±2.25	40.85±2.01	39.85±0.74	39.50±0.53	38.72±0.86
Hemoglobina (%)	15.74±0.76	15.55±0.64	15.11±0.54	15.30±0.40	15.74±0.84	15.02±0.64
MCV (%)	43.20±1.20	43.67±1.75	42.64±2.51	43.50±1.64	42.25±2.08	42.44±1.86
MCH (%)	16.65±0.51	16.09±0.91	16.14±0.82	16.44±0.41	17.05±1.11	16.88±1.02
MCHC (%)	35.92±0.45	35.13±0.72	36.02±0.84	35.71±0.57	35.41±0.68	34.46±1.50
Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	9.54±0.91	9.25±0.80	9.38±0.97	9.35±0.81	9.52±1.07	9.66±1.00
Segmentados (%)	61.34±0.68	60.86±0.52	60.28±0.74	61.04±1.32	60.11±1.20	61.11±2.34

Linfócitos (%)	27.41±0.26	28.38±0.41	29.40±0.55	28.21±0.44	29.18±0.72	28.22±1.05
Monócitos (%)	9.34±0.73	9.28±0.47	9.21±0.77	10.65±0.91	10.30±0.86	10.22±0.49

MCV: volume corpuscular médio; MCH: hemoglobina corpuscular média; MCHC: concentração média de hemoglobina corpuscular. Os valores representam a média ± SEM (n = 5 / grupo). Não foram encontradas diferenças significativas ($p > 0,05$) em comparação com o controle.

Tabela 5: Parâmetros bioquímicos do sangue de camundongos tratados com o extrato salino de *A. pavonina*

Parâmetros	Via de administração					
	Oral			In raperitoneal		
	Controle	Extrato		Controle	Extrato	
2000 mg/kg		5000 mg/kg	2000 mg/kg		5000 mg/kg	
Albumina (g/dL)	23.54±0.20	23.69±0.30	23.35±0.52	23.41±0.59	24.02±0.67	24.01±0.87
ALT (U/L)	64.72±0.39	65.06±0.47	65.44±0.44	65.34±0.42	64.7±0.87	65.42±0.91
AST (U/L)	98.87±2.41	97.31±1.32	97.54±2.47	97.04±2.02	97.22±2.47	96.74±2.32
Alcalina fosfatase (IU/L)	11.73±0.32	11.42±0.44	12.01±0.65	11.83±0.50	11.92±0.83	12.02±0.74
GGT (U/L)	8.34±0.30	8.21±0.52	8.44±0.68	8.33±0.52	8.72±0.77	8.44±0.62
Proteínas totais (g/dL)	42.10±2.34	41.42±2.50	42.53±2.44	41.54±2.33	42.74±2.52	42.77±2.11
BUN (mg/dL)	3.52±0.34	3.67±0.46	3.91±0.57	3.87±0.41	3.39±0.66	3.67±0.55
Creatinina (mg/dL)	4.48±0.58	4.41±0.49	4.27±0.43	4.34±0.51	4.37±0.75	4.40±0.31
Bilirrubina	0.29±0.04	0.27±0.08	0.27±0.09	0.24±0.05	0.25±0.08	0.24±0.07
Colesterol total (mg/dL)	112.87±4.88	107.22±5.04	107.34±7.52	108.34±5.15	106.38±4.27	105.57±4.26
Triglicerídeos (mg/dL)	85.87±3.47	84.17±2.19	86.87±3.44	89.3±4.31	90.61±4.08	91.44±4.47

ALT: Alanina aminotransferase; AST: Aspartato aminotransferase; GGT: gama-glutamil transferase; BUN: nitrogênio da uréia no sangue. Os valores representam a média ± SEM (n = 3 / grupo). Não foram encontradas diferenças significativas (p > 0,05) em comparação com o controle.

Tabela 6: Avaliação do peso relativo (g/10 g de peso corporal do animal) de camundongos tratados com o extrato o extrato salino de *A. pavonina*.

Peso Relativo (g/10 g)	Oral			Intraperitoneal		
	Controle	Extrato		Controle	Extrato	
		2000 mg/kg	5000 mg/kg		2000 mg/kg	5000 mg/kg
Fígado	2.04±0.19	2.06±0.17	2.10±0.13	2.09±0.12	2.11±0.07	2.12±0.14
Rim	0.31±0.02	0.29±0.04	0.30±0.05	0.29±0.03	0.30±0.04	0.33±0.04
Baço	0.24±0.04	0.26±0.02	0.27±0.05	0.28±0.02	0.29±0.03	0.30±0.03
Pulmão	0.22±0.03	0.25±0.03	0.23±0.04	0.23±0.02	0.25±0.05	0.24±0.03
Coração	0.17±0.02	0.19±0.03	0.20±0.02	0.20±0.03	0.21±0.02	0.18±0.04
Ovário	0.10±0.02	0.11±0.03	0.09±0.03	0.10±0.03	0.11±0.01	0.12±0.03

Os valores representam a média ± SEM (n = 3/grupo). Não foram encontradas diferenças significativas (p> 0,05) em comparação com o controle.

Não foram observadas diferenças significativas (p> 0,05) entre os grupos.

Tabela 7. Atividade antimicrobiana do extrato salino de *A. pavonina*

<i>Microrganismos</i>	<i>CMI</i>	<i>CBM/CFM</i>
Bactérias		
<i>S. aureus</i>	ND	ND
<i>E. faecalis</i>	ND	ND
<i>M. luteus</i>	ND	ND
<i>E. coli</i>	ND	ND
<i>P. aeruginosa</i>	ND	ND
<i>B. megaterium</i>	ND	ND
Fungos		
<i>C. albicans</i>	ND	ND
<i>C. krusei</i>	ND	ND
<i>C. glabrata</i>	ND	ND
<i>C. neoformans</i> B3501	92	ND
<i>C. neoformans</i> H99	182	ND
<i>C. gattii</i> R265	92	ND

CMI expresso em $\mu\text{g/mL}$; ND: não detectado.

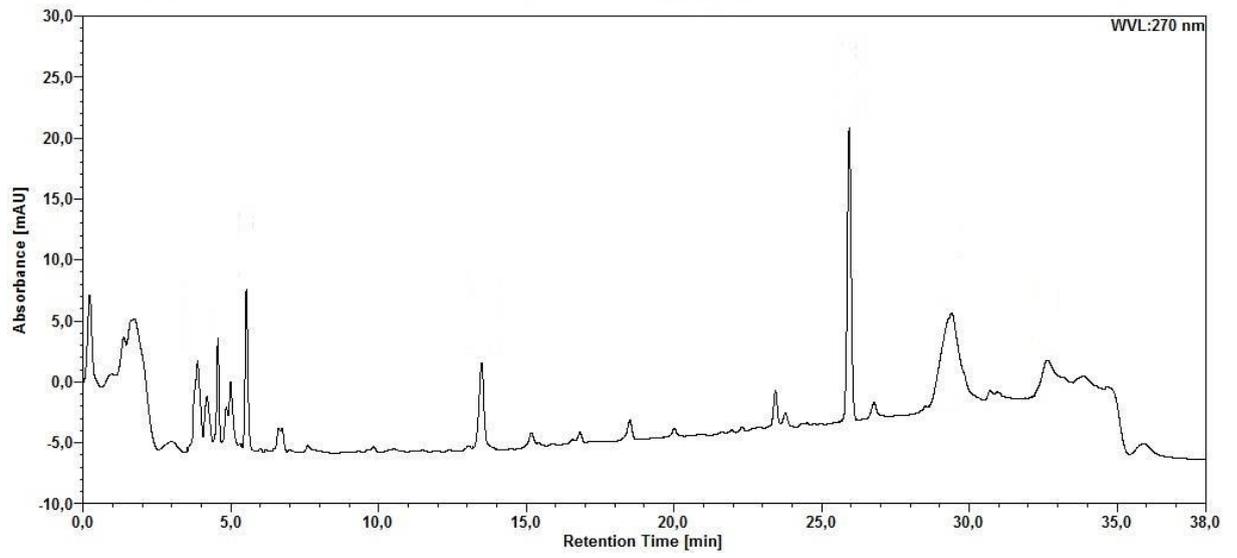
Figura 1.

Figure 2.

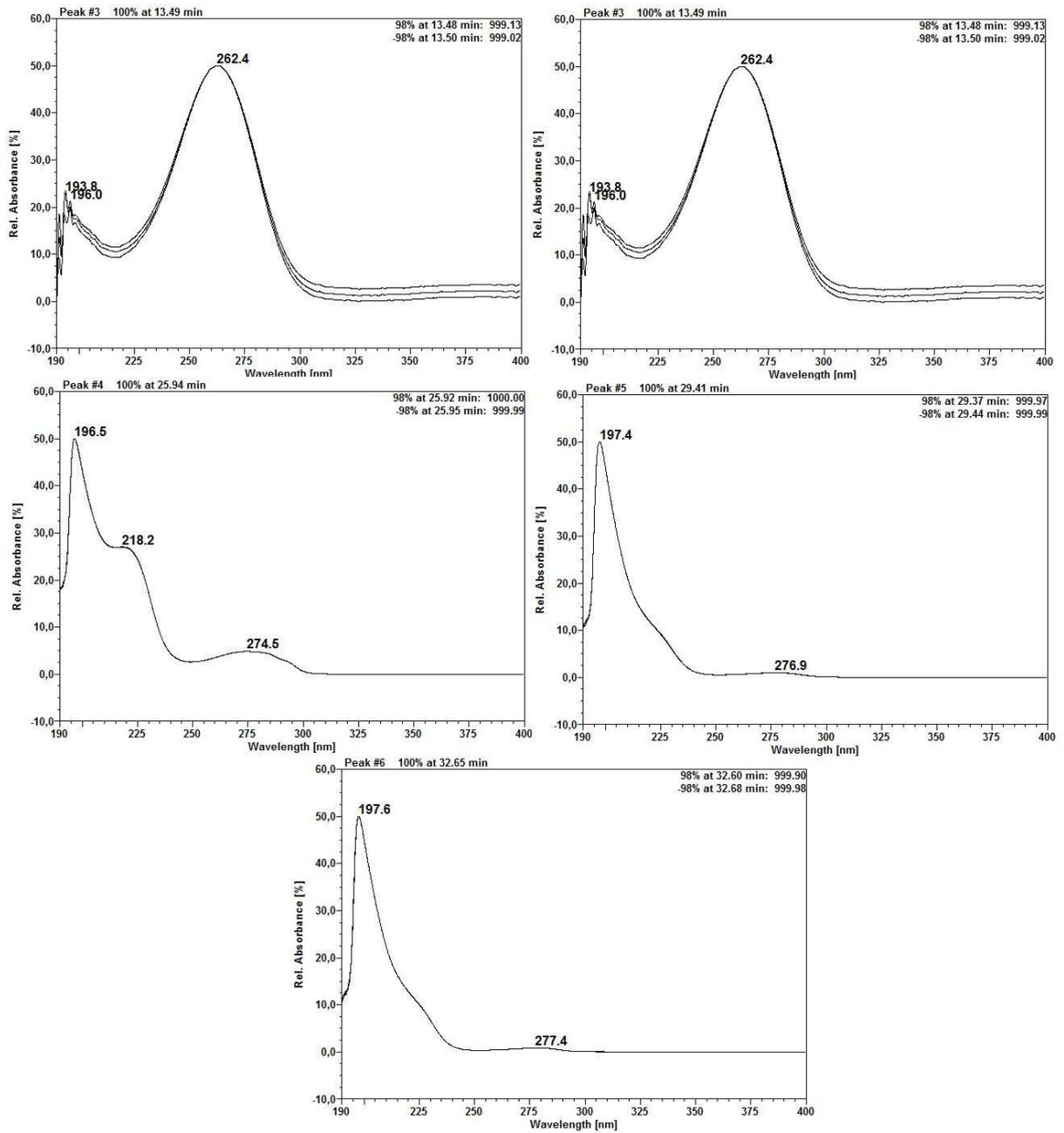


Figura 3

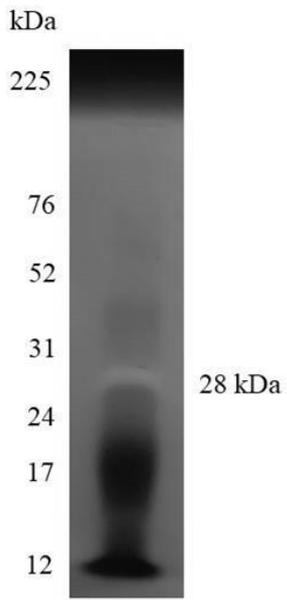
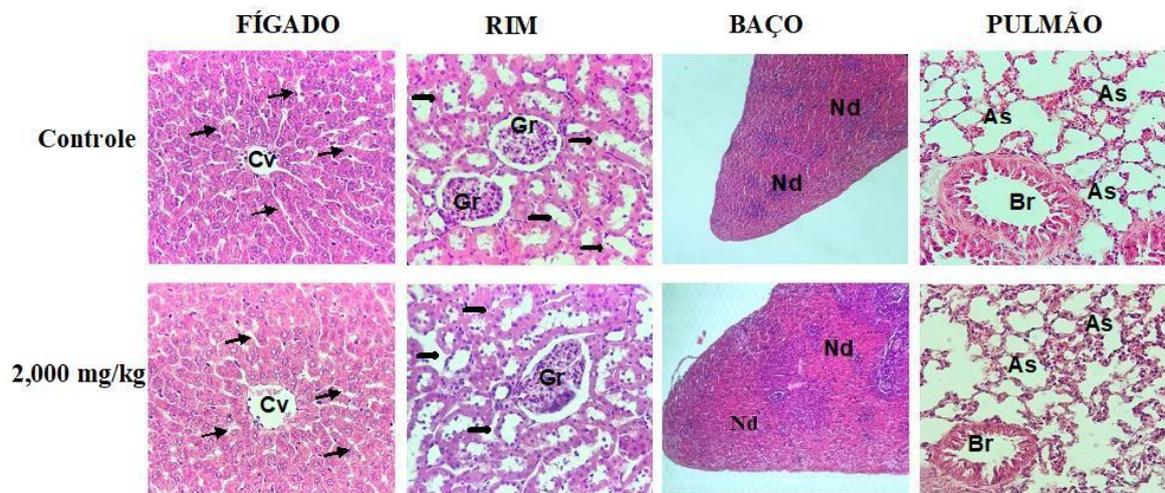


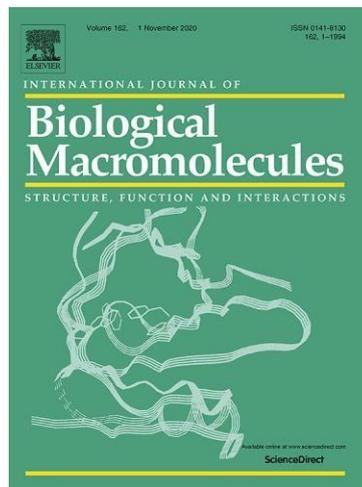
Figura 4:



**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA LECTINA DAS
SEMENTES DE *Adenantha pavonina* L. COM SÍTIO CATALÍTICO E
ATIVIDADE ANTIFÚNGICA.**

Artigo a ser submetido ao periódico

“International Journal of Biological Macromolecules”



Fator de impacto: 5.162

**Purificação e caracterização de uma lectina das sementes de *Adenantha pavonina* L.
com sítio catalítico e atividade antifúngica**

Nathália Regina Galvão Silva^a, Leydianne Leite de Siqueira Patriota^a, Pollyanna Michelle da Silva^a, Ana Patrícia Silva de Oliveira^a, Leonardo Prezzi Dornelles^a, Thiago Barbosa Cahú^b, Ranilson de Souza Bezerra^b, Thiago Henrique Napoleão^a, Patrícia Maria Guedes Paiva^a *

^aDepartamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brazil.

^bLaboratório de Enzimologia, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brazil.

*Corresponding author. Tel: +558121268540; fax: +558121268576.

E-mail address: ppaivaufpe@yahoo.com.br

Resumo

As lectinas são proteínas ou glicoproteínas hemaglutinantes que podem se ligar de forma específica ou reversível a carboidratos, através do domínio reconhecedor de carboidratos. Estão distribuídas em diversos organismos, como em plantas, microrganismos e animais. As lectinas apresentam atividades biológicas relevantes para a área da saúde e biotecnologia, como antimicrobiana, anti-inflamatória, cicatrizante e larvicida. Neste trabalho, a lectina de sementes de *Adenantha pavonina* (ApSeL) foi isolada, caracterizada estruturalmente e testada para atividade antimicrobiana. ApSeL é uma proteína básica, de massa molecular 28 kDa, pI 8,7 e com atividade proteolítica semelhante a tripsina. A atividade hemaglutinante (AH) de ApSeL foi estável entre 30 e 80 °C e na faixa de pH 4-8. A investigação da atividade antimicrobiana de ApSeL contra 06 espécies de bactéria e 06 espécies do gênero *Candida*, revelou que a lectina apenas reduziu o crescimento de *Candida albicans* e *C. krusei* (concentração inibitória mínima de 120 e 300 µg/mL, respectivamente). Em conclusão, sementes de *A. pavonina* são fonte de lectina com atividade proteolítica e fungistática contra *Candida*.

Palavras-chave: Atividade hemaglutinante; fungo; protease; semente.

1. Introdução

As lectinas são um grupo de proteínas heterogêneas, com a capacidade de estabelecer ligações específicas e reversíveis com mono e oligossacarídeos [1]. Diversos estudos descrevem as atividades biológicas relacionadas às lectinas, como anti-inflamatória [2], antibacteriana [3] e antifúngica [4]. A lectina pode reagir com carboidratos expostos na membrana externa de microrganismos, promovendo a atividade inibitória de crescimento ou promovendo morte celular [5].

Adenanthera pavonina L. é uma espécie nativa da Ásia, porém disseminada por todo o mundo. No Brasil é conhecida popularmente como carolina, olho de Pombo ou olho de dragão [6]. Essa planta é muito utilizada pela sociedade na Ásia tropical, África e diversas ilhas no pacífico e regiões caribenhas por suas ações farmacológicas e nutricionais [7]. A semente de *A. pavonina* é utilizada como alimento pela população, que consome a mesma torrada e seu teor nutricional é equivalente ao da soja [8], além de ser fonte do peptídeo antibacteriano adenovin [9] e do carboidrato galactomanana com atividade antioxidante [10]. Adicionalmente, foi relatada que extrato da farinha de semente obteve atividade antiproliferativa para linhagens tumorais de próstata e rim [11].

Este trabalho teve como objetivo isolar e caracterizar a uma lectina das sementes de *A. pavonina* (ApSeL) e avaliar sua atividade antimicrobiana. O nosso trabalho é o primeiro a relatar uma lectina com sítio catalítico de *A. pavonina*.

2. Material e Métodos

2.1. Preparação do extrato

As sementes de *Adenantha pavonina* foram coletadas em João Pessoa, estado da Paraíba, Brazil. O voucher do espécime (JPB0063859) foi depositado no herbário Lauro Pires Xavier, na Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Para a extração da lectina foi utilizado o endosperma da semente, o qual foi triturado em uma farinha fina. A farinha da semente (10 g) foi homogeneizada (4 h, 27 °C) usando agitador magnético com 100 mL de NaCl 0,5 M contendo CaCl₂ 40mM e em seguida, a mistura foi centrifugada (9000g, 4 °C, 20 min) e o sobrenadante coletado e dialisado contra água destilada por 3 h a 28°C, correspondeu ao extrato.

2.2. Isolamento da lectina de sementes de A. pavonina (ApSeL)

O extrato (11,75 mg de proteínas) foi aplicado em coluna contendo quitina de camarão (7,5 x 1., cm) produzida no Laboratório de Enzimologia da Universidade Federal de Pernambuco e equilibrada com NaCl 0,15M. Em seguida, a coluna foi lavada com NaCl 0,15M (40mL) e ApSeL recuperada da coluna com ácido acético 1 M (50 mL) foi dialisada em água destilada (6 h) para remoção do eluente.

2.3. Determinação da concentração de proteínas e atividade hemaglutinante (AH)

A concentração de proteínas foi estimada de acordo com Lowry et al. [12] usando uma curva padrão (31,25 a 500 µg/mL) de albumina sérica bovina. Para a atividade hemaglutinante (AH) foi utilizada microplacas de 96 poços com fundo em V, onde foi aplicado 50 µL da amostra e realizada diluição dupla seriada em NaCl 0,15M. Então, 50 µL de eritrócitos de coelho (2,5%/v/v) foi adicionado em cada poço; o controle constou apenas de NaCl 0,15 M com a suspensão de eritrócitos. Após incubação (27 °C, 45 min) da placa, a AH foi determinada e correspondeu a maior diluição da amostra que conseguiu aglutinar as hemácias. A AH

específica (AHE) foi estimada através da razão entre a AH e a concentração de proteína (mg/mL) [13].

2.4. Caracterização de ApSeL

2.4.1. Especificidade de ligação de carboidratos

A especificidade de ApSeL foi estabelecida através do ensaio de inibição da AH. A lectina foi serialmente diluída em soluções (0,2 M) dos carboidratos galactose, glicose, manose, N-acetilglicosamina, ribose e da glicoproteína ovoalbumina (0,5 mg/mL). Após a diluição, a placa foi incubada (27 °C, 15 min) antes da adição da suspensão de eritrócitos de coelho. A AH foi determinada como descrito em 2.3.

2.4.2. Efeitos do pH, temperatura e íons na AH

O efeito da temperatura na AH foi determinado utilizando-se ApSeL previamente aquecida por 30 min a 30-100 °C. Para determinar o efeito do pH na AH, a lectina foi incubada (15 min) com glicina-HCl 10 mM pH 4, tampão de citrato fosfato 10 mM, pH 5 e 6, fosfato de sódio 10 mM, pH 7, tris-HCl 10 mM, pH 8, 9 e 10 ou NaOH pH 11 e 12, antes do ensaio de hemaglutinação. A AH de ApSeL também foi determinada na presença de íons (Ca^{2+} , Mn^{2+} e Mg^{2+}). Com esta finalidade, a solução de NaCl foi substituída por 10mM CaCl_2 , MgCl_2 , ou MnCl_2 .

2.4.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida e focalização isoeletrica

ApSeL (150 µg) foi avaliada por eletroforese de gel de poliacrilamida (PAGE) para proteínas nativas básicas [14](referencia) e ácidas [15] (referencia) e em presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) de acordo com Laemmli et al. [16]. Marcador de peso molecular (12-225kDa, GE Healthcare Life Sciences) foi utilizado e os géis foram corados com 0,2% (p/v) de Coomassie Blue R-250 em metanol, água, ácido acético (40:50:10) por 3h.

O ponto isoelétrico de ApSeL foi determinado por focalização isoelétrica. Alíquota de ApSeL (150 µg) foi solubilizada no tampão de reidratação (uréia 8 M, 2% (p/v) CHAPS, 1% (v/v) tampão IPG pH 3-10, 0,002% (p/v) azul de bromofenol). Essa solução com ApSeL foi utilizada na reidratação da fita (7cm, gradiente linear pH 3-10) por 16 h a 28 °C. A focalização isoelétrica foi realizada no sistema ETTAN IPGhor III (GE Healthcare Life Sciences, Suécia) de acordo com as instruções do fabricante. A fita foi então lavada três vezes com a solução de equilíbrio (tris-HCl 50 mM pH 8,8; 30% (v/v) glicerol e 0,002% (p/v) azul de bromofenol). Subsequente, foi feito um gel de SDS-PAGE e a fita transferida para o topo do mesmo. Após a corrida, o gel foi corado com 0,2% (p/v) de Coomassie Blue R-250 em metanol, água, ácido acético (40:50:10) por 3 h. A análise foi realizada com o software ImageMaster (GE Healthcare Life Sciences, Suécia).

2.4.4. *Ensaio proteolítico*

A atividade proteolítica foi determinada usando azocaseína como substrato, de acordo com Azeez et al. [17]. ApSeL (100 µL) foi adicionada ao tampão da reação (300 µL de fosfato de sódio 0,1 M pH 7,5), seguido de 100 µL de triton X-100 0,1% (v/v) e 50 µL de azocaseína 0,6% (p/v), nos brancos foram adicionados 200 µL de ácido tricloroacético (TCA) a 10% (p/v). Após incubação (37 °C por 3 h), a reação foi interrompida pela adição de 200 µL de TCA 10% e a mistura foi incubada a 4°C por 30 min. Ao fim, o ensaio foi centrifugado a 9000g por 10

min e o sobrenadante foi lido em absorvância de 366nm. Uma unidade de atividade proteolítica (U) corresponde à quantidade de enzima capaz de produzir peptídeos em concentração necessária para o aumento da absorvância em 0,01 em comparação ao branco. Os ensaios foram realizados em triplicatas.

A atividade proteolítica também foi determinada após incubação (37 °C, 30 min) de ApSeL (50 µg, 100µL) com soluções (8 mM) dos inibidores de proteases pepstatina A, E-64, PMSF e EDTA. A atividade residual da protease foi calculada de acordo com a formula: % inibição = 100 – [100 x (atividade na presença do inibidor / atividade no controle sem inibidor)]. Os ensaios foram realizados em triplicatas.

A atividade *tripsina-like* foi avaliada utilizando-se o substrato sintético N-benzoil-DL-arginil-p-nitroanilida (BAPNA). ApSeL (50 µL, 0,05 mg de proteína) foi incubada por 60 min a 37 °C com tris-HCl 0,1 M pH 8,0 (135 µL) e o substrato (8 mM, 15 µL). A hidrólise do substrato foi seguida pela medição da absorvância a 405 nm. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 1 µmol do substrato por minuto. Os ensaios foram realizados em triplicatas.

A detecção de atividade proteolítica por zimografia foi realizada conforme descrito por García-Carreño et al. [18]. A amostra de ApSeL foi diluída no tampão de amostra [água; Tris HCl 0,5M pH 6,8; glicerol; 10% SDS, p/v; 0,5% de azul de bromefenol, v/v (38:13:26:20:2)] e submetido a SDS-PAGE, usando gel a 12% (p/v), como descrito por Laemmli et al. [16]. A corrida foi realizada a 4 °C. Ao término, o gel foi imerso em 2,5% de triton X-100 em tris-HCl 0,1 M pH 8,0 para que o SDS fosse removido. Em seguida, o gel foi incubado com 3% de caseína (p/v) em tris-HCl 0,1 M pH 8,0 por 30 min a 4°C e depois por 90 min a 37 °C. Por fim, o gel foi corado usando 0,2% (p/v) de Coomassie Blue R-250 em metanol, água, ácido acético

(40:50:10) por 3 h e descorado com solução de metanol, água e ácido acético na mesma proporção. As faixas de luzes em destaque no fundo escuro indicam a atividade proteolítica.

2.5. Ensaio antimicrobiano

Neste estudo foram utilizadas as cepas microbianas: *Staphylococcus aureus* UFPEDA 02, *Micrococcus luteus* F00112, *Bacillus megaterium* ATCC 14945, *Escherichia coli* UFPEDA 224, *Enterococcus faecalis* ATCC-6057, *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 416, *Candida albicans* URM 5901, *Candida krusei* URM 6391, *Candida glabrata* URM 4246, *Criptococcus Neoformans* (Sorotipo D) B3501, *Criptococcus Neoformans* (sorotipo A) H99 e *Criptococcus gattii* (Sorotipo B) R265.

As bactérias foram fornecidas pela coleção de culturas (WDCM114) do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. Os fungos foram obtidos da coleção de culturas da Universidade do Recife Micologia, localizada no Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco e do Laboratório de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica, localizado no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Para realização dos experimentos, as bactérias foram cultivadas em meio agar Mueller Hinton e os fungos em agar Sabouraud Dextrose overnight a 37°C e 30°C, respectivamente. Em seguida, as colônias foram ressuspendidas em solução salina estéril (NaCl 0,15 M) e ajustadas turbidimetricamente a um comprimento de onda de 600 nm (DO_{600}) para a obtenção de suspensão bacteriana de 10^6 UFC/mL e fúngica de 5×10^4 UFC/mL. Para o ensaio, as amostras foram filtradas em filtro de seringa PVDF 13 mm x 0,22 μ m estéreis. Os ensaios foram realizados em microplacas de 96 poços de fundo plano. A amostra (ApSeL em $CaCl_2$ 1 mg/mL; 100 μ L) foi diluída no meio de cultura a partir do terceiro poço, no primeiro poço foi adicionado

100 μL do meio de cultura (controle de esterilidade) e no segundo foi colocado meio de cultura e CaCl_2 na proporção 1:1 (controle do crescimento 100%). Subsequente, 20 μL da suspensão microbiana foi adicionada em cada poço e incubado por 24h a 28°C. A densidade óptica (DO) foi realizada a 600nm no tempo zero hora e após 24horas. A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como sendo a menor concentração capaz de inibir maior ou igual a 50% do crescimento em comparação com o crescimento 100%. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Para a determinação do CMB/CMF, alíquotas (10 μL) dos poços contendo concentrações das amostras $\geq \text{CMI}_{50}$ foram inoculadas em placas de petri contendo meio ágar Mueller Hinton ou Sabouraud Dextrose e posteriormente incubadas (24 h) a 37 °C ou 28 °C por 24 h. O CMB/CMF corresponde a menor concentração da amostra capaz de reduzir o número de UFC em 99,9% em relação ao inóculo inicial. Cada ensaio foi realizado em triplicata e três experimentos independentes foram realizados.

2.6. Análises estatísticas

Os dados são expressos como média ou a média percentual \pm padrão desvio (DP) e diferenças estatísticas foram determinadas usando o teste de Tukey's ; um valor de $p < 0,05$ foi considerado para indicar diferenças estatisticamente significativas.

3. Resultados e discussão

O extrato salino das sementes de *A. pavonina* apresentou uma concentração de proteínas de 11,75 mg/mL e AH específica de 0,68, porém quando o ensaio de AH foi realizado na presença de Ca^{2+} 20 mM, ocorreu aumento na AH específica para 21,7. Lectinas que apresentam AH dependente de Ca^+ e Mn^+ foram isoladas de plantas e animais [20-22] e o aumento de AH pode ser em resposta aos íons estabilizarem a estrutura do domínio

reconhecedor de carboidratos, a falta causa instabilidade e possível perda do potencial de ligação ao carboidrato [23].

A AH do extrato foi principalmente inibida por ovoalbumina e N-acetilglicosamina, comprovando que aglutinação foi promovida pela lectina [24]. Devido ao efeito do monossacarídeo na AH, uma coluna contendo quitina (polissacarídeo de N-acetilglicosamina) produzida a partir de casca de camarão [25] foi utilizada no processo cromatográfico visando o isolamento da lectina. O perfil cromatográfico (Figura 1) mostra a presença de dois picos, o PI, contendo proteínas não adsorvidas e o PII, com proteínas que ligaram a matriz e foram eluídas com ácido acético 1M. AH na presença de Ca^{2+} 20 mM, só foi detectada no PII e, portanto, a preparação correspondeu a ApSeL isolada (fator de purificação de 8,60 vezes) com AH específica de 187,41 (Tabela 1).

A análise qualitativa de proteínas presentes em PII foi realizada por PAGE em condições nativas para proteínas ácidas e básicas, SDS-PAGE e focalização isoeletrica (Figura 1). Os resultados revelam que ApSeL é uma proteína básica com pI de 8,7 e constituída por subunidade de 28 kDa. A caracterização da AH de ApSeL após a incubação em diferentes valores de temperatura e pH, revelaram que a AH é estável até 80 °C (Figura 2A) e na faixa de pH 5-8,0 (Figure 2B).

Avaliação de atividade proteolítica in vitro de ApSeL utilizando azocaseína como substrato, revelou que a lectina exibiu atividade proteolítica específica de 477 U/mg (Tabela 1). A atividade proteolítica foi reduzida em 49,95% com o inibidor de serinoprotease PMSF e esse fato nos estimulou a avaliar a atividade enzimática de ApSeL com o substrato da tripsina, uma serinoprotease [26]. A tabela 1 mostra que a lectina clivou o BApNA (19,747 mU/mg) e assim, o estudo revelou que ApSeL é uma enzima do tipo tripsina-like, uma vez que quebrou ligações peptídicas que envolvem resíduos de arginina. As serinoproteases são associadas a processos fisiológicos, como sinalização celular, digestão e resposta imune inata [27] e

extensamente estudadas em decorrência dos seus efeitos em tratamento de inflamações e cicatrizações. O composto quelante de metais EDTA reduziu em 40,42% a capacidade de ApseL hidrolisar a azocaseína e isso pode ser devido a quelação do Ca^{2+} . O estudo do efeito do Ca^{2+} na AH e atividade proteolítica de ApSeL revela a importância do íon na estrutura e função da lectina.

A partir do ensaio de zimografia, utilizando caseína como substrato, foi possível identificar que a atividade proteolítica ocorreu no mesmo peso molecular que a lectina, cerca de 28 kDa (Figura 3). As proteínas são capazes de serem multifuncionais, ou seja, dispõem de múltiplas funções catalíticas ou de ligação [28] e as lectinas são classificadas como quimerolectinas quando apresentam um ou mais domínios de ligação ao carboidrato (DRC) e outro sítio de ligação que pode possuir atividade catalítica ou biológica de forma independente do DRC [29]. São exemplos de quimerolectinas as lectinas MOA e PSL1 com atividade proteolítica para o substrato de cisteína [30,31], a lectina de *Ranacates beiana* com atividade de ribonuclease [32] e a lectina MvFL com atividade de inibidor de tripsina [33].

O gênero *Candida* abrange espécies patogênicas oportunistas que normalmente habitam a mucosa de indivíduos saudáveis. Por serem espécies oportunistas, quando o sistema imunológico está prejudicado, elas podem desencadear infecções sistêmicas no hospedeiro, com altas taxas de mortalidade [34]. As espécies mais relevantes para a área da saúde e desenvolvimento de fármacos são: *C. albicans*, *C. glabrata.*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei* [35]. A crescente resistência desses fungos aos fármacos existentes tem sido descrita, isto fermenta a busca por novos compostos antifúngicos, principalmente de origem natural [36,37].

Os dados dos testes antibacterianos mostraram que ApSeL não interferiu no crescimento e sobrevivência das cepas bacterianas testadas enquanto apenas inibiu o crescimento de *C. krusei* e *C. albicans* com CMI de 160 e 320 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Tabela 3). As lectinas isoladas de *Portulaca*

elatior e *Alpina purpurata* também foram agentes fungistáticos para espécies do gênero *Candida* com CIM de 16µg/mL e 200-400 µg/mL, respectivamente [38,39]. A lectina de *Machaerium acutifolium* é uma proteína de ligação a N-acetilglicosamina com atividade antifúngica para *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* [40].

Os mecanismos de ação antifúngico de lectinas envolve a promoção de alterações morfológicas, dano a dano a parede celular, estresse oxidativo e colapso energético [4]. A atividade antifúngica de ApSeL pode ser atribuída a interação da lectina com resíduos de N-acetilglicosamina presente na parede do fungo. Um antifúngico que tenha a parede celular como alvo, é considerado uma fonte eficiente de inibição para o crescimento do microrganismo [41].

4. Conclusão

As sementes de *A. pavonina* são fontes de ApSeL, lectina básica com AH dependente de C^{2+} e estável em elevadas temperaturas e ampla faixa de pH. ApSeL é uma quimerolectina, desde que também possui atividade proteolítica semelhante a tripsina. O estudo também revelou uma lectina com ação fungistática contra espécies do gênero *Candida*.

Agradecimentos

Os autores expressão sua gratidão à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (IBPG-0921-2.08/18) pelo suporte financeiro.

Referências

- [1] B.S., Cavada, M.T.L, Silva, V.J.S, Osterne, V.R., Pinto-Junior., et al. Canavalia bonariensis lectin: Molecular bases of glycoconjugates interaction and antiglioma potential. *Int. J. Biol. Macromol.* 106 (2018): 369-378.
- [2] .K.L. Campos, C.S.F. Araújo, T.F. Araújo, A.F.S. Santos, J.A. Teixeira, V.L.M. Lima, L.C.B.B. Coelho, Anti-inflammatory and antinociceptive activities of Bauhinia monandra leaf lectin, *Biochim. Open* 2 (2016) 62–68.
- [3] P.M. Silva, M., Braldry, M., P., Peng., J. N. O., Silva., et al. Punica granatum sarcotesta lectin (PgTeL) impairs growth, structure, viability, aggregation, and biofilm formation ability of Staphylococcus aureus clinical isolates *Int. J. Biol. Macromol.* 123 (2019): 600-608
- [4] P.M. Silva, M.C. Moura, F.S. Gomes, D. S. Trentin, A.P.S. Oliveira, et al. PgTeL, the lectin found in Punica granatum juice, is an antifungal agent against Candida albicans and Candida krusei. *Int. J. Biol. Macromol.* 108 (2018): 391-400.
- [5] T.F. Procópio, L.L.S. Patriota, M.C. Moura, P.M. Silva, A.P.S. Oliveira, L.V.N. Carvalho, T.A. Lima, T. Soares, T.D. Silva, L.C.B.B. Coelho, M.G.R. Pitta, M.J.B.M. Rego, R.C.B.Q. Figueiredo, P.M.G. Paiva, T.H. Napoleão, CasuL: a new lectin isolated from Calliandra surinamensis leaf pinnulae with cytotoxicity to cancer cells, antimicrobial activity and antibiofilm effect, *Int. J. Biol. Macromol.* 98 (2017) 419–429.
- [6] O.A. Olajide, C.A. Echianu, A.D. Adedapo, J. M. Makinde. Anti-inflammatory studies on Adenantha pavonina seed extract. *Inflammopharmacology* 12.2 (2004): 196-201.
- [7] I.S. Afolabi, I.C. Nwachukwu, C.S. Ezeoke, R.C. Woke, O.A. Adegbite, T.D. Olawole, O.C. Martins. Production of a new Plant-Based Milk from Adenantha pavonina seed and evaluation of its nutritional and health Benefits. *Frontiers in nutrition* 5 (2018): 9.

- [8] T.F. Owoeye, O.O. Ajani, D.K. Akinlabu, O.I. Ayanda. Proximate composition, structural characterization and phytochemical screening of the seed oil of *Adenanthera pavonina* Linn. *Rasayan Journal of Chemistry* 10.3 (2017): 807-814.
- [9] M.S. Rodrigues, C. F. D. Oliveira, L. H. Almeida, S.M. Neto., et al. Adevonin, a novel synthetic antimicrobial peptide designed from the *Adenanthera pavonina* trypsin inhibitor (ApTI) sequence. *Pathogens and global health* 112.8 (2018): 438-447.
- [10] R.C. Melo, M.S. Geronço, R.W.R. Souza, L.P.S. Ramos, F.P. Araújo., et al. Biopolymer from *Adenanthera pavonina* L. seeds: characterization, photostability, antioxidant activity, and biotoxicity evaluation." *International Journal of Polymer Science* 2018 (2018).
- [11] N.M.P. Araujo, G.A. Pereira, H. S. Arruda, L.G. Prado, A.L.T.G. Ruiz, et al. Enzymatic treatment improves the antioxidant and antiproliferative activities of *Adenanthera pavonina* L. seeds." *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 18 (2019): 101002.
- [12] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275.
- [13] P.M.G. Paiva, L.C.B.B. Coelho, Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (camaratu bean), *Appl. Biochem. Biotechnol.* 36 (1992) 113–118.
- [14] R.A. Reisfeld, U.J. Lewis, D.E. Williams, Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels, *Nature* 195 (1962) 281–283. doi:10.1038/195281a0.
- [15] Kubicz, A., E. Wieczorek, and B. Morawiecka. "Acrylamide gel electrophoresis of proteins, acid phosphatases and RN-ases from three potato varieties." *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 41.1 (1972): 107-112.

- [16] U. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [17] A. Azeez, A. P. Sane, D. Bhatnagar, P. Nath. Enhanced expression of serine proteases during floral senescence in *Gladiolus*. *Phytochemistry* 68.10 (2007): 1352-1357.
- [18] F. L, Garcia-Carreno, L. E, Dimes, & N. F, Haard. Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. *Analytical biochemistry*, 214(1) (1993). 65-69
- [19] R.C.F. Cheung, H.H. Leung, W.L. Pan, T.B. Ng. A calcium ion-dependent dimeric bean lectin with antiproliferative activity toward human breast cancer MCF-7 cells. *The Protein Journal* 32.3 (2013): 208-215.
- [20] BM Ly, VT Hao, DT Trung, VTD Trang, PTH Trinh, NTD Ngoc, & M Quang,. Purification, characterization and biological effect of lectin from the marine sponge *Stylissa flexibilis* (Lévi, 1961)." *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 216 (2018): 32-38.
- [21] L.D. Hung, B.M. Ly, V.T. Hao, D.T. Trung, V.T.D. Trang, P.T.H. Trinh, N.T.D. Ngoc, T.M. Quang. Purification, characterization and biological effect of lectin from the marine sponge *Stylissa flexibilis* (Lévi, 1961). *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 216 (2018), pp. 32-38
- [22] V.R. Pinto-Junior, J.L.A. Correia, R.I. Pereira, F.N. Pereira-Junior, M.Q. Santiago, V.J.S. Osterne, et al. Purification and molecular characterization of a novel mannose-specific lectin from *Dioclea reflexa* hook seeds with inflammatory activity. *J. Mol. Recognit.*, 29 (2016), pp. 134-141

- [23] R Loris, I Van Walle, H De Greve, S Beeckmans, F Deboeck, L Wyns, J Bouckaert. Structural basis of oligomannose recognition by the *Pterocarpus angolensis* seed lectin. *J. Mol. Biol.* 335 (2004): 1227–1240.
- [24] L.C.B.B. Coelho, P.M.S. Silva, V.L.M. Lima, E.V. Pontual, P.M.G. Paiva, T.H. Napoleão, M.T.S. Correia, Lectins, interconnecting proteins with biotechnological/pharmacological and therapeutic applications, *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2017 (2017) 1594074.
- [25] TB Cahú, SD Santos, A Mendes, CR Córdula, SF Chavante, LB Carvalho Jr, et al. Recovery of protein, chitin, carotenoids and glycosaminoglycans from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) processing waste. *Process Biochemistry*, 47(4) (2012). 570-577.
- [26] G.A.N. Li-Ping, L. Ren-Hua, L. Yan-Jien. Serine proteinase (SP) and serine protease inhibitor (serpin) gene expression after hormone treatment in the silkworm *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). *J. Asia-Pac. Entomol.* 19.4 (2016), 1203–1210.
- [27] L.L.S. Patriota, T.F. Procópio, J.S. Brito, V. Sebag, A.P.S. Oliveira, A.K.A. Soares, L.R. Moreira, T.A. Lima, T. Soares, T.D. Silva, P.M.G. Paiva, V.M.B. Lorena, C.M.L. Melo, L.P. Albuquerque, T.H. Napoleão. *Microgramma vacciniifolia* (Polypodiaceae) fronds contain a multifunctional lectin with immunomodulatory properties on human cells. *Int. J. Biol. Macromol.*, 103 (2017), pp. 36-46
- [28] K.S. Nascimento, F.L.F. Nascimento, M.T.L. Silva, C.B. Nobre, C.G. Moreira, L.A.C. Brizeno, et al. Purification of a thermostable antinociceptive lectin isolated from *Andira anthelmia* *J. Mol. Recognit.*, 29 (2016), pp. 248-252

- [29] K. Kirschner, H. Bisswanger. Multifunctional proteins. *Ann. Rev. Biochem.*, 45 (1976), pp. 143-166
- [30] W.J. Peumans, J.M. Van Damme, A. Barre, P. Rougé. Classification of plant lectins in families of structurally and evolutionary related proteins. *The Molecular Immunology of Complex Carbohydrates—2*. Springer, Boston, MA, (2001). 27-54.
- [31] G. Cordara, H.C. Winter, I.J. Goldstein, U. Krenzel, K. Sandvig. The fungal chimerolectin MOA inhibits protein and DNA synthesis in NIH/3T3 cells and may induce BAX-mediated apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.*, 447 (2014), pp. 586-589,
- [32] G. Cordara, D. Manna, U. Krenzel. Family of papain-like fungal chimerolectins with distinct Ca²⁺-dependent activation mechanism. *Biochemistry* 56.35 (2017): 4689-4700.
- [33] T. Tatsuta, M. Hosono, S. Sugawara, Y. Kariya, Y. Ogawa, S. Hakomori, K. Nitta, Sialic acid-binding lectin (lecyzime) induces caspase-dependent apoptosis-mediated mitochondrial perturbation in Jurkat cells, *Int. J. Oncol.* 43 (2013) 1402–1412. doi:10.3892/ijo.2013.2092.
- [34] A.G. Almonte, J.D. Sweatt. Serine proteases, serine protease inhibitors, and protease-activated receptors: roles in synaptic function and behavior." *Brain research* 1407 (2011): 107-122.
- [35] P.G. Pappas. M. Lionakis, M. Arendrup, L. Ostrosky-Zeichner, B. Kullberg, Invasive candidiasis. *Nat. Rev. Dis. Primers* 4, (2018) 18026.
- [36] J.X.S. Neto, M.L. Pereira, J.T.A. Oliveira, L.C.B. Rocha-Bezerra, T.D.P. Lopes, H.P.S. Costa, D.O.B. Sousa, B.A.M. Rocha, T.B. Grangeiro, J.E.C. Freire, A.C.O. Monteiro-Moreira, M.D.P. Lobo, R.S.N. Brilhante, I.M. Vasconcelos, A chitin-binding protein purified from *Moringa oleifera* seeds presents anticandidal activity by increasing cell

membrane permeability and reactive oxygen species production, *Front. Microbiol.* 8 (2017) 980

- [37] M.A. Pfaller, G.J. Moet, S.A. Messer, R.N. Jones, M. Castanheira. *Candida* blood stream infections: comparison of species distributions and antifungal resistance patterns in community-onset and nosocomial isolates in the SENTRY antimicrobial surveillance program, 2008–2009. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 55 (2011), pp. 561-566
- [38] R. Edgar, N. Friedman, S. Molshanski-Mor, U. Qimron. Reversing bacterial resistance to antibiotics by phage-mediated delivery of dominant sensitive gene. *Appl. Environ. Microbiol.*, 78 (2012), pp. 744-751.
- [39] J.D.F. Silva, S.P. Silva, P.M. Silva, A.M. Vieira, L.C.C. Araújo, T.A. Lima, A.P.S. Oliveira, L.V.N. Carvalho, M.G.R. Pitt, M.J.B.R. Melo, I.O. Pinheiro, R.B. Zingali, M.S.M. Cavalcanti, T.H. Napoleão, P.M.G. Paiva. *Portulaca elatior* root contains a trehalose-binding lectin with antibacterial and antifungal activities. *Inter. J. Biol. Macromol.*, 126 (2019), pp. 291-297
- [40] G.R.S. Ferreira, J.S. Brito, T.F. Procópio, N.D.L. Santos, B.J.R.C. Lima, L.C.B.B. Coelho, D.M.D.A.F. Navarro, P.M.G. Paiva, T. Soares, M.C. Moura, T.H. Napoleão. Antimicrobial potential of *Alpinia purpurata* lectin (ApuL): Growth inhibitory action, synergistic effects in combination with antibiotics, and antibiofilm activity. *Microb. Pathog.*, 124 (2018), pp. 152-162
- [41] L.P. Dias, A.L. Araújo, N.M. Silva, R.R. Santos, M.H. Roma et al. *Machaerium acutifolium* lectin alters membrane structure and induces ROS production in *Candida parapsilosis*. *Int. J. Biol. Macromol.* 163 (2020): 19-25.
- [42] M.A. Ansari, Z. Fatima, S. Hammed. Anticandidal effect and mechanisms of monoterpenoid, perillyl alcohol against *Candida albicans*. *PloS one* 11.9 (2016): e0162465.

Legendas das figuras

Figura 1. Purificação da lectina de sementes de *A. pavonina* (ApSeL) por cromatografia do extrato utilizando matriz de quitina de camarão. A etapa de lavagem usou NaCl 0,15M, que apresentou o pico I sem hemaglutinação. O segundo pico foi eluído com ácido acético 1M, apresentou hemaglutinação e foi considerado a lectina ApSeL. As inserções mostram o perfil de ApSeL na focaização isoeletrica (1), SDS-PAGE em condições desnaturantes (12%, p/v) (2) e nativa básica (3).

Figura 2. Caracterização da atividade hemaglutinante de ApSeL em incubação com diferentes temperaturas (A) e pH (B).

Figura 3. Zimografia da ApSeL pavonina utilizando caseína como substrato. Uma banda clara contra o fundo escuro indica a atividade de protease, correspondendo a um polipeptídeo de massa molecular de cerca de 28 kDa

1 **Tabela 1.** Purificação da lectina das sementes de *Adenanthera pavonina* (ApSeL) com base em suas atividades hemaglutinante, proteolítica e
 2 tripsina-like.

3

Amostra	Atividade Hemaglutinante (AH)				Atividade Proteolítica (AP)				Atividade Tripsina-like (AT)			
	Proteína (mg/mL)	Unidades (U)	AH específica (U/mg)	Fator de purificação (x)	Proteína (mg)	Unidades (U)	AP específica (U/mg)	Fator de purificação (x)	Proteína (mg)	Miliunidades (mU)	AT específica (mU/mg)	Fator de purificação (x)
<i>Extrato Bruto</i>	11,75	256	21,78	1	0,283	32,6	115,2	1	0,283	0,755	2,670	1
<i>ApSeL</i>	0,683	128	187,41	8,60	0,05	23,8	477	4,14	0,05	0,987	19,747	7,39

4 AH específica corresponde à razão entre o número de unidades e a concentração de proteína (mg/mL). As AP e AT específicas correspondem à
 5 razão entre o número de unidades e a quantidade de proteína (mg) no ensaio. O fator de purificação foi calculado pela razão entre a atividade
 6 específica da lectina e a atividade específica do extrato

7
8

Tabela 2. Atividade hemaglutinante de ApSeL, na presença de carboidratos e glicoproteínas, e redução da atividade enzimática frente a inibidores de proteases.

Carboidratos / Glicoproteína	AH específica de ApSeL
<i>Monosacacrídeos (0.25 to 200 mM)</i>	
Galactose	46,852
Glicose	93,701
Manose	46,852
<i>N</i> -acetil-glicosamina	2,928
Ribose	46,852
Arabinose	93,701
Frutose	46,852
Maltose	93,701
Glicopirranose	93,701
Lactose	93,701
<i>Glicoproteína (0.25 to 1.0 mg/mL)</i>	
Ovalbumina	11,713
Inibidores de proteases	% de inibição
Pestatina A	12,79
EDTA	40,42
E-64	22,23
PMSF	49,95
AH específica de ApSeL: 187,41	

Tabela 3. Atividade antimicrobiana de ApSeL.

<i>Microrganismos</i>	<i>CMI</i>	<i>CBM/CFM</i>
Bactérias		
<i>S. aureus</i>	ND	ND
<i>E. faecalis</i>	ND	ND
<i>M. luteus</i>	ND	ND
<i>E. coli</i>	ND	ND
<i>P. aeruginosa</i>	ND	ND
<i>B. megaterium</i>	ND	ND
Fungos		
<i>C. albicans</i>	160	ND
<i>C. krusei</i>	320	ND
<i>C. glabrata</i>	ND	ND
<i>C. neoformans</i> B3501	ND	ND
<i>C. neoformans</i> H99	ND	ND
<i>C. gattii</i> R265	ND	ND

CMI expresso em $\mu\text{g/mL}$; ND: não detectado

Figura 1

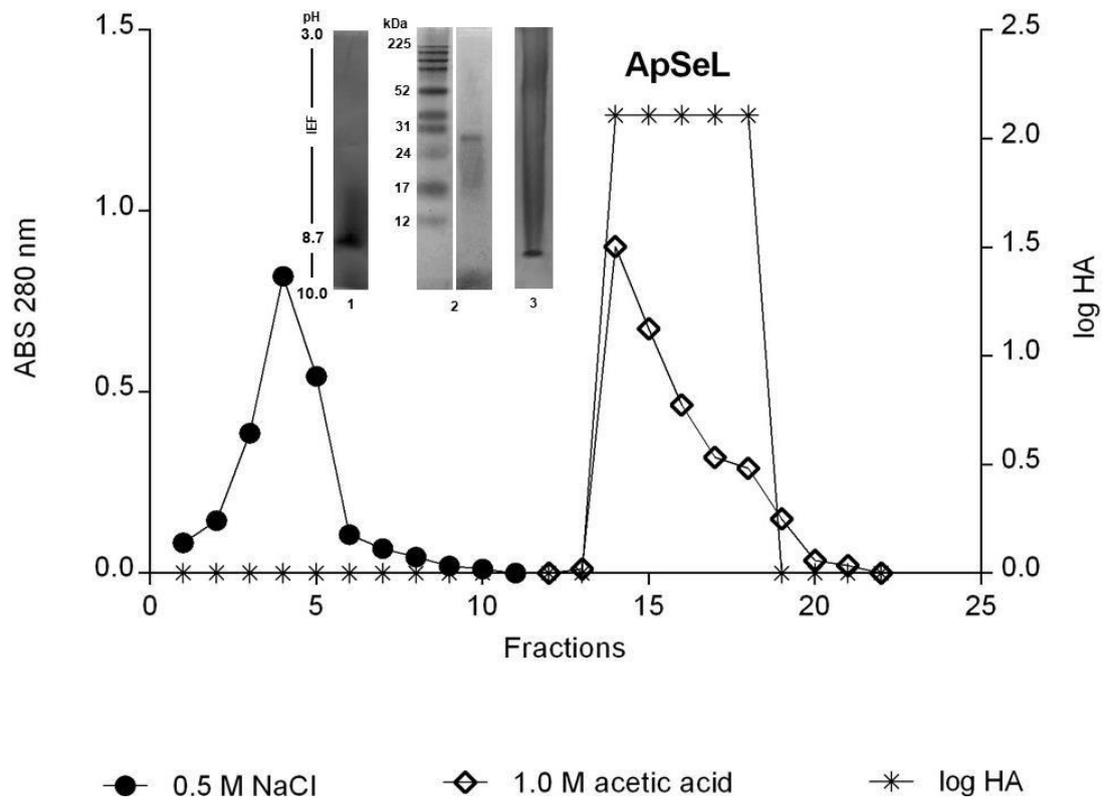


Figura 2

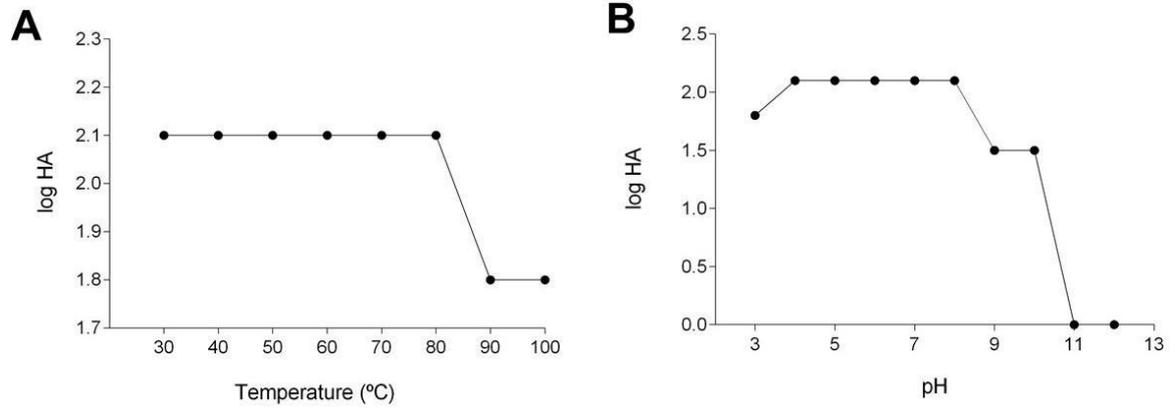
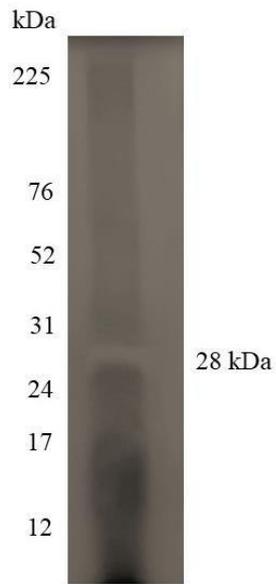


Figura 3.



5. CONCLUSÃO

O estudo mostrou que o extrato salino das sementes contém metabólitos secundários e proteínas, não é tóxico nas doses de 2000 e 5000 mg/kg e apresenta atividade anti-*Criptococcus*. Também, que a lectina ApSeL, isolada a partir do extrato salino, é uma quimerolectina ligadora de quitina com atividade de protease e fungistática contra *Candida*.

REFERÊNCIAS

- AFOLABI, I. S. et al. Production of a new Plant-Based Milk from *Adenanthera pavonina* seed and evaluation of its nutritional and health Benefits. **Frontiers in nutrition**, v.5, p. 9, 2018.
- ALMEIDA , Luís Henrique de Oliveira et al. Adepamycin: design, synthesis and biological properties of a new peptide with antimicrobial properties. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 691, p. 108487, 2020.
- ALVES, R. R. V. et al. Ovicidal lectins from *Moringa oleifera* and *Myracrodruon urundeuva* cause alterations in chorionic surface and penetrate the embryos of *Aedes aegypti* eggs. **Pest Management Science**, 2019.
- ANSARI, Moiz A.; FATIMA, Zeeshan; HAMEED, Saif. Anticandidal effect and mechanisms of monoterpenoid, perillyl alcohol against *Candida albicans*. **PloS one**, v. 11, n. 9, p. e0162465, 2016.
- ARANA, David M. et al. The role of the cell wall in fungal pathogenesis. **Microbial biotechnology**, v. 2, n. 3, p. 308-320, 2009.
- ARAUJO, N. M. P. et al. Enzymatic treatment improves the antioxidant and antiproliferative activities of *Adenanthera pavonina* L. seeds. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, v. 18, p. 101002, 2019.
- BHADRAN, S. ; GEORGE, S. A. ; SUDHAKAR M. H. Screening of bioprotective properties of various plant extracts and gas chromatography-mass spectrometry profiling of *adenanthera pavonina* stem extract. **SCREENING**, v. 10, n. 7, 2017.
- BRACKMAN, G.; COENYE, T.. Quorum sensing inhibitors as anti-biofilm agents. **Current pharmaceutical design**, v. 21, n. 1, p. 5-11, 2015.
- BRITO, J.S. et al. Lectin from inflorescences of ornamental crop *Alpinia purpurata* acts on immune cells to promote Th1 and Th17 responses, nitric oxide release, and lymphocyte activation. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 94, p. 865-872, 2017
- CAMPOY, Sonia; ADRIO, José L. Antifungals. **Biochemical pharmacology**, v. 133, p. 86-96, 2017.
- CARNEIRO, R. F. et al. Isolation, biochemical characterization and antibiofilm effect of a lectin from the marine sponge *Aplysina lactuca*. **International journal of biological macromolecules**, v. 99, p. 213-222, 2017.
- CARVALHO, AdS et al. Purification, characterization and antibacterial potential of a lectin isolated from *Apuleia leiocarpa* seeds. **International journal of biological macromolecules**, v. 75, p. 402-408, 2015.

- CAVADA, B. S. et al. Canavalia bonariensis lectin: Molecular bases of glycoconjugates interaction and antiglioma potential. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 106, p. 369–378, 2018.
- CAVADA, Benildo Sousa et al. Reviewing Mimosoideae lectins: A group of under explored legume lectins. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020.
- CHARUNGCHITRAK, S. et al. Antifungal and antibacterial activities of lectin from the seeds of Archidendron jiringa Nielsen. *Food Chemistry*, v. 126, n. 3, p. 1025-1032, 2011.
- CHEUNG, R. C.F. et al. A calcium ion-dependent dimeric bean lectin with antiproliferative activity toward human breast cancer MCF-7 cells. *The protein journal*, v. 32, n. 3, p. 208-215, 2013.
- CHI, X. et al. Threatened medicinal plants in China: Distributions and conservation priorities. *Biological Conservation*, v. 210, p. 89-95, 2017.
- COELHO, L.C.B.B. et al. Protein purification by affinity chromatography. In: AHMAD, R. (Org.). *Protein Purification*. InTech, Rijeka, pp. 53-72, 2012.
- 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, Luana Cassandra Breitenbach Barroso et al. Lectins, interconnecting proteins with biotechnological/pharmacological and therapeutic applications. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2017, 2017.
- DANG, Liuyi; VAN DAMME, Els JM. Toxic proteins in plants. *Phytochemistry*, v. 117, p. 51-64, 2015.
- DEL RIO, Marianela et al. Effects of the binding of a Helianthus annuus lectin to Candida albicans cell wall on biofilm development and adhesion to host cells. *Phytomedicine*, v. 58, p. 152875, 2019.
- DIAS, Lucas P. et al. Machaerium acutifolium lectin alters membrane structure and induces ROS production in Candida parapsilosis. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 163, p. 19-25, 2020.
- FERREIRA, Gustavo Ramos Salles et al. Antimicrobial potential of Alpinia purpurata lectin (ApuL): Growth inhibitory action, synergistic effects in combination with antibiotics, and antibiofilm activity. *Microbial pathogenesis*, v. 124, p. 152-162, 2018.
- FOUNOU, L. L.; FOUNOU, R. C. I; ESSACK, S. Y.. Antibiotic resistance in the food chain: a developing country-perspective. *Frontiers in microbiology*, v. 7, p. 1881, 2016.

GAIDAMASHVILI, M.; VAN STADEN, J. Interaction of lectin-like proteins of South African medicinal plants with *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 80, n. 2-3, p. 131-135, 2002.

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

GHANI, A. Medicinal Plant of Bangladesh with Chemical Constituents and Uses, **Asiatic Society of Bangladesh**, Dhaka, Bangladesh, 2ed, 2003.

GODOI, A. et al. Characterization and antiherpetic activity of native and chemically sulfated polysaccharide from *Adenanthera pavonina*. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 16, n. 11, p. 1024-1031, 2015.

GODOI, A. M. de et al. Antiviral activity of sulfated polysaccharide of *Adenanthera pavonina* against poliovirus in HEp-2 cells. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, 2014.

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

GONG, T. et al. Plant Lectins Activate the NLRP3 Inflammasome to Promote Inflammatory Disorders. **The Journal of immunology**, p.11, 2018.

HUML, Lukas et al. Analysis of nutrients and compounds potentially reducing risks of overweightness and obesity-related diseases in raw and roasted *Adenanthera pavonina* seeds from Samoa. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, p. 100-108, 2020.

JIANG, L. et al. Expression, purification and characterization of a group of a lectin-like peptides from the spider *Ornithoctonus huwena*. *Peptides*, v. 30, p. 669-674, 2009.

JIN, X.; LEE, Y. J.; HONG, S. H. *Canavalia ensiformis*-derived lectin inhibits biofilm formation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*. **Journal of applied microbiology**, v. 126, n. 1, p. 300-310, 2019.

JOHN, B. et al. Role of IL-12-independent and IL-12-dependent pathways in regulating generation of the IFN- γ component of T cell responses to *Salmonella typhimurium*. *The Journal of Immunology*, v. 169, n. 5, p. 2545-2552, 2002.

JUAN, Laura Lavín et al. Pharmaceutical applications of lectins. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, v. 42, p. 126-133, 2017.

KABIR, S. R.; HASAN, I.; ZUBAIR, A. Lectins from Medicinal Plants: Characterizations and Biological Properties. **Nutraceuticals and Functional Foods**, v. 42, p. 339-356, 2014.

KAJIWARA, Shota et al. N-linked glycosylation of thermostable lipase from *Bacillus thermocatenulatus* to improve organic solvent stability. **Enzyme and microbial technology**, v. 132, p. 109416, 2020.

- KOODALINGAM, Arunagirinathan et al. Cytoprotective and anti-inflammatory effects of kernel extract from *Adenanthera pavonina* on lipopolysaccharide-stimulated rat peritoneal macrophages. **Asian Pacific journal of tropical medicine**, v. 112, p. 119, 2015.
- LEE, Ji Yeon et al. In vitro immunoregulatory effects of Korean mistletoe lectin on functional activation of monocytic and macrophage-like cells. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 11, p. 2043-2051, 2007.
- LI, Dekuan et al. Over-expression of ArathEULS3 confers ABA sensitivity and drought tolerance in *Arabidopsis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 117, n. 3, p. 431-442, 2014.
- LIMA, Soraia L.; COLOMBO, Arnaldo L.; DE ALMEIDA JUNIOR, João N. Fungal cell wall: emerging antifungals and drug resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2019.
- MANIKANDAN, B. et al. Purification and characterisation of a pronase-inducible lectin isolated from human serum. **International journal of biological macromolecules**, v. 99, p. 443-453, 2017.
- MARQUES, Márcia Maria Mendes et al. Antiviral and antioxidant activities of sulfated galactomannans from plants of Caatinga Biome. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, 2015.
- MELO, Roberta Cardoso et al. Biopolymer from *Adenanthera pavonina* L. Seeds: Characterization, Photostability, Antioxidant Activity, and Biototoxicity Evaluation. **International Journal of Polymer Science**, v. 2018, 2018.
- MIRKOV, T. E.; J. M. WAHLSTROM; K. HAGIWARA; F. FINARDI-FILHO; S. KJEMTRUP ; M. J. CHRISPEELS. Evolutionary relationships among proteins in the phytohemagglutinin-arcelin-alpha-amylase inhibitor family of the common bean and its relatives. **Plant Mol Biol**, v.26, n.4, Nov, p.1103-13. 1994.
- MONIRUZZAMAN, Md; KHATUN, Ambia; IMAM, Mohammad Zafar. Evaluation of antinociceptive activity of ethanol extract of leaves of *Adenanthera pavonina*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, 2015.
- MOURA, M. C. et al. Water-soluble *Moringa oleifera* lectin interferes with growth, survival and cell permeability of corrosive and pathogenic bacteria. *Journal of applied microbiology*, v. 119, n. 3, p. 666-676, 2015.
- MUKHERJEE, Sohini et al. Antibacterial membrane attack by a pore-forming intestinal C-type lectin. *Nature*, v. 505, n. 7481, p. 103, 2014.
- NAPOLEÃO, T. H. et al. "Affinity Matrices of *Cratylia mollis* Seed Lectins for Isolation of Glycoproteins from Complex Protein Mixtures." *Applied biochemistry and biotechnology*. 171.3, 744-755, 2013.

NASI, A., PICARIELLO, G., FERRANTI, P. Proteomic approaches to study structure, functions and toxicity of legumes seeds lectins. Perspectives for the assessment of food quality and safety. **Journal of Proteomic**, v. 72, p. 527-538, 2009.

NG, Wai-Leung; BASSLER, Bonnie L. Bacterial quorum-sensing network architectures. **Annual review of genetics**, v. 43, p. 197-222, 2009.

OLAJIDE, O. A. et al. Anti-inflammatory studies on *Adenanthera pavonina* seed extract. **Inflammopharmacology**, v. 12, n. 2, p. 196-201, 2004.

OLIVEIRA, A.P.S. et al. Biotechnological value of *Moringa oleifera* seed cake as source of insecticidal lectin against *Aedes aegypti*. *Process Biochemistry*, v. 51, p. 1683-1690, 2016.

OLIVEIRA, Caio Fernando Ramalho et al. Dual insecticidal effects of *Adenanthera pavonina* kunitz-type inhibitor on *Plodia interpunctella* is mediated by digestive enzymes inhibition and chitin-binding properties. **Molecules**, v. 24, n. 23, p. 4344, 2019.

OWOEYE TF, AJANI OO, AKINLABU DK, AYANDA OI. Proximate composition, structural characterization and phytochemical screening of the seed oil of *Adenanthera pavonina* Linn. **Rasayan J Chem**, v. 10, n.3, p. 807-814, 2017.

PAIVA, P.M.G. et al. Protease inhibitors from plants: Biotechnological insights with emphasis on their effects on microbial pathogens. In: MÉNDEZ-VILLAS, A. **Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education**. Badajoz: Formatex Research Center, 2013.

PANDHARE, Ramdas B. et al. Anti-hyperglycaemic and lipid lowering potential of *Adenanthera pavonina* Linn. in streptozotocin induced diabetic rats. **Oriental pharmacy and experimental medicine**, v. 12, n. 3, p. 197-203, 2012.

PEUMANS, Willy J. et al. Classification of plant lectins in families of structurally and evolutionary related proteins. In: **The Molecular Immunology of Complex Carbohydrates—2**. Springer, Boston, MA, 2001. p. 27-54.

POLACHINI, C. R. N. et al. Alterations in the cholinesterase and adenosine deaminase activities and inflammation biomarker levels in patients with multiple sclerosis. **Neuroscience**, v. 266, p. 266-274, 2014.

POUR, Mahdi Alikhani et al. Cheminformatics-Based Anticoagulant Study of Traditionally Used Medicinal Plants. **Iranian biomedical journal**, v. 21, n. 6, p. 400, 2017.

PRACIAK, A. **CABI Encyclopedia of Forest Trees**, Wallingford Ltd., UK, p. 41, 2013.

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

PROCÓPIO, Thamara F. et al. Antibacterial lectins: action mechanisms, defensive roles and biotechnological potential. **Antibacterials: synthesis, properties and biological activities**. New York: Nova Sci Pub, p. 69-90, 2017.

RECHENCHOSKI, Daniele Zendrini et al. Antiherpetic Effect of Topical Formulations Containing Sulfated Polysaccharide from *Adenanthera pavonina*. **Indian journal of microbiology**, v. 59, n. 4, p. 417-421, 2019.

RODRIGUES, M. S. et al. Adevonin, a novel synthetic antimicrobial peptide designed from the *Adenanthera pavonina* trypsin inhibitor (ApTI) sequence. **Pathogens and global health**, v. 112, n. 8, p. 438-447, 2018.

RUTENBER, E.; B. J. KATZIN; S. ERNST; E. J. COLLINS; D. MLSNA; M. P. READY ; J. D. ROBERTUS. Crystallographic refinement of ricin to 2.5 Å. **Proteins**, v.10, n.3, p.240-50. 1991.

SAHID, Salman et al. Rice lectin protein Osr40c1 imparts drought tolerance by modulating OsSAM2, OsSAP8 and chromatin-associated proteins. **bioRxiv**, 2020.

SANTOS et al. Lectins: Function, structure, biological properties and potential applications. **Current Topics in Peptide & Protein Research**, v. 15, p. 41-62, 2014.

SANTOS, A.F.S. et al. Strategies to obtain lectins from distinct sources. In: BERHARDT, L.V. (Org.). *Advances in Medicine and Biology*, vol. 63, Nova Science Publishers, New York, pp. 33-60, 2013.

SASAKI, D. Y. et al. Effects of proteinase inhibitor from *Adenanthera pavonina* seeds on short-and long term larval development of *Aedes aegypti*. **Biochimie**, v. 112, p. 172-186, 2015.

SELL, A. M. Atividades biológicas das lectinas PHA, WGA, jacalina e artocarpina. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v.22, p.297-303. 2008.

SENGA KITUMBE, P. et al. Chemical composition and nutritive value study of the seed oil of** *Adenanthera pavonina*** L.(Fabaceae) growing in Democratic Republic of Congo. **International journal of pharmtech research**, v. 5, n. 1, p. 205-216, 2013.

SILVA NETO, João XS et al. A chitin-binding protein purified from *Moringa oleifera* seeds presents anticandidal activity by increasing cell membrane permeability and reactive oxygen species production. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 980, 2017.

SILVA, Ayrles FB et al. Comparison of immunomodulatory properties of mannose-binding lectins from *Canavalia brasiliensis* and *Cratylia argentea* in a mice model of *Salmonella* infection. **International immunopharmacology**, v. 31, p. 233-238, 2016.

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

SILVA, Pollyanna Michelle et al. PgTeL, the lectin found in Punica granatum juice, is an antifungal agent against *Candida albicans* and *Candida krusei*. **International journal of biological macromolecules**, v. 108, p. 391-400, 2018.

SILVA, Pollyanna Michelle et al. Punica granatum sarcotesta lectin (PgTeL) impairs growth, structure, viability, aggregation, and biofilm formation ability of *Staphylococcus aureus* clinical isolates. **International journal of biological macromolecules**, v. 123, p. 600-608, 2019.

SINGH, R. S.; WALIA, A. K.; KENNEDY, J. F. Purification and characterization of a mitogenic lectin from *Penicillium duclauxii*. **macromolecules**, v. 116, p. 426-433, 2018.

SITOHY, Mahmoud; DOHEIM, Mahmoud; BADR, Haitham. Isolation and characterization of a lectin with antifungal activity from Egyptian *Pisum sativum* seeds. **Food chemistry**, v. 104, n. 3, p. 971-979, 2007.

SOOMRO, R.K., SHERAZI, S.T.H. Spectroscopic and chromatographic evaluation of the wax ester fraction of *Adenanthera pavonina* oil. **Industrial Crops and Products**. vol.36, no. 1, pp. 294–298, 2012.

SOUZA, J.D. et al. A new *Bauhinia monandra* galactose-specific lectin purified in milligram quantities from secondary roots with antifungal and termiticidal activities. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 65, p. 696-702, 2011.

SPAMPINATO, Claudia; LEONARDI, Darío. *Candida* infections, causes, targets, and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents. **BioMed research international**, v. 2013, 2013.

SULTANA, T. GULZAR. Proximate analysis of *Adenanthera pavonina* L. seed oil, a source of lignoceric acid grown in Pakistan. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, vol.89, no. 9, pp. 1611–1618, 2012.

TRIGUEIROS, V.; et al. Xerocomus chryseteron lectin: identification of a new pesticidal protein. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1621, p.292-298, 2003.

TRINDADE, Melissa B. et al. Structural characterization of novel chitin-binding lectins from the genus *Artocarpus* and their antifungal activity. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1764, n. 1, p. 146-152, 2006.

VAISHNAVA, Shipra et al. The antibacterial lectin RegIII γ promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine. **Science**, v. 334, n. 6053, p. 255-258, 2011.

VAN DAMME, E. J. M.; W. J. PEUMANS; A. BARRE ; P. ROUGÉ. Plant Lectins: A Composite of Several Distinct Families of Structurally and Evolutionary Related Proteins with Diverse Biological Roles. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.17, n.6, 1998/11/01, p.575-692. 1998.

VARGAS, Luciano Kayser et al. Potential of rhizobia as plant growth-promoting rhizobacteria. In: **Microbes for legume improvement**. Springer, Cham, p. 153-174. 2017.

VASAVI, Halkare Suryanarayana; ARUN, Ananthapadmanabha Bhagwath; REKHA, Punchappady-Devasya. Anti-quorum sensing potential of *Adenantha pavonina*. **Pharmacognosy research**, v. 7, n. 1, p. 105, 2015.

WANG, X.W, et al. A novel C-type lectin (FcLec4) facilitates the clearance of *Vibrio anguillarum* in vivo in Chinese white shrimp. **Developmental & Comparative Immunology**. V. 33, p.1039-1047, 2009.

WICKRAMARATNE, M. Nirmali; PUNCHIHEWA, J. C.; WICKRAMARATNE, D. B. M. In-vitro alpha amylase inhibitory activity of the leaf extracts of *Adenantha pavonina*. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 16, n. 1, p. 466, 2016.

WITHANAGE, G. S. K. et al. Cytokine and chemokine responses associated with clearance of a primary *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in the chicken and in protective immunity to rechallenge. *Infection and immunity*, v. 73, n. 8, p. 5173-5182, 2005.

WU, Jinhong et al. Lunatin, a novel lectin with antifungal and antiproliferative bioactivities from *Phaseolus lunatus* billb. **International journal of biological macromolecules**, v. 89, p. 717-724, 2016.

YAN, Qiaojuan et al. A novel homodimeric lectin from *Astragalus mongholicus* with antifungal activity. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 442, n. 1, p. 72-81, 2005.