



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

Michelly Élen Leal Menezes Torres

PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS
DE LECTINA OBTIDA DE *Dypsis decaryi*

RECIFE, 2019



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

Michelly Élen Leal Menezes Torres

PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS
DE LECTINA OBTIDA DE *Dypsis decaryi*

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Biociência Animal da UFRPE, como requisito para obtenção do título de Doutor.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador (a): Prof^a Dr^a Ana Lúcia de Figueiredo Porto

Co-orientador (a): Prof^a Dr^a Cynthia de Oliveira Nascimento

Co-orientador (a): Prof^o Dr^o Romero Marcos Brandão Pedrosa Costa

RECIFE, 2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Centra, Recife-PE, Brasil

T693p Torres, Michelly Élen Leal Menezes
Purificação, caracterização e atividades biológicas de lectina
obtida de *Dypsis decaryi* / Michelly Élen Leal Menezes Torres. – 2019.
81 f. : il.

Orientadora: Ana Lúcia Figueiredo Porto.
Coorientadores: Romero Marcos Brandão Pedrosa Costa e
Cynthia de Oliveira Nascimento.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de
Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal,
Recife, BR-PE, 2019.

Inclui referências.

1. Sementes 2. Lectinaa 3. Química vegetal 4. Palmeira I. Porto,
Ana Lúcia Figueiredo, orient. II. Costa, Romero Marcos Brandão
Pedrosa, coorient. III. Nascimento, Cynthia de Oliveira, coorient.
IV. Título

CDD 636.089

MICHELLY ÉLEN LEAL MENEZES TORRES

**PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS
DE LECTINA OBTIDA DE *Dypsis decaryi***

Tese apresentada ao programa de
pós-graduação em Biociência
Animal da UFRPE, como requisito
para obtenção do título de Doutor.

Aprovada em: __/__/__.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ana Lúcia Figueido Porto (Orientadora)
Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)

Prof. Dr. Rafael Antonio do Nascimento Ramos (Examinador)
Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)

Prof. Dr. Emmanuel Viana Pontual (Examinador)
Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)

Prof. Dr. Vagne Melo Oliveira (Examinador)
Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)

Profa. Dra. Daniela de Araújo Viana Marques (Examinadora)
Universidade de Pernambuco (UPE)

*Dedico este trabalho ao meu Senhor, meu Deus.
Aos meus pais, Moaci e Maria Margarida, meu esposo
Kaio e filha Bianka. Minha irmã Mirtes e sobrinhos
Washington e Gustavo. Meus sogros, Diana e Edson.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, quero agradecer ao meu Senhor Jesus, pela minha vida, por tudo que possuo e por hoje ser quem sou. Obrigada meu pai, por ter me sustentado nos momentos de angústias, por ter me confortado quando mais precisei. De uma coisa tenho certeza: sua presença é real!! E sem o Senhor nada disso teria acontecido.

Agradeço a minha orientadora Prof^a Dr^a Ana Lúcia de Figueiredo Porto, por tantos ensinamentos, pela oportunidade de subir mais um degrau na minha vida profissional, pelos exemplos de determinação e competência. Peço a Deus que abençoe a sua vida e seus projetos. Muito obrigada!!

A minha co-orientadora Prof^a Dr^a Cynthia de Oliveira Nascimento, pelo apoio e incentivo a continuar, a senhora é essencial na minha vida acadêmica, pois acreditou em mim e me ajudou em todos os momentos que precisei. Deus lhe abençoe grandemente!! Grata por tudo!!

Ao meu co-orientador Prof^o Romero Marcos Brandão Pedrosa Costa, por toda a colaboração, pois sua participação foi sensacional. Pessoa única que abraça uma causa e não mede esforços em ajudar. Obrigada por tudo professor!! Eternamente grata!! Deus lhe abençoe!!

À coordenação do programa de Pós-graduação em Biociência Animal e deixo meus parabéns aos nossos coordenadores pelo trabalho realizado junto ao programa.

Aos professores do programa Pós-graduação em Biociência Animal, pelos ensinamentos transmitidos, assim como aos amigos de turma, foi um prazer conviver com vocês.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente colaboraram para que este trabalho fosse possível.

A todos que fazem parte do LABTECBIO, a nossa casa, obrigada meus queridos amigos, pelos momentos vividos, experiências compartilhadas e socorro nos momentos de dúvidas. Este grupo é SENSACIONAL!!

Aos amigos queridos que fiz durante esta jornada. Amigos que guardarei para sempre em meu coração. Não citarei nomes porque não posso esquecer ninguém e estes nomes não caberiam neste papel.

A meus pais, Moaci e Maria Margarida, que sempre investiram e acreditaram em mim. Obrigada paiinho e mãeinha!!! Sem vocês eu não estaria aqui...meus amores!! A minha irmã Mirtes que sempre me incentivou, obrigada!!

Aos meus sogros, Edson e Diana, grata por toda ajuda e colaboração, principalmente no cuidado com minha filha. Eternamente grata!!

Ao meu marido Kaio, que muitas vezes foi compreensivo e participativo, obrigada meu amor. A vitória é nossa!!TE AMO!!!

A minha filha Biana, sempre doce e amável, hoje mesmo ela me disse: mamãe você consegue!!ahhh minha filha seu abraço e carinho faz tudo fazer sentido. É POR VOCÊ QUE SIGO!! Te amo linda de mãeinha!!

A CAPES pela bolsa concedida que viabilizou o desenvolvimento deste trabalho.

ETERNAMENTE GRATA!!

*“Respondeu João: O homem não
pode receber coisa alguma, se não for lhe
dada do céu.”*
João 3:27

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi extrair, purificar, caracterizar e avaliar as atividades biológicas da lectina obtida de sementes de *D. decaryi*, além de analisar os compostos fitoquímicos presentes no extrato do tegumento das sementes, como também a atividade carrapaticida deste extrato. As sementes foram lavadas em água destilada e secas durante 5 dias. Foram preparados extratos a 10% com NaCl 0,15 M da casca, tegumento e endosperma da semente. Foram determinadas a atividade hemaglutinante (AH), dosagem proteica e atividade hemaglutinante específica (AHE) de todos os extratos. O extrato do tegumento apresentou maior AHE (196,03), sendo utilizado para precipitação com acetona 70% e purificação em Superdex G-75 em sistema AKTA, apresentando único pico no cromatograma, com massa molecular em condições nativas estimada em 34,8kDa. A lectina purificada de *D. decaryi* foi denominada DdeL. A lectina não foi específica para os tipos sanguíneos avaliados (A, B, AB, O e de coelho), porém maior AH foi observada quando na presença de sangue humano do tipo O e sangue de coelho. Esta lectina foi inibida apenas por glicoproteínas (albumina, azoalbumina e azocaseína), sua atividade foi estável na faixa de pH 5-10, no entanto, apresentou AH maior em pH ácido (pH 5-6), foi termoresistente, pois permaneceu ativa após 3h em temperatura a 100 °C. A atividade antibacteriana de DdeL (2,9 - 1500 µg/mL) foi realizada utilizando o método de microdiluição em caldo. Este ensaio demonstrou que DdeL exibiu atividade bacteriostática frente às bactérias patogênicas testadas, embora a concentração inibitória mínima (CIM) tenha sido elevada. As cepas mais sensíveis foram o isolado clínico *Providencia stuartii* e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, as quais apresentaram CIM de 750 µg/mL. A atividade bactericida não foi detectada para os isolados testados. A atividade antifúngica do extrato e DdeL foi realizada pelo teste de microdiluição em placas de 96 poços. Na atividade antifúngica foram avaliadas dez concentrações (2,6 – 1325 µg/mL) do extrato do tegumento das sementes de *D. decaryi*, como também, dez concentrações (0,03 – 16,5 µg/mL) de DdeL. O extrato do tegumento apresentou CMI₅₀ de 5,18 µg/mL para os fungos da espécie *Sporotrichum schenckii*, e CMI₁₀₀ ficou entre 10,35 - 82,81 µg/ml para estes fungos. Para os fungos da espécie *Candida albicans*, o extrato apresentou CMI₅₀ entre 2,59 - 20,7 µg/mL, onde o mais resistente foi o *C. albicans* URM 6401 com CMI₅₀ de 20,7 µg/mL. A CMI₁₀₀ do extrato do tegumento para *C. albicans* foi de 662,5 - 1325 µg/mL. Em relação a DdeL, o *S. schenckii* URM 7971 foi o mais sensível na CMI₅₀ de 0,26 µg/mL e os demais na CMI₅₀ de 0,52 µg/mL. DdeL não apresentou CMI₁₀₀ para as espécies de *S. schenckii*. Para *C. albicans*, DdeL apresentou CIM₅₀ de 2,06 µg/mL e não foi capaz de inibir em 100% o crescimento destes fungos. A citotoxicidade para macrófagos (J774.A1) e células embrionárias renais (HEK-293) mostraram que a lectina não apresentou efeito citotóxico, além de ter estimulado a proliferação destas células. O extrato do tegumento de *D. decaryi* indicou a presença de diferentes grupos de metabólitos secundários e alguns constituintes, sugerindo biodisponibilidade de saponinas, taninos e flavonoides. Este extrato, avaliado em diferentes concentrações, apresentou capacidade do consumo de DPPH. O comportamento cinético da reação do DPPH com as diferentes concentrações do extrato, mostrou que as três concentrações maiores (1,73 mg/mL; 0,87

mg/mL; 0,35 mg/mL) atingiram o consumo máximo com dois minutos da reação, e o decaimento do DPPH foi estabilizando-se rapidamente. A maior concentração do extrato (1,73 mg/mL) sequestrou em torno de 100% do radical com dois minutos da reação. Na menor concentração, praticamente não houve sequestro de DPPH. No bioensaio carrapaticida frente a *Dermacentor nitens*, o controle positivo Cipermetrina 15%, foi ineficiente, pois, os carrapatos apresentaram resistência de 98,81% a este carrapaticida. O extrato bruto na concentração de 17,3 mg/mL também não foi eficiente e os carrapatos apresentaram 100% de resistência às concentrações mais elevadas do extrato. A concentração do extrato a 1,73 mg/mL apresentou 19,23% de eficiência, superior ao cipermetrina que apresentou 1,19% de eficiência. O precipitado proteico na concentração de 1,25 mg/mL obteve maior eficiência com 71,65%. O sobrenadante cetônico foi avaliado e apresentou 38,62% de eficiência. Os resultados mostraram a purificação e caracterização de uma nova lectina, termoresistente, com atividade bacteriostática a bactérias patogênicas, antifúngica a patógenos de humanos e que não apresentou efeitos citotóxicos, sendo uma proteína com potencial para aplicações biotecnológicas. Além disso, apresenta a composição fitoquímica do extrato do tegumento, a atividade sequestradora do radical DPPH e a atividade carrapaticida deste extrato, precipitado proteico e sobrenadante cetônico. Demonstrando o potencial biotecnológico do uso dessa espécie, ainda pouco estudada na comunidade científica, na medicina humana e animal.

PALAVRAS-CHAVES: *Dypsis*, sementes, fitoquímico, lectina, atividades biológicas.

ABSTRACT

The objective of this study was to extract, purify, characterize and evaluate the biological activities of lectin obtained from *D. decaryi* seed, and analyzing the phytochemical compounds in the extract of the tegument as well as the acaricide activity of this extract. The seeds were washed in distilled water and dried for 5 days. Were prepared extracts 10% with 0.15 M NaCl of the bark, tegument and endosperm of the seed. The hemagglutinating activity (HA), protein dosage and specific hemagglutinating activity (AHE) of all extracts were determined. The extract of the tegument presented higher AHE (196,03), being used for precipitation with 70% acetone and purification in Superdex G-75 in AKTA system, presenting single peak in the chromatogram, with molecular mass in native conditions estimated at 34.8kDa. The purified lectin of *D. decaryi* was named DdeL. The lectin was not specific for the blood types evaluated (A, B, AB, O and rabbit), but higher AH was observed when in the presence of human type O blood and rabbit blood. This lectin was inhibited only by glycoproteins (albumin, azoalbumin and azocasein), its activity was stable in the range of pH 5-10, however, it presented higher AH in acid pH (pH 5-6), it was thermo-resistant, since it remained active after 3h at 100 ° C. The antibacterial activity of DdeL (2.9 - 1500 µg/mL) was performed using the broth microdilution method. This assay demonstrated that DdeL exhibited bacteriostatic activity against the pathogenic bacteria tested, although the minimal inhibitory concentration (MIC) was elevated. The most sensitive strains were the clinical isolate *Providencia stuartii* and *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, which presented MICs of 750 µg/mL. The bactericidal activity was not detected for the tested isolates. The antifungal activity of the extract and DdeL was performed by the microdilution test in 96-well plates. In the antifungal activity, ten concentrations (2.6 -1325 µg/mL) of the extract of the tegument of the seed of *D. decaryi*, as well as 10 concentrations (0.03 - 16.5 µg/mL) of DdeL were evaluated. The extract of the tegument had a MIC₅₀ of 5.18 µg/mL for the fungi of the *Sporotrichum schenckii* species, and MIC₁₀₀ was between 10.35 - 82.81 µg/mL for these fungi. For the fungi of *Candida albicans*, the extract presented MIC₅₀ between 2.59 - 20.7 µg/mL, where the most resistant was *C. albicans* URM 6401 with MIC₅₀ of 20.7 µg/mL. The MIC₁₀₀ of the extract of the tegument for *C. albicans* was 662.5 - 1325 µg/mL. In relation to DdeL, *S. schenckii* URM 7971 was the most sensitive in MIC₅₀ of 0.26 µg/mL and the others in MIC₅₀ of 0.52 µg/mL. DdeL did not present MIC₁₀₀ for *S. schenckii* species. For *C. albicans*, DdeL presented a MIC₅₀ of 2.06 µg/mL and was not able to inhibit the growth of these fungi in 100%. Cytotoxicity to macrophages (J774.A1) and renal embryonic cells (HEK-293) showed that the lectin did not present a cytotoxic effect and stimulated the proliferation of these cells. The extract of the tegument of the seeds of *D. decaryi* indicated the presence of different groups of secondary metabolites and some constituents, suggesting bioavailability of saponins, tannins and flavonoids. This extract, evaluated at different concentrations, showed DPPH consumption capacity. The kinetic behavior of DPPH reaction with different concentrations of the extract showed that the three highest concentrations (1.73 mg/mL, 0.87 mg/mL, 0.35 mg/mL) achieved the maximum consumption in two minutes from reaction, and DPPH decay rapidly stabilized. The highest concentration of the extract (1.73 mg / mL) sequestered around 100% of the radical with two minutes of the reaction. At the

lowest concentration, there was practically no sequestration of DPPH. In the bioassay against ticks *Dermacentor nitens*, the positive control Cypermethrin 15%, was inefficient because the ticks were resistant to 98.81% this acaricide. The crude extract at the concentration of 17.3 mg/mL was also not efficient and the ticks showed 100% resistance at the highest concentrations of the extract. The extract concentration at 1.73 mg/mL presented 19.23% efficiency, higher than cypermethrin, which presented 1.19% efficiency. The protein precipitate at the concentration of 1.25 mg / mL obtained higher efficiency with 71.65%. The ketone supernatant was evaluated and presented 38.62% efficiency. The results showed the purification and characterization of a new lectin, thermoresistant, with bacteriostatic activity to pathogenic bacteria, antifungal to human pathogens and that did not present cytotoxic effects, being a protein with potential for biotechnological applications. In addition, it presents the phytochemical composition of the extract of the tegument of the seeds of *D. decaryi*, the sequestering activity of the DPPH radical and the acaricide activity of this extract, protein precipitate and ketone supernatant. Demonstrating the biotechnological potential of the use of this species, still little studied in the scientific community, in human and animal medicine.

KEYWORDS: *Dypsis*, seeds, phytochemical, lectin, biological activities.

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	9
LISTA DE FIGURAS.....	13
LISTA DE TABELAS.....	14
1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1 LECTINAS.....	17
2.1.1 Fontes de lectinas.....	18
2.1.1.1 Lectinas de plantas.....	19
2.2 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE LECTINAS.....	20
2.3 CARACTERIZAÇÃO DE LECTINAS.....	22
2.4 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE LECTINAS.....	23
2.4.1 Atividade antioxidante	24
2.4.2 Atividade antibacteriana.....	25
2.4.3 Atividade antifúngica.....	26
2.4.4 Atividade carrapaticida ou biocarrapaticidograma.....	27
2.5 <i>Dermacentor nitens</i> (carrapato-da-orelha-do-cavalo).....	28
2.6 <i>Dypsis decaryi</i>	31
3. OBJETIVOS.....	33
3.1 OBJETIVO GERAL.....	33
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34
CAPÍTULO I.....	44
ABSTRACT.....	45
INTRODUCTION.....	46
MATERIAL E METHODS.....	47
RESULTS E DISCUSSION.....	51
CONCLUSION.....	55
ACKNOWLEDGEMENTS.....	55
REFERENCES.....	55
CAPÍTULO II.....	66
RESUMO.....	67
INTRODUÇÃO.....	68
MATERIAL E MÉTODOS.....	69

RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	72
CONCLUSÃO.....	78
AGRADECIMENTOS.....	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78
CONCLUSÃO GERAL.....	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ensaio de Hemaglutinação de Lectinas utilizando eritrócitos glutarizados de coelho.....21

Figura 2. Estágios do ciclo de vida de *D. nitens* em laboratório. (A) Fêmeas ingurgitadas; (B) Início da oviposição; (C) Término da oviposição; (D) Ovos; (E) Larvas recém eclodidas; (F) Larvas visualizadas em microscópio óptico (4x). Fonte: arquivo pessoal.....29

Capítulo I

Fig. 1. DdeL chromatographic profile on Superdex G-75 molecular exclusion chromatography. AHE: 1312.82.....53

Fig. 2. (A) Effect of pH on the hemagglutinating activity (HA) of DdeL (AH). (B) Effect of temperature on the HA of DdeL.....56

Fig. 3. Cell viability of DdeL in HEK-293 and J774.A1. Statistical differences with control were determined by ANOVA followed by Bonferroni, * $P < 0.05$. Each value determines the mean $\pm$ SD of three independent experiments. Each experiment in quadruplicate.....61

Capítulo II

Figura 1. Efeito de diferentes concentrações do extrato aquoso na %DPPH remanescente em função do tempo.....77

Figura 2. Eclodibilidade de larvas de *D. nitens*. (A) Controle negativo (91,18% de eclosão); (B) Cipermetrina 15% (88,00% de eclosão); (C) Precipitado proteico 1,25 mg/ml (26,47% de eclosão).....79

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Table 1. Extracts from the seeds of *D. decaryi*, their protein dosages and hemagglutinating activity total and specific.....63

Table 2. Summary of purification of the lectin from the tegument of seed *D. decaryi* (DdeL).....63

Table 3. Hemagglutinating activity of DdeL according to blood type.....64

Table 4. Inhibition of DdeL by different carbohydrates and glycoproteins..... 64

Table 5. Antibacterial activity of DdeL.....65

Table 6. Antifungal activity of DdeL and extract of the tegument of seeds of *D. decaryi*.....65

Capítulo II

Tabela 1. Conteúdo de fenólicos, flavonóides, taninos e saponinas em extrato aquoso de *Dypsis decaryi*.....

Tabela 2. Atividade carrapaticida do extrato aquoso do tegumento das sementes de *D. decaryi*, precipitado protéico e sobrenadante cetônico frente ao carrapato *D. nitens*.....

1. INTRODUÇÃO

As lectinas são proteínas ou glicoproteínas que possuem como característica principal a capacidade de se ligarem de forma específica a mono, oligo ou polissacarídeos. Estas proteínas podem ser solúveis ou de membrana, sendo encontradas dentro e fora das células (BELLANDE et al., 2018; SANTOS et al. 2013). Estão presentes em todas as formas de vida, onde diversas lectinas foram purificadas a partir de uma ampla variedade de organismos como plantas (BARI et al., 2013; NASCIMENTO et al., 2013; SILVA et al., 2012), algas (LIMA et al., 2005), fungos (SINGH; KAUR; SINGH, 2014) e animais (ASHRAF et al., 2011; SIVAKAMAVALLI; VASEEHARAN, 2014).

Os carboidratos, os ligantes potenciais das lectinas, estão presentes na superfície ou dentro das células e pertencem a um grande grupo de moléculas com enorme diversidade e complexidade estruturais (BELLANDE et al., 2018). Devido à capacidade das lectinas de se ligarem a carboidratos, diversas atividades biológicas foram atribuídas a estas proteínas, incluindo inseticida (RAHIMI et al., 2018; NAPOLEÃO et al., 2013), antifúngica (CHARUNGCHITRAK et al., 2011), antiviral (SHARMA et al., 2009), antibacteriana (CASTANHEIRA et al., 2013), antiproliferativa (LIN; NG, 2008), anti-inflamatória, analgésica (CHAVES et al., 2018; NUNES et al., 2009), anticoagulante (LUZ et al., 2013), antitumoral, antioxidante e gastroprotetiva (LACERDA et al., 2017).

Lectinas vegetais já foram obtidas de várias famílias de plantas, como: Rubiaceae (COSTA et al., 2018), Fabaceae (leguminosas) (CARVALHO et al., 2015), Lamiaceae (WILCHES-TORRES et al., 2017), Dioscoreaceae (SHARMA et al., 2017), Cucurbitaceae (BOBBILI et al. 2018), Araceae (THAKUR et al., 2017), não há relatos de lectina obtida da família Arecaceae. Esta família possui 183 gêneros e mais de 2500 espécies que estão divididas em subfamílias como Calamoideae, Nypoideae, Coryphoideae, Ceroxyloideae e Arecoideae (DRANSFIELD et al., 2005; HORN et al., 2009).

Na sub-família Arecoideae estão inseridas as palmeiras ornamentais, que apresentam versatilidade de se adaptar e sobreviver em diversas condições edafoclimáticas (RAMOS et al., 2013). *Dypsis decaryi* é uma palmeira ornamental nativa de Madagascar, utilizada em parques e jardins, encontrando-

se em expansão por todo o Brasil e apresenta como principais atributos ornamentais a distribuição das folhas e cor acinzentada (BAO et al., 2010; LORENZI et al, 2004).

A presente tese representa o primeiro relato de estudos bioquímicos realizados com a semente da palmeira ornamental *D. decaryi*. O primeiro capítulo refere-se ao artigo intitulado “DdeL, uma nova lectina termoestável obtida de sementes de *Dypsis decaryi*: purificação, caracterização e atividade biológica”, no qual está descrito o processo de purificação e caracterização de uma lectina obtida do tegumento das sementes, além de relatar as atividades antibacteriana, antifúngica e citotoxicidade da lectina obtida. No segundo capítulo está inserido o artigo “Análise fitoquímica do extrato do tegumento de sementes de *Dypsis decaryi*, atividade sequestradora de radical DPPH e carrapaticida frente a *Dermacentor nitens*”, o qual relata os metabólitos secundários presente no extrato aquoso do tegumento das sementes e sua atividade sequestradora do radical DPPH, além disso, a atividade carrapaticida deste extrato e do precipitado proteico frente ao carrapato-da-orelha-do-cavalo *Dermacentor nitens*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Lectinas

A primeira descrição de uma lectina foi em 1888, quando Peter Hermann Stillmark isolou a ricina a partir das sementes de mamona (*Ricinus communis*), após avaliar a reatividade dos extratos proteicos com glóbulos vermelhos e observar aglomeração das células. Em 1898, foi introduzido o termo "hemaglutinina" quando Elfstrand descreveu a habilidade de proteínas de plantas em aglutinar células do sangue (ELFSTRAND, 1898; STILLMARK, 1888; VAN DAMME, 2014). No entanto, somente em 1952 ficou provado que as lectinas possuem atividade ligadora de carboidratos, quando Watkins e Morgan demonstraram a relação entre a atividade de aglutinação das lectinas e a sua capacidade para reconhecer os carboidratos presentes na superfície dos eritrócitos (VAN DAMME, 2014; WATKINS; MORGAN, 1952).

O termo "lectina" (derivada do Latim *Legere*, que significa selecionar, escolher) foi introduzido por Boyd e Shapleigh em 1954, referindo-se a esta característica (BOYD; SHAPLEIGH, 1954; VAN DAMME, 2014). Por conseguinte, as lectinas representam uma superfamília de proteínas que possuem como característica comum o fato de reconhecerem e se ligarem a carboidratos de forma específica e reversível (MANNING et al., 2016).

Esta ligação seletiva é realizada através de pontes de hidrogênio, Van der Waals e interações hidrofóbicas entre o carboidrato e o domínio de reconhecimento de carboidrato (DRC) da lectina (PAIVA et al., 2010). De acordo com a especificidade aos carboidratos, as lectinas podem ser classificadas em grupos de reconhecimento de fucose, manose, ácido siálico, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina e complexo glicano (PEUMANS; VAN DAMME, 1998).

Para uma proteína ser classificada como lectina tem que cumprir três requisitos: possuir um DRC; não ser uma imunoglobulina e não modificar a estrutura dos carboidratos aos quais se ligam (GABIUS, 1997; NASCIMENTO et al., 2012; RÜDIGER; GABIUS, 2001; SINGH et al., 2000). Devido a estas características, as lectinas estão envolvidas em muitos processos essenciais de

reconhecimentos celulares e moleculares (BARI et al., 2013; VARROT et al., 2013).

As lectinas medeiam eventos de reconhecimento em muitos processos biológicos como: sinalização e diferenciação celular, interação patógeno-hospedeiro e metástase dos tecidos. Ao longo das últimas décadas, as lectinas foram investigadas quanto as suas propriedades biológicas, incluindo atividades antibacteriana, antifúngica, inseticida e antiviral (SINGH; KAUR; SINGH, 2014). Inexoravelmente, pesquisas com lectinas são incentivadas, sobretudo por apresentar potencialidade terapêutica e biotecnológica (HASSAN et al., 2015; VARROT et al., 2013).

2.1.1 Fontes de lectina

As lectinas estão presentes de forma úbiqua na natureza (SHARON, 2008). Um grande número de lectinas foi purificado a partir de diversos organismos, como plantas (BARI et al., 2013; NASCIMENTO et al., 2013; SILVA et al., 2012), algas (LIMA et al., 2005), fungos (SINGH; KAUR; SINGH, 2014) e animais (ASHRAF et al., 2011; SIVAKAMAVALLI; VASEEHARAN, 2014).

Em animais, as lectinas estão presentes em diferentes tecidos de insetos, peixes e mamíferos, entre outros, desempenhando funções na regulação do sistema imunológico, atuando como imunomoduladores (COELHO et al., 2017). Lectinas vegetais também são obtidas de vários tecidos e desempenham um papel vital na resistência de plantas contra doenças e pragas, podendo apresentar efeitos deletérios para vírus, bactérias, fungos e insetos (INGALE; HIVRALE, 2013).

Até o presente momento, lectinas mais investigadas foram isoladas a partir de plantas, particularmente de membros da família Leguminosae (TEIXEIRA et al., 2012). O fato de as plantas serem a principal fonte de lectinas é devido à facilidade de extração e aos altos rendimentos obtidos destas proteínas. Além disso, diversas famílias de plantas, como também diferentes tecidos da mesma planta podem conter lectinas distintas, com diferentes especificidades de ligação a carboidratos e diversas atividades biológicas (PROCÓPIO et al., 2017).

2.1.1.2 Lectinas de plantas

As plantas constituem uma fonte rica de lectinas, as quais estão presentes em vários tecidos vegetais (SANTOS et al., 2014) como cascas (COSTA et al., 2018), cerne (NAPOLEÃO et al., 2011), folhas (PROCÓPIO et al., 2017), frutos (SILVA et al., 2018) e exsudato do floema (NAREDDY et al., 2017). Em sua maioria, as lectinas de plantas são obtidas de sementes (AGRA-NETO et al., 2014; CAVADA et al., 2018; LACERDA et al., 2017; LOSSIO et al., 2017; OSTERNE et al., 2017).

Além do envolvimento em mecanismos de defesa, outras funções são relacionadas a lectinas, como fenômenos de regulação e sinalização celular (JIANG et al., 2006), embriomorfogênese, fagocitose, proteção celular, mecanismos de crescimento da parede celular, mitose induzida, transporte de carboidratos e seu estabelecimento em tecidos vegetais (SANTOS et al., 2014).

As lectinas de plantas formam um grupo complexo e heterogêneo de moléculas que apresentam diversas propriedades bioquímicas e diferentes especificidades a carboidratos (LOSSIO et al., 2017). Com base no número e nas características de seus domínios de reconhecimento de carboidratos, as lectinas de plantas podem ser divididas em quatro classes distintas (MACEDO et al. 2015; VAN DAMME et al., 1998):

- a) Merolectinas - são lectinas que possuem um único domínio de ligação a carboidratos e, conseqüentemente, não apresentam atividade aglutinante.
- b) Hololectinas - possuem dois ou mais domínios de ligação de carboidratos multivalentes, podem aglutinar células e consistem na maioria das lectinas de plantas.
- c) Quimerolectinas – além do domínio de ligação a carboidratos, possuem um domínio adicional que confere outras atividades biológicas.
- d) Superlectinas - são lectinas que possuem dois ou múltiplos domínios de carboidratos que são capazes de reconhecer açúcares estruturalmente não relacionados.

A princípio, as lectinas de plantas foram classificadas em sete famílias que estão relacionadas estrutural e evolutivamente, as quais são: as

amarantinas, lectinas de floema de cucurbitáceas, lectinas com domínio heveína, lectinas relacionadas à jacalina, lectinas de monocotiledôneas que se ligam a manose, lectinas de leguminosas e proteínas inativadoras de ribossomos tipo 2 (VAN DAMME et al., 1998). No entanto, Van Damme et al. (2007) identificaram uma lectina de *Robinia pseudoacacia* denominada aglutinina relacionada com quitinase *R. pseudoacacia* ou RobpsCRA que compartilha aproximadamente 50% de identidade de sequência com quitinases de classe V de plantas, no entanto é essencialmente desprovida de atividade de quitinase. Essa descoberta deu origem à família de homólogos de quitinase de classe V com atividade de lectina. A avaliação da especificidade indicou que a aglutinina relacionada com a quitinase se liga preferencialmente a N-glicanos.

2.2 Extração e Purificação de lectinas de plantas

As lectinas podem ser obtidas a partir de várias partes das plantas, sendo o método de extração de acordo com o material escolhido. No entanto, de modo geral, o preparo inicial do material consiste em lavagens com água destilada, para remoção de sujeiras e contaminantes, seguido de secagem à temperatura ambiente ou baixa temperatura para não desnaturar as proteínas presentes no material. Após a secagem, é feita a trituração do material para obtenção de um pó que será utilizado na extração das lectinas (PEREIRA et al., 2014).

O preparo dos extratos, geralmente, é realizado por agitação magnética utilizando diversas soluções para extração, como solução salina 0,15M ou solução tampão em diversos valores de pH. Por exemplo, os extratos a 10% (p/v) a partir de sementes de visgueiro, pau-d'óleo e pau-ferro foram obtidos com NaCl a 0,15M, sob agitação constante (PEREIRA et al., 2014). Para a obtenção do extrato das sementes de *Apuleia leiocarpa*, as sementes foram secas a 45°C e processadas por moagem. A farinha de sementes foi homogeneizada durante 4 horas a 28°C com NaCl 0,15 M (CARVALHO et al., 2015). O passo seguinte à extração, é a filtração ou centrifugação das soluções obtidas, para remoção de partículas maiores do material vegetal.

Uma vez preparado o extrato, é necessário detectar a presença de lectinas na amostra, através do ensaio de atividade hemaglutinante e confirmada pelo ensaio de inibição desta atividade utilizando solução contendo carboidratos ou

glicoproteínas (Figura 1). A atividade hemaglutinante é caracterizada pela ligação entre os sítios de ligação da lectina e os carboidratos presentes na superfície dos eritrócitos, formando uma rede de hemaglutinação. Com o intuito de aumentar a sensibilidade do ensaio, frequentemente, os eritrócitos são tratados quimicamente, por exemplo, com glutaraldeído, para maior exposição dos carboidratos em suas superfícies. Na inibição da atividade, os sítios de ligação da lectina são ocupados por carboidratos livres na solução, impedindo assim a formação da rede de hemaglutinação (SANO; OGAWA, 2014; SANTOS et al., 2013).

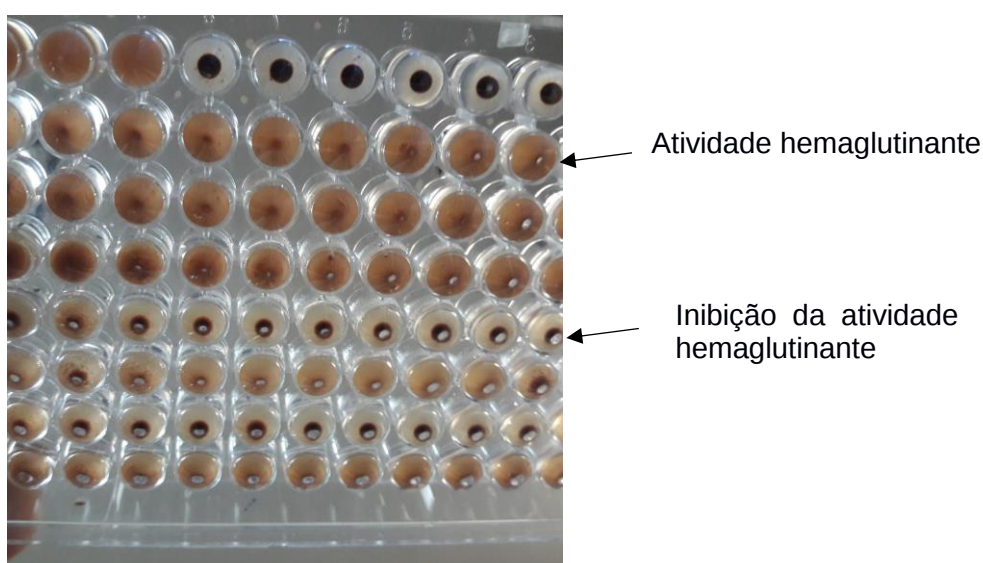


Figura 1. Ensaio de hemaglutinação e inibição de lectinas utilizando eritrócitos glutarizados de coelho. Fonte: arquivo pessoal

Após a confirmação da presença de lectinas, o passo seguinte para purificação de lectinas é, frequentemente, a precipitação de proteínas com sulfato de amônio ou solventes orgânicos. Em seguida, o precipitado proteico pode passar por diálise, para retirada de sais e realização das cromatografias, que podem ser de uma a três ou mais. Por isso, a purificação de lectinas pode incluir de dois a quatro passos ou até mais, excluindo a etapa de preparação do extrato bruto (NASCIMENTO et al., 2012; SANTOS et al., 2013). No entanto, o aumento no número de etapas de purificação pode resultar em baixa recuperação da proteína (LAM; NG, 2011).

Os métodos usualmente aplicados para purificação de lectinas incluem saturação com sulfato de amônio (PEREIRA et al., 2008), cromatografia de

afinidade (NAREDDY et al., 2017), cromatografia de troca iônica (GAUTAM et al., 2018), cromatografia de exclusão molecular (PIRES et al., 2019), extração líquido-líquido utilizando micelas invertidas (NASCIMENTO et al., 2008) e sistemas de duas fases aquosas (NASCIMENTO et al., 2013).

Resinas de afinidade foram criadas e utilizadas de acordo com a especificidade da lectina como fetuína-Sepharose (BHOWAL et al., 2005), BSM-Toyopearl (KAWAGISHI et al., 1997), PSM-Sepharose (CHUMKHUNTHOD et al., 2006), lactosil-Sepharose (POHLEVEN et al., 2009) e gal-Sepharose (CANDY et al., 2003). Este tipo de cromatografia pode ser utilizado como o primeiro passo no processo de purificação de lectinas (NASCIMENTO et al., 2012).

As lectinas também são purificadas por cromatografia de troca iônica, na qual as moléculas são adsorvidas à matriz que possui carga contrária à carga líquida da proteína, ou seja: lectinas de cargas positivas se ligam a grupos negativos imobilizados na coluna e as de cargas negativas adsorvem a colunas carregadas positivamente. As lectinas adsorvidas geralmente são eluídas pelo deslocamento com outros íons de maior força de interação com a matriz ou modificando-se o pH ou força iônica, utilizando, por exemplo um gradiente linear de concentração de íons (SANTOS et al., 2013). A lectina de *Cicer arietinum* L. (CAL), após precipitação com sulfato de amônio, foi purificada utilizando duas cromatografias de trocas iônicas, a DEAE-Celulose, na qual a lectina foi obtida na fração não adsorvida, posteriormente aplicada em SP-Sephadex, sendo então eluída com gradiente de concentração de NaCl (GAUTAM et al., 2018).

A cromatografia de exclusão molecular ou filtração em gel permite a separação de proteínas por eluição diferencial de acordo com o tamanho, através de poros de matrizes inertes (KENNEDY et al., 1995; SANTOS et al., 2013). Colunas cromatográficas de exclusão molecular como Sephadex-G75, Sephacryl S-100 e Superdex 75 têm sido utilizadas na purificação de lectinas (COSTA et al., 2018; PROCÓPIO et al., 2017; SILVA et al., 2012).

2.3 Caracterização de lectinas

Os estudos realizados para purificação de lectinas geralmente estão atrelados à caracterização parcial/total dessas proteínas (ASHRAF et al., 2011;

BARI et al., 2013; SIVAKAMAVALLI; VASEEHARAN, 2014). A caracterização de lectinas envolve diversos métodos, como o ensaio de hemaglutinação utilizado para detecção e caracterização quanto à especificidade dentro do sistema ABO ou entre eritrócitos de animais, como também a diferentes carboidratos (SINGH; JAIN; KAUR, 2013). O conhecimento do carboidrato específico é importante para a determinação do suporte de afinidade ideal para a purificação da lectina (CORREIA; COELHO, 1995).

Outro método imprescindível para a caracterização de lectina é a determinação da sua estabilidade a diferentes condições de temperatura e pH. Por exemplo, a lectina do bulbo do jacinto (*Hyacinth*) mostrou estabilidade moderada à temperatura e ao pH, sendo estável até 60 °C, e foi estável na faixa de pH de 4 a 12, apresentando atividade de hemaglutinação máxima na faixa de pH 6-8 (NAIK et al., 2017). Estas informações são de extrema importância visto que as proteínas exercem a sua função em meios específicos e alterações nas condições ideais, como temperatura e pH, podem promover a desnaturação da biomolécula.

A técnica de separação por massa molecular define o perfil eletroforético da lectina, sendo possível a determinação de propriedades importantes, como o seu ponto isoelétrico, a massa molecular aproximada e o seu grau de pureza. Essa pureza é essencial para estabelecimento de suas propriedades moleculares, fisiológicas e possíveis aplicações (FILHO et al., 2013).

2.4 Atividades biológicas de lectinas

As lectinas constituem um grupo diversificado de proteínas e apresentam múltiplas aplicações, dentre elas: identificação da presença de carboidratos em biopolímeros ou glicoconjugados; cromatografia de afinidade para o isolamento de hormônios, neurotransmissores, imunoglobulinas e compostos relacionados; estudos relacionados à estrutura química de membranas biológicas; contribuição para o esclarecimento das alterações estruturais dos carboidratos de superfície celulares nas transformações malignas; identificação de células tumorais; contribuição na elucidação da estrutura química dos determinantes de grupos sanguíneos ABO; instrumento para o reconhecimento celular e diagnóstico (CHE et al., 2011; FILHO et al., 2013; WONG; CHAN, 2008).

Como ferramenta para biomedicina, as lectinas são utilizadas no diagnóstico do câncer, baseado na sua ação sobre as células cancerígenas, onde estas proteínas são capazes de reconhecer especificamente carboidratos na membrana, decodificar alterações em carboidratos que são exibidos por células cancerígenas diferenciando tumores benignos de malignos de acordo com o grau de glicosilação (RIBEIRO et al., 2018; MODY et al., 1995).

As lectinas obtidas de plantas são as que têm sido mais estudadas e aplicadas, sobressaindo-se as lectinas de leguminosas, amplamente estudadas e conhecidas por suas funções biológicas diversas. A Concanavalina A (ConA - aglutinina de *Canavalia ensiformes*) é a lectina de leguminosas mais representativa, apresentando muitas atividades biológicas relatadas, entre elas, a capacidade de inibir a aderência e a formação de biofilme de bactérias enterohemorrágicas *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes* (JIN et al., 2019).

As lectinas apresentam muitas atividades biológicas, incluindo inseticida (RAHIMI et al., 2018; NAPOLEÃO et al., 2013), antifúngica (CHARUNGCHITRAK et al., 2011), antiviral (SHARMA et al., 2009), antibacteriana (CASTANHEIRA et al., 2013), antiproliferativa (LIN; NG, 2008), anti-inflamatória e analgésica (CHAVES et al., 2018; NUNES et al., 2009), anticoagulante (LUZ et al., 2013), antitumoral, antioxidante e gastroprotetiva (LACERDA et al., 2017) entre outras.

Embora muitas lectinas de plantas tenham sido estudadas, a identificação e caracterização bioquímica de novas lectinas certamente auxiliará no desenvolvimento de novas ferramentas para o controle de pragas e doenças ou para a compreensão biológica de doenças (NAIK et al., 2017).

2.4.1 Atividade antioxidante

Pesquisas têm se voltado para o desenvolvimento de produtos naturais com atividade antioxidante (NASCIMENTO et al., 2011). Um antioxidante é qualquer substância capaz de retardar ou impedir danos devidos à oxidação estando presente em pequenas concentrações, quando em comparação com o agente oxidante (SILVA et al., 2010). O excesso desses radicais pode ser combatido por antioxidantes produzidos pelo corpo ou adquiridos de forma exógena (NASCIMENTO et al., 2011). Os radicais livres são formados em

consequência do processo de respiração e outras reações em um organismo. O excesso destes radicais leva ao estresse oxidativo causando danos teciduais e o surgimento de doenças como: doença cardiovascular, tumores malignos, inflamações, catarata, doença de Parkinson e de Alzheimer, como também aceleram o processo de envelhecimento (SIKORA et al., 2008). Lectinas vegetais foram analisadas quanto à sua atividade antioxidante, como a lectina PLUN de *Phaseolus lunatus* que possui ação antioxidante equivalente ao ácido ascórbico (LACERDA et al., 2017).

2.4.2 Atividade antibacteriana

As doenças infecciosas causadas pelos microrganismos são motivos de preocupação e cuidados globais com a saúde (AHMED et al., 2018). O desenvolvimento de antibióticos eficientes no combate às infecções bacterianas ocasionou a redução drástica da mortalidade causada por doenças microbianas, que antigamente tinham 100% de mortalidade. No entanto, o tratamento antibioticoterápico irracional levou as bactérias a desenvolverem defesas relativas aos agentes antibacterianos (ALMADA et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2014).

O desenvolvimento de novas drogas antibacterianas alternativas é importante para o combate de patógenos e doenças existentes. Os antibióticos de origem natural podem substituir os medicamentos atualmente utilizados com eficiência maior, menos efeitos colaterais ou baixo custo de produção (KARNCHANATAT, 2012).

Diversas lectinas de plantas foram avaliadas quanto as suas atividades antibacterianas (CARVALHO et al., 2015; FERREIRA et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2008; PROCÓPIO et al., 2017). A lectina *Apuleia leiocarpa* (ApulSL) demonstrou efeitos bacteriostáticos e bactericidas em espécies gram-positivas e gram-negativas, sendo mais efetiva contra três variedades de *Xanthomonas campestris* (CARVALHO et al., 2015). Brustein et al. (2012) observaram que a lectina de *Eugenia malaccensis* (EmaL) apresentou atividade antibacteriana potente com inibição do crescimento *in vitro* de algumas bactérias patogênicas e poderia ser usada no processo de cicatrização de feridas cutâneas em ratos. Algumas lectinas têm interferido na formação de biofilme, como a lectina de

Calliandra surinamensis (CasuL) que além do efeito bacteriostático, reduziu a formação de biofilme por *Staphylococcus saprophyticus* e *Staphylococcus aureus* (PROCÓPIO et al., 2017).

A atividade antimicrobiana das lectinas pode resultar da sua capacidade de interagir com os carboidratos na superfície celular dos micróbios (CARVALHO et al 2015). Portanto, a interação das lectinas com componentes da parede celular microbiana, por exemplo, ácidos teicóico e teicurônico, peptidoglicanos e lipopolissacarídeos presentes em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, pode estar relacionada aos efeitos antimicrobianos das lectinas, observados pela inibição do crescimento, dano à integridade celular, alteração da permeabilidade da membrana e absorção de nutrientes, indução de estresse oxidativo, e danos aos processos respiratórios (FERREIRA et al., 2018; PROCÓPIO et al., 2017; RATANAPO et al., 2001).

2.4.3 Atividade antifúngica

As lectinas também podem reconhecer e se ligar a componentes importantes da parede celular dos fungos, como: quitina, oligômeros de quitina, celulose, glucanas, mananas e outros sacarídeos. A lectina de *Setcreasea purpurea* (SPL) é uma lectina de ligação à quitina, com atividade antifúngica, cujo mecanismo de ação pode relacionar-se com sua propriedade de ligação a carboidratos (YAO et al., 2010). Um recente estudo mostrou que a lectina de *Alpinia purpurata* (ApuL) causou danos em células de *Candida albicans* e *C. parapsilosis*, as quais exibiram malformações com alongamentos e protuberâncias, com a presença de fragmentos celulares que, provavelmente, afetaram o crescimento celular. Além disso, a perda de integridade celular foi refletida na redução da viabilidade detectada por análise de citometria de fluxo (FERREIRA et al., 2018).

Del Rio et al. (2018) relataram que a lectina de *Helianthus annuus* (Helja) apresentou capacidade de reduzir o crescimento das hifas e viabilidade de *Sclerotinia sclerotiorum*, no entanto, esta lectina não mostrou qualquer efeito sobre *Fusarium solani* em doses equivalentes. Os autores destacaram que a atividade antifúngica diferencial de Helja pode ter sido determinada pela sua

capacidade de ligação específica a células fúngicas, sugerindo diferenças no ligante de reconhecimento entre *S. sclerotiorum* e *F. solani*.

2.4.4 Atividade carrapaticida ou biocarrapaticidograma

Os carrapaticidas são acaricidas utilizados no controle de carrapatos. Dentre os efeitos causados pelos carrapaticidas podem ser observados: interrupção do contato entre o ectoparasita e o hospedeiro, inibição da alimentação do ectoparasita no hospedeiro, interferência na fertilidade do ovo e desenvolvimento dos estágios do ciclo de vida fora do hospedeiro e morte do ectoparasita (ADENUBI et al., 2018).

Os objetivos dos bioensaios in vitro, ou biocarrapaticidograma, são prever a eficácia in vivo em estudos com animais. Assim, a atividade carrapaticida deve estar atrelada aos aspectos relacionados a biologia comportamental e a fisiologia dos carrapatos (ADENUBI et al., 2018). O método mais utilizado em laboratórios envolvidos no diagnóstico de resistência é o Teste de Imersão em Adultos (TIA) (FAO, 2004). O TIA é um bioensaio aplicado a teleóginas de carrapatos que foi descrito por Drummond et al. (1973), no qual observa-se a inibição de ovipostura e eclosão larval em comparação a um grupo controle. Este método tem sido utilizado para determinar a eficácia relativa de novos carrapaticidas contra espécies de carrapatos.

Até o presente momento, são escassos registros de atividade carrapaticida de lectina, tendo sido reportado apenas frações proteicas do extrato, picos cromatográficos e a lectina purificada das algas *Gracilaria cornea* (GCL) contra o carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. A lectina GCL na concentração de 0,1 mg mL⁻¹ causou uma redução de 20% no peso das fêmeas no período de oviposição, além de afetar (redução de 37,9%) a massa de ovos por fêmeas tratadas e ingurgitadas em relação ao valor observado em carrapatos de controle, reduzindo também o período de eclosão e tempo de sobrevivência média das larvas (57,3 e 31,3%, respectivamente) (LIMA et al., 2005).

Até aqui, a necessidade de novas pesquisas é real, espaço para que surjam novas lectinas no intuito de desenvolver e produzir novos carrapaticidas

de origem natural para o controle destes ectoparasitas economicamente importantes e gerar novos produtos para o segmento de saúde animal.

2.5 *Dermacentor nitens* (Carrapato-da-orelha-do-cavalo)

Carrapatos são artrópodes ectoparasitas, da classe Arachinida, de distribuição mundial, que parasitam vertebrados terrestres, anfíbios, répteis, aves e mamíferos (VIEIRA et al., 2004), distribuídos em três famílias, apresentando um número de espécies conhecidas atualmente de 939: Ixodidae (727 espécies), Argasidae (211 espécies) e Nuttalliellidae (1 espécie) (RIVERA-PÁEZ et al., 2018).

A fauna de carrapatos do Brasil é atualmente composta por 72 espécies, 47 da família Ixodidae, e 25 na família Argasidae (DALL'AGNOL et al., 2017; GIANIZELLA et al., 2018; LABRUNA et al., 2016; MUÑOZ-LEAL et al., 2017). Os ixodídeos constituem a família de carrapatos dominante, em relação ao número de espécies e sua importância médica e veterinária (TSATSARIS et al., 2016). Estes carrapatos têm importância sanitária e econômica, devido a sua ação hematófaga, transmissão de patógenos e inoculação de toxinas em seus hospedeiros (MONTAÑEZ et al., 2017).

Os ciclos de vida dos carrapatos da família Ixodidae passam por quatro estágios: ovo, larva, ninfa e adulto (FIGURA 2). Todos os estágios, exceto os ovos, precisam parasitar um hospedeiro. Após a eclosão, as larvas apresentam-se em tamanho reduzido, cerca de 0,5 mm. Ao parasitarem um hospedeiro, as larvas se ingurgitam de sangue e ficam com tamanho de 1 a 2 mm, em alguns dias, realizam a ecdise para o estágio de ninfas. No hospedeiro, as ninfas se ingurgitam de sangue, apresentando tamanho de 3 mm a 10 mm, e realizam a muda para o estágio adulto, último do ciclo. O estágio adulto apresenta dimorfismo sexual. As fêmeas se ingurgitam em dias ou semanas, são fertilizadas pelos machos em cima do hospedeiro, podendo atingir tamanhos de até 30 mm de comprimento. Quando ingurgitadas, as fêmeas se desprendem do hospedeiro para o ambiente, onde irão colocar milhares de ovos dando início a uma nova geração (ADENUBI et al., 2018; VIEIRA et al., 2004).

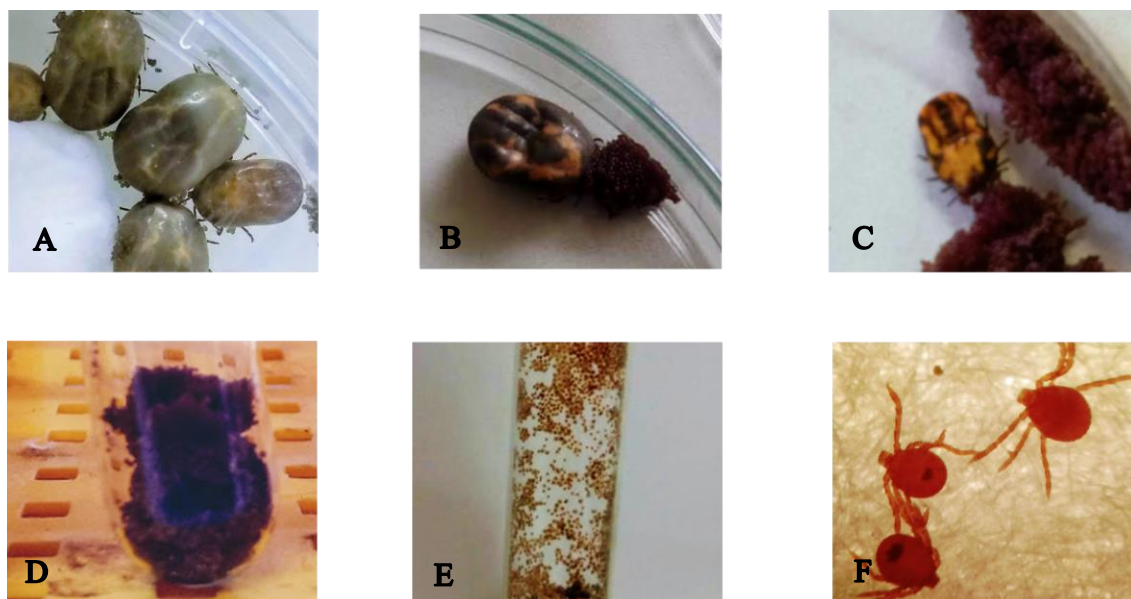


Figura 2. Estágios do ciclo de vida de *D. nitens* em laboratório. (A) Fêmeas ingurgitadas; (B) Início da oviposição; (C) Término da oviposição; (D) Ovos; (E) Larvas recém eclodidas; (F) Larvas visualizadas em microscópio óptico (4x). Fonte: arquivo pessoal.

O gênero *Dermacentor* pertence a família de ixodídeos, os chamados carrapatos de corpo duro, que incluem os carrapatos mais comuns em animais domésticos no Brasil como, por exemplo, o carrapato-da-orelha-do-cavalo, o carrapato-do-boi, o carrapato-do-cachorro e o carrapato-estrela. Deste gênero, apenas a espécie *Dermacentor nitens* ocorre no Brasil. (GUZMÁN-CORNEJO et al., 2016; KOLLER et al., 2017).

D. nitens é a principal espécie de carrapato que ocorre em equinos, conhecido popularmente por carrapato-da-orelha-do-cavalo devido a sua preferência em parasitar cavalos e se fixar no pavilhão auricular dos hospedeiros, embora possa ser encontrado em qualquer lugar do corpo, como divertículo nasal, na região perineal e crinas, estando espalhado por todo o corpo do animal quando ocorre infestação em massa (KOLLER et al., 2017; LABRUNA et al., 2002).

Os danos causados por esse carrapato em equinos podem ser diretos, ocasionando um quadro clínico de anemia por uma infestação maciça, irritação e lesões que predispõe o estabelecimento de miíases e outras infecções; ou indiretos como a transmissão da piroplasmose equina, causada pelos

hemoprotozoários *Theileria equi* e *Babesia caballi*, que pode resultar na morte ou redução do desempenho do animal. A sanidade dos animais está relacionada diretamente com o seu valor comercial, pois animais debilitados pela ação de carrapatos perdem seu valor, interferindo na utilidade do animal como força de trabalho e/ou competições (KOLLER et al., 2017; GUGLIELMONE et al., 2006).

Em relação a infestação de *D. nitens* em outras espécies animais, este carrapato ocorre em baixa quantidade e de maneira acidental e, por isso, demais hospedeiros não são importantes para a manutenção desse carrapato, sendo considerado bastante específico para equinos (KOLLER et al., 2017).

O controle desses carrapatos é realizado principalmente através da utilização de acaricidas sintéticos, tanto como medida profilática quanto de tratamento. O uso indiscriminado dos acaricidas leva a uma pressão de seleção nos carrapatos e o desenvolvimento de resistência aos produtos, além de causar a contaminação dos produtos de origem animal e do meio ambiente (FRANCO et al., 2017; PERINOTTO et al., 2013). Formulações comerciais à base de piretróides, por exemplo, alfametrina e cipermetrina são utilizadas e as únicas indicadas no comércio brasileiro para o uso em equinos. As aplicações podem ser por banhos de imersão, aspersão e tópicas quando os carrapatos se encontram em locais não alcançados por outras formas de aplicação, tais como o pavilhão auricular e o divertículo nasal (BELLO, 2008; KOLLER et al., 2017; LABRUNA et al., 2004).

É crescente a busca por métodos alternativos para o controle dos carrapatos e, nesse sentido, muitas plantas têm sido estudadas quanto ao potencial acaricida de seus extratos, óleos essenciais e outras substâncias. Pinto et al. (2018) avaliaram os efeitos dos extratos vegetais de *Rheedia longifolia* (Clusiaceae), *Garcinia xanthochymus* (Clusiaceae), *Plumbago scandens* (Plumbaginaceae), *Hovenia dulcis* (Rhamnaceae), *Malpighia glabra* (Malpighiaceae), *Euphorbia tirucalli* (Euphorbiaceae) e *Nerium adelfa* (Apocynaceae) em ovos de *D. nitens* e *Rhipicephalus sanguineus* em concentrações de 1.000 partes por milhão (ppm). Os autores observaram que os extratos tiveram um efeito significativo na taxa de eclosão dos ovos, com destaque para os extratos de *H. dulcis* e *M. glabra* que foram eficazes *in vitro* em ovos de *R. sanguineus* e *D. nitens* (89 e 100%, respectivamente), e podem ser

considerados candidatos potenciais para o controle alternativo desse tipo de praga.

Produtos naturais ou extratos de plantas podem ser carrapaticidas ideais por serem biodegradáveis e não agredirem ao meio ambiente. Além disso, a resistência pode se desenvolver mais lentamente, pois, os produtos naturais podem conter mais de um princípio ativo (ADENUBI et al., 2018; OKWUTE, 2012).

2.6 *Dypsis decaryi*

A família Arecaceae possui 183 gêneros e mais de 2500 espécies que estão divididas em subfamílias como Calamoideae, Nypoideae, Coryphoideae, Ceroxyloideae e Arecoideae (DRANSFIELD et al., 2005; HORN et al., 2009). Nesta vasta família estão inseridas palmeiras de importância econômica, alimentícia, medicinal e ornamental. Por exemplo, a palmeira *Euterpe oleracea* Mart, conhecida popularmente como açaí, é nativa da região amazônica e tem sido utilizada para a alimentação de habitantes rurais, como também na medicina popular. Por exemplo, o óleo obtido da fruta do açaí apresenta ação antidiarreica e seu fruto apresenta capacidade antioxidante sendo utilizado como alimento funcional (AGRA et al., 2007; FAVACHO et al., 2011; PLOTKIN BALICK, 1984). Outro representante importante desta família é o coco (*Cocos nucifera*), uma palmeira cultivada que apresenta valor nutricional e medicinal, pois seu fruto e água apresentam propriedades medicinais como antibacteriana, antifúngica, antiviral, antiparasitária, antioxidante, hipoglicemiante, hepatoprotetiva e imunestimulante (DEBMANDAL; MANDAL, 2011).

A palmeira ornamental *Dypsis decaryi* pertence à família Arecaceae, subfamília Arecoideae, tribo Areceae e sub-tribo Dypsidinae (BAKER et al., 2011). É conhecida popularmente por Palmeira Triangular, e seus principais atributos ornamentais são a característica de distribuição das folhas e cor acinzentada. A espécie é nativa de Madagascar e pode alcançar cerca de 4m a 5m de altura, sendo seus frutos consumidos na sua região de origem (BAO et al., 2010; LORENZI et al, 2004).

As palmeiras ornamentais apresentam capacidade de se adaptar e sobreviver em diversas condições edafoclimáticas (RAMOS et al., 2013). Apesar

de ser muito utilizada no paisagismo brasileiro *D. decaryi* ainda é pouco estudada e não há relatos até o presente momento sobre suas propriedades biológicas e medicinais, sendo uma fonte promissora de investigações que busquem avaliar a presença de lectinas em suas sementes, assim como as suas possíveis atividades biológicas.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral:

- Extrair, purificar, caracterizar uma lectina de sementes de *Dypsis decaryi* e avaliar *in vitro* as suas atividades biológicas.

3.2 Específicos:

- Avaliar a presença de lectinas na casca, tegumento e endosperma de sementes de *Dypsis decaryi*;
- Extrair uma lectina de tegumento de sementes de *D. decaryi*;
- Purificar a lectina por fracionamento acetônico e método cromatográfico de exclusão molecular em Superdex G-75;
- Caracterizar a lectina purificada quanto à estabilidade em diferentes temperaturas e pH na atividade hemaglutinante;
- Avaliar as atividades biológicas da lectina purificada (antibacteriana, antifúngica e a citotoxicidade);
- Realizar a análise fitoquímica do extrato aquoso do tegumento das sementes de *D. decaryi*;
- Determinar *in vitro* a atividade carrapaticida do extrato aquoso do tegumento, do precipitado proteico e sobrenadante frente ao carrapato *Dermacentor nitens*;
- Investigar a atividade sequestradora de radical DPPH.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADENUBI, O. T. In vitro bioassays used in evaluating plant extracts for tick repellent and acaricidal properties: A critical review. **Veterinary Parasitology**, v. 254, p. 160–171, 2018.
- AGRA-NETO, A. C. et al. Effect of *Moringa oleifera* lectins on survival and enzyme activities of *Aedes aegypti* larvae susceptible and resistant to organophosphate. **Parasitology Research**, v. 113, p. 175–184, 2014.
- AGRA, M. F. et al. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 28-44, 2007.
- AHMED, A. et al. Jacalin-copper sulfide nanoparticles complex enhance the antibacterial activity against drug resistant bacteria via cell surface glycan recognition. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 163, p. 209–217, 2018.
- ASHRAF, G. M. et al. Purification, characterization, sequencing and biological chemistry of galectin-1 purified from *Capra hircus* (goat) heart. **The protein journal**, v. 30, n. 1, p. 39–51, 2011.
- ALMADA, D. V. Antimicrobial resistance profile in patients served in a private laboratory in the municipality of Santa Inês-MA. **Revista UNINGÁ**, v. 30, n. 3, p. 10-14, 2017.
- BAKER, W. J. et al. Phylogenetic relationships among arecoid palms (Arecaceae: Arecoideae). **Annals of Botany**, v. 108, p. 1417–1432, 2011.
- BAO, F. et al. Morfologia do diásporo e da plântula de *Dyopsis decaryi* (Jum.) Beentje & J. Dransf. (Arecaceae). **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 4, n. 3, 2010.
- BARI, A. U. et al. Purification and partial characterization of a new mannose/glucose-specific lectin from *Dialium guineense* Willd seeds that exhibits toxic effect. **Journal of molecular recognition: JMR**, v. 26, n. 8, p. 351–6, 2013.
- BELLO, A. C. et al. Controle de *Anocentor nitens* (Neumann, 1897) (Acari: Ixodidae) em equinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 1, p. 59-63, 2008.
- BELLANDE, K. Plant Lectins and Lectin Receptor-Like Kinases: How Do They Sense the Outside? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, p. 1164, 2017.
- BHOWAL, J. et al. Purification and molecular characterization of a sialic acid

specific lectin from the phytopathogenic fungus *Macrophomina phaseolina*. **Carbohydrate Research**.v.340, p. 1973-1982, 2005.

BOBBILI, K. B. et al. Coccinia indica agglutinin, a 17 kDa PP2 like phloem lectin: Affinity purification, primary structure and formation of self-assembled filaments. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 1227–1236, 2018.

BOYD, W. C.; SHAPLEIGH, E. Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). **Science**. v. 119, p. 419,1954.

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

CANDY, L. et al. Structural and functional characterization of the GalNAc/Gal-specificlectin from the phytopathogenic ascomycete *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) deBary, **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 308, p. 396–402, 2003.

CARVALHO, A. de S. 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.

CASTANHEIRA, L. E. et al. Biochemical and functional characterization of a C-type lectin (BpLec) from *Bothrops pauloensis* snake venom. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 54, p. 57– 64, 2013.

CAVADA, B. S. et al. Structural studies and nociceptive activity of a native lectin from *Platypodium elegans* seeds (nPELa). **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 107, p. 236–246, 2018.

CHAVES, R. P. et al. Structural characterization of two isolectins from the marine red alga *Solieria filiformis* (Kützinger) P.W. Gabrielson and their anticancer effect on MCF-7 breast cancer cells. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 107, p. 1320–1329, 2018.

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.

CHE, A. F.; HUANG, X. J.; XU, Z. K. Polyacrylonitrile-based nanofibrous membrane with glycosylated surface for lectin affinity adsorption. **Journal of Membrane Science** v. 366, p. 272– 277, 2011.

CHUMKHUNTHOD, P. et al. Purification and characterization of an N-acetyl-D-galactosamine-specific lectin from the edible mushroom *Schizophyllum commune*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1760, p. 326–332, 2006.

COELHO, L. C. B. B. et al. Lectins, Interconnecting Proteins with Biotechnological/Pharmacological and Therapeutic Applications. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. 2017.

CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B. Purification of a glucose/mannose specific lectin, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* mart. (Camaratu Bean). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 55, n. 3, p. 261–273, 1995.

COSTA, R. B. et al. Purification and characterization of a lectin with refolding ability from *Genipa americana* bark. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 119, p. 517–523, 2018.

DALL'AGNOL, B. et al. *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Ixodes longiscutatus ticks from Brazilian Pampa. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 8, p. 928–932, 2017.

DRANSFIELD, J. et al. A new phylogenetic classification of the palm family, Arecaceae. **Kew Bulletin**, v. 60, p. 559 – 569, 2005.

DRUMMOND R. O. et al. Boophilus annulatus/ and B. microplus/ Laboratory Tests of Insecticides. **Journal of Economic Entomology**. v. 66, n. 1, 1973.

DEBMANDAL, M.; MANDAL, S. Coconut (*Cocos nucifera* L.: Arecaceae): In health promotion and disease prevention. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, p. 241-247, 2011.

DEL RIO, M. et al. Internalization of a sunflower mannose-binding lectin into phytopathogenic fungal cells induces cytotoxicity. **Journal of Plant Physiology**. v. 221, p. 22–31, 2018.

ELFSTRAND, M. Über blutkörperchenagglutinierende Eiweisse. In: Kobert R (ed), **Görberdorfer veröfentlichungen a Band I. Enke**, Stuttgart, Germany, p 1–159, 1898.

FAO. 2004. (eds.) Module 1. Ticks: Acaricide resistance: Diagnosis management and prevention. In **Guidelines Resistance Management and integrated parasite control in ruminants**. Rome: FAO Animal Production and Health Division, CD Rom.

FAVACHO, H. A. S. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Euterpe oleracea* oil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21, n. 1, p. 105-114, 2011.

FERREIRA, R. S. et al. Coagulant and antibacterial activities of the water-soluble seed lectin from *Moringa oleifera*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 53, p. 186–192, 2011.

FERREIRA, G. R. S., 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.

FILHO, V. DA S. et al. Extração, purificação parcial e caracterização de lectinas de sementes de *Crotalaria juncea*. v. 2, p. 12–24, 2013.

FRANCO, P. F. et al. Desenvolvimento de novas ferramentas para o controle de carrapatos. **Sinapse Múltipla**, v. 6, n. 1, p. 66-69, 2017.

GABIUS, H. J. et al. Animal lectins. **European Journal of Biochemistry**. v. 243, p. 543–576, 1997.

GAUTAM, A. K. et al. Biochemical and functional properties of a lectin purified from the seeds of *Cicer arietinum* L. **3 Biotech**, v. 8, p. 272, 2018.

GIANIZELLA, S. L. Ticks (Acari: Ixodidae) of the state of Amazonas, Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v. 74, p. 177–183, 2018.

GUGLIELMONE, A. A. et al. Diversidade e importância de carrapatos na sanidade animal. In: Barros-Battesti, D.M., Arzua, M., Bechara, G.H. (Eds.), **Carrapatos de Importância médico veterinária da região neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies**. Vox/ICTTD-3/Butantan, São Paulo, p. 115–138, 2006.

GUZMÁN-CORNEJO, C. et al. The Dermacentor (Acari, Ixodida, Ixodidae) of Mexico: hosts, geographical distribution and new records. **ZooKeys**, v. 569, p. 1–22, 2016.

HASSAN, M. et al. Mushroom Lectins: Specificity, Structure and Bioactivity Relevant to Human Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 4, p. 7802–7838, 2015.

HORN, J. W. et al. Evolution of lamina anatomy in the palm family (arecaceae). **American Journal of Botany**, v. 96, n. 8, p. 1462–1486, 2009.

INGALE, A. G.; HIVRALE, A. U. Plant as a plenteous reserve of lectin. **Plant Signaling & Behavior**, v.8, n.12, p. 1–7, 2013.

JIANG, J. et al. Cloning and expression of a novel cDNA encoding a mannose-specific jacalin-related lectin from *Oryza sativa*. **Toxicon**, v. 47, p. 133–139, 2006.

JIN, X. et al. Canavalia ensiformis-derived lectin inhibits biofilm formation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 126, p. 300-310, 2018.

KARNCHANATAT, A. Antimicrobial activity of lectins from antimicrobial activity of lectins from plants. In **Antimicrobial Agents**; BOBBARALA, V., Ed.; InTech: Rijeka, p. 145–177, 2012.

KAWAGISHI, H., et al. A lectin from mycelia of the fungus *Ganoderma lucidum*. **Phytochemistry**, v. 44, p. 7-10, 1997.

KENNEDY, J. F. et al. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 26, p. 219-230, 1995.

KOLLER, W. W. et al. Biologia e controle de *Dermacentor nitens*: o carrapato-da-orelha-do-cavalo. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 2017. 32 p. (**Documentos / Embrapa Gado de Corte**, ISSN1983-974X; 231).

LABRUNA, M. B. et al. Seasonal dynamics of ticks (Acari: Ixodidae) on horses in the state of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 105, p. 65-77, 2002.

LABRUNA, M. B. et al. Controle estratégico do carrapato *Amblyomma cajennense* em equinos. **Ciência Rural**, v. 34, n. 1, p. 195-200, 2004.

LABRUNA, M. B. et al. A new argasid tick species (Acari: Argasidae) associated with the rock cavy, *Kerodon rupestris* Wied-Neuwied (Rodentia: Caviidae), in a semiarid region of Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 9, p.511, 2016.

LACERDA, R. R. et al. Lectin from seeds of a Brazilian lima bean variety (*Phaseolus lunatus* L.var. cascavel) presents antioxidant, antitumour and gastroprotective activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 95, p. 1072–1081, 2017.

LAM, S. K.; NG, T. B. Lectins: production and practical applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 1, p. 45-55, 2011.

LIMA, M. E. P. et al. Purification of a lectin from the marine red alga *Gracilaria cornea* and its effects on the cattle tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 16, p. 6414–6419, 2005.

LIN, P.; NG, T. B. Preparation and biological properties of a melibiose binding lectin from *Bauhinia variegata* seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 10481–86, 2008.

LOSSIO, C. F. et al. Lectin from *Canavalia villosa* seeds: A glucose/mannose-specific protein and a new tool for inflammation studies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 105, p. 272–280, 2017.

LORENZI, H. et al. Palmeiras brasileiras e exóticas e cultivadas. **Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum**, 2004, 303p.

LUZ, L. A. et al. Structural characterization of coagulant *Moringa oleifera* Lectin and its effect on hemostatic parameters. **International Journal of Biological**

Macromolecules, v.58, p. 31– 36, 2013.

MACEDO, M. L. R. et al. Insecticidal Activity of Plant Lectins and Potential Application in Crop Protection. **Molecules**, v. 20, p. 2014-2033, 2015.

MANNING, J. C. Lectins: a primer for histochemists and cell biologists. **Histochemistry and Cell Biology**, DOI 10.1007/s00418-016-1524-6. 2016.

MODY, R. et al. Use of Lectins as Diagnostic and Therapeutic Tools for Cancer. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 33, n. 1, p 1-10, 1995.

MONTAÑEZ, B. et al. Resistance in vitro equine tick (*Dermacentor nitens*) in the Department of Córdoba, Colombia. **Revista Colombiana de Ciencia Animal**, v. 9, n. 1, p. 60-65, 2017.

MUÑOZ-LEAL, S. et al. Description of a new soft tick species (Acari: Argasidae: Ornithodoros) associated with stream-breeding frogs (Anura: Cycloramphidae: Cycloramphus) in Brazil. **Ticks and Tick-borne Disease**, v. 8, p. 682–692, 2017.

NAIK, S. et al. Biochemical characterisation of lectin from Indian hyacinth plant bulbs with potential inhibitory action against human cancer cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 105, p. 1349–1356, 2017.

NAPOLEÃO, T. H. et al. Termiticidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* against *Nasutitermes corniger* and its mechanisms. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, n. 1, p. 52-59, 2011.

NAPOLEÃO, T. H. Deleterious effects of *Myracrodruon urundeuva* leaf extract and lectin on the maize weevil, *Sitophilus zeamais* (Coleoptera, Curculionidae) **Journal of Stored Products Research**. v. 54, p. 26-33, 2013.

NAREDDY, P. K. et al. Purification, physico-chemical characterization and thermodynamics of chitooligosaccharide binding to cucumber (*Cucumis sativus*) phloem lectin. **International Journal of Biological Macromolecules**. V. 95, p. 910–919, 2017.

NASCIMENTO, C.O. et al. Optimized extraction of a lectin from *Crataeva tapia* bark using AOT in isooctane reversed micelles. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 779–782, 2008.

NASCIMENTO, C. O. et al. Aqueous two-phase systems: new strategies for separation and purification of lectin from crude extract of *Cratylia mollis* seeds. **Separation and Purification Technology**, v. 116, p. 154–161, 2013.

NASCIMENTO, K. S. et al. Partitioning and recovery of *Canavalia brasiliensis* lectin by aqueous two-phase systems using design of experiments methodology. **Separation and Purification Technology**, v. 75, n. 1, p. 48–54,

2010.

NASCIMENTO, K. S. et al. An overview of lectins purification strategies. **Journal of Molecular Recognition**, v. 25, n. 11, p. 527–541, 2012.

NASCIMENTO, J. C. et al. Antioxidant determination activity by DPPH method and assay for total flavonoids in leaves extracts of *Bauhinia variegata* L. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 92, n. 4, p. 327-332, 2011.

NUNES, B. S. et al. Lectin extracted from *Canavalia grandiflora* seeds presents potential anti-inflammatory and analgesic effects. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 379, p. 609–16, 2009.

OKWUTE, S. K. Plants as potential sources of pesticidal agents: a review. **Pesticides Advances in Chemical and Botanical Pesticides. InTech**, 2012.

OLIVEIRA, M. D. L. et al. Purification of a lectin from *Eugenia uniflora* L. seeds and its potential antibacterial activity. **Letters in Applied Microbiology**, v. 46, p. 371–376, 2008.

OLIVEIRA, A. L. D. et al. Bacterial resistance mechanisms of antibiotics urinary infection. **Revista UNINGÁ**. v. 20, n. 3, p. 65-71, 2014.

OSTERNE, V. J. S. et al. Structural characterization of a lectin from *Canavalia virosa* seeds with inflammatory and cytotoxic activities. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 94, p. 271–282, 2017.

PAIVA, P.M.G. et al. Antimicrobial activity of secondary metabolites and lectins from plants. In: MENDEZ-VILLAS, A. **Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology**. Formatex Research Center: Espanha, p. 396-406, 2010.

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

PERINOTTO, W. M. de S. et al. Controle de *Dermacentor nitens* utilizando uma formulação comercial a base de *Metarhizium anisopliae*. **Revista brasileira de medicina veterinária**, v. 35, p. 35-42, 2013.

PEREIRA, P. S. Utilização de extratos de sementes de visgueiro, pau-d'óleo e pau-ferro para detectar a presença de lectinas através da atividade hemaglutinante com eritrócitos. **REVISTA SAÚDE E CIÊNCIA**. On line, 3(3): 1-10, set-dez, 2014.

PINTO, Z. T. et al. Acaricidal effects of seven Brazilian plant extracts. **Revista Colombiana de Entomología**, v. 44, n. 1, p. 44-47, 2018.

POHLEVEN J. et al. Purification, characterization and cloning of a ricin B-Like lectin from Mushroom *Clitocybe nebularis* with antiproliferative activity against human leukemic T cells. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1790, p.173-181, 2009.

PLOTKIN, M. J., BALICK, M. Medicinal uses of South American palms. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 10, p. 157-179, 1984.

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.

RAHIMI, V. et al. Toxicity and physiological effects of an extracted lectin from *Polygonum persicaria* L. on *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). **Physiological and Molecular Plant Pathology**. v. 101, p. 38-44, 2018.

RIBEIRO, A. C. et al. Plant Lectins: Bioactivities and Bioapplications. **Studies in Natural Products Chemistry**, Vol. 58. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64056-7.00001-5>, 2018.

PEREIRA, C. A. et al. Hemagglutinin of cassava leaves (*Manihot esculenta* Crantz): partial purification and toxicity. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 900-907, 2008.

PIRES, A. de F. et al. Lectin purified from *Lonchocarpus campestris* seeds inhibits inflammatory nociception. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 125, p. 53–60, 2019.

RAMOS, A. P. et al. Doenças e pragas que condicionam o uso de palmeiras em espaços verdes. **Revista da APH**, n. 112, 2013.

RATANAPO, S. et al. Interaction of a mulberry leaf lectin with a phytopathogenic bacterium, *P. syringae* pv *mori*. **Plant Science**, v. 160, p. 739–744, 2001.

RIVERA-PÁEZ, F. A. et al. Contributions to the knowledge of hard ticks (Acari: Ixodidae) in Colombia. **Ticks and Tick-borne Diseases**. v. 9, p. 57–66, 2018.

RÜDIGER, H.; GABIUS, H. J. Plant lectins: occurrence, biochemistry, functions and applications. **Glycoconjugate Journal**, v. 18, p. 589–613, 2001.

SANO, K.; OGAWA, H. Hemagglutination (Inhibition) Assay. Jun Hirabayashi (ed.), **Lectins: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology**, vol. 1200, DOI 10.1007/978-1-4939-1292-6_4, 2014.

SANTOS, A. F. S et al. Strategies to Obtain Lectins from Distinct Sources

In: L. V. Berhardt Advances (Ed.), **Medicine and Biology**, Nova Science Publishers, 2013.

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

SHARMA, A. Purification and Characterization of a Lectin from *Phaseolus vulgaris* cv. (Anasazi Beans). **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. 2009.

SHARMA, M. et al. Purification, characterization and biological significance of mannosebinding lectin from *Dioscorea bulbifera* bulbils. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 102, p. 1146–1155, 2017.

SHARON, N. Lectins: past, present and future. **Biochemical Society Transactions**, v. 36, p. 1457-60. doi: 10.1042/BST0361457, 2008.

SHIVAMADHU, M. C. Anti-cancer and anti-angiogenic effects of partially purified lectin from *Praecitrullus fistulosus* fruit on in vitro and in vivo model. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 9, p.1299–1309, 2017.

SIKORA, E. et al. The antioxidant activity of selected cruciferous vegetables subjected to aquathermal processing. **Food Chemistry**, v. 107, p. 50-55, 2008.

SILVA, P. M. da PgTeL, the lectin found in *Punica granatum* juice, is na antifungal agent against *Candida albicans* and *Candida krusei*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 391–400, 2018.

SILVA, L. C. et al. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, p. 669-681, 2010.

SILVA, M. C. C. et al. Purification, primary structure and potential functions of a novel lectin from *Bauhinia forficata* seeds. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 7, p. 1049–1059, 2012.

SINGH, R. S.; JAIN, P.; KAUR, H. P. Characterization and antimicrobial activity of lectins from *Penicillium* sp. **Indian journal of experimental biology**, v. 51, n. 11, p. 984–91, 2013.

SINGH, R. S.; KAUR, H. P.; SINGH, J. Purification and Characterization of a Mucin Specific Mycelial Lectin from *Aspergillus gorakhpurensis*: Application for Mitogenic and Antimicrobial Activity. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, p. e109265, 2014.

SIVAKAMAVALLI, J.; VASEEHARAN, B. Purification, characterization and functional role of lectin from green tiger shrimp *Penaeus semisulcatus*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 67, p. 64–70, 2014.

STILLMARK H. Über Ricin ein giftiges Ferment aus den Samen von Ricinus

communis L. und einige anderen Euphorbiaceen. Inaugural dissertation Dorpat, Tartu, 1888.

TEIXEIRA, E. et al. Biological applications of plants and algae lectins: An overview. **Carbohydrates – Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology**. 2012, <http://dx.doi.org/10.5772/50632>.

THAKUR, K. Sauromatum guttatum lectin: Spectral studies, lectin-carbohydrate interaction, molecular cloning and in silico analysis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 1267–1279, 2017.

TSATSARIS, A. et al. Species composition, distribution, ecological preference and host association of ticks in Cyprus. **Experimental and Applied Acarology**, v. 70, n. 4, p. 523–542, 2016.

VAN DAMME, E. J. M. et al. Plant lectins: A composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 17, p. 575–692, 1998.

VAN DAMME, E. J. M. et al. A Novel Family of Lectins Evolutionarily Related to Class V Chitinases: An Example of Neofunctionalization in Legumes. **Plant Physiology**, v. 144, p. 662–672, 2007.

VAN DAMME, E. J. M. History of Plant Lectin Research. In: Jun Hirabayashi (ed.), **Lectins: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology**, vol. 1200, DOI 10.1007/978-1-4939-1292-6_1, 2014.

VARROT, A.; BASHEER, S. M.; IMBERTY, A. Fungal lectins: structure, function and potential applications. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 23, n. 5, p. 678–685, 2013.

VIEIRA et al. Manual de vigilância acarológica. São Paulo: **A Secretaria**, 2004.

YAO, Q. et al. A new chitin-binding lectin from rhizome of *Setcreasea purpurea* with antifungal, antiviral and apoptosis-inducing activities. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1477–1485, 2010.

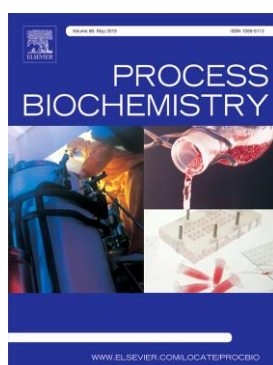
WATKINS, W.M.; MORGAN, W.T.J. Neutralization of the anti-H agglutinin in eel by simple sugars. **Nature**, 169:825–826, 1952.

WILCHES-TORRES A. et al. Purification and biochemical characterization of a t/t_n specific lectin from *Lepechinia bullata* seeds (Lamiaceae). **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. v. 9, p. 165-174, 2017.

WONG, J. H; CHAN, H Y E. A mannose/glucose-specific lectin from Chinese evergreen chinkapin (*Castanopsis chinensis*) **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1780, p. 1017-1022, 2008.

CAPÍTULO I

Artigo intitulado “**DdeL, a novel thermostable lectin from *Dypsis decaryi* seeds: Biological properties**”
submetido à revista:



DdeL, a novel thermostable lectin from *Dypsis decaryi* seeds: Biological properties

Michelly Élen Leal Menezes Torres^a, Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa^a,
João Victor de Oliveira Santos^b, Isabella Macário Ferro Cavalcanti^b, Marllyn
Marques da Silva^c, Aldeni José da Silva^a, Cynthia de Oliveira Nascimento^a, Ana
Lúcia Figueiredo Porto ^{a,d*}

^aDepartment of Morphology and Animal Physiology, Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE), Recife, PE, Brazil.

^bLaboratory of Microbiology and Immunology, Academic Center of Vitória (CAV), Federal University of Pernambuco (UFPE), Vitória de Santo Antão, PE, Brazil.

^cLaboratory of Biotechnology and Pharmaceuticals, Academic Center of Vitoria, Federal University of Pernambuco (UFPE), Vitória de Santo Antão, PE, Brazil.

^dLaboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brazil.

*Corresponding author:

Prof. Romero Brandão-Costa

Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego s/n, CEP 50.670-420 Recife, PE, Brazil

Tel: +55.81.2126.8540

Fax: +55.81.2126.8576

E-mail address: romero_brandao@outlook.pt

ABSTRACT

A novel thermostable lectin, called DdeL, was obtained from the extract of the tegument of the seed of *Dypsis decaryi*. The extract of the tegument had higher specific hemagglutination activity (196.03) and subjected to 70% acetone precipitation and purification on Superdex G-75, exhibiting a single peak (34,8kDa). DdeL agglutinated blood types (A, B, AB, O and rabbit) and inhibited only by glycoproteins (albumin, and azoalbumin azocasein). Hemagglutinating activity (HA) was higher at acid pH (pH 5-6) and was observed at all temperatures (40 ° - 100 ° C). DdeL exhibited bacteriostatic activity against the pathogenic bacteria tested *Providencia stuartii* and *Staphylococcus aureus*.

ATCC 29213, minimum inhibitory concentration (MIC) of 750 µg/mL. The lectin had a MIC₅₀ of 5.18 µg/mL for *S. schenckii* and MIC₅₀ between 2.59 - 20.7 µg/mL for *C. albicans*. DdeL presented MIC₅₀ of 0.26 - 0.52 µg/mL for *S. schenckii* and MIC₅₀ of 2.06 µg/mL for *C. albicans*. DdeL showed no cytotoxic effect on macrophages (J774.A1) and renal embryonic cells (HEK-293). DdeL should be performed to enable its use in the clinical segment.

KEYWORDS: Process biochemistry; agglutination; recognizing; erythrocytes; protein; cell viability.

1. Introduction

Lectins are proteins or glycoproteins that bind specifically to mono-, oligo- or polysaccharides [1] and have been extensively studied for their antimicrobial activities [2], mitogenic [3], antitumor [4], antifungal [1], insecticides [5] and nematocides [6].

Lectins are present in all living beings, although plants are their main source. Plant lectins were obtained from several plant families, such as: Rubiaceae [10], Fabaceae (leguminous) [7], Lamiaceae [11], Dioscoreaceae [12], Cucurbitaceae [13] and Araceae [14], there were no reports of lectins obtained in the Arecaceae family. After identification of the biomolecule, its physico-chemical characterization is fundamental to understand its operating conditions and thus can be used as a biological agent [15].

The antibacterial activity of lectins was observed by the bacteriostatic and bactericidal effects, for example, *Apuleia leiocarpa* lectin (ApuLSL) that showed such effects in gram-positive and gram-negative species, being more effective against three varieties of *Xanthomonas campestris* [7]. Some lectins have interfered in the formation of biofilms, such as the lectin of *Calliandra surinamensis* (CasuL) that, in addition to the bacteriostatic effect, reduced biofilm formation by *Staphylococcus saprophyticus* and *Staphylococcus aureus* [8].

Lectins with antifungal activity can recognize and bind to important components of the cell wall of fungi, such as chitin, oligomers of chitin, cellulose, glucans, mannan and other saccharides [9]. The lectin of *Alpinia purpurata* (ApuL) caused damage to cells of *Candida albicans* and *C. parapsilosis*, which exhibited

malformations with stretching and protuberances, presence of cellular fragments that affected cell growth, and loss of cellular integrity.

Dypsis decaryi is an ornamental palm native to Madagascar, used in parks and gardens, and is expanding all over Brazil. Its main ornamental attributes are leaf distribution and grayish color [19,20]. Thus, considering the scarcity of data to date, this work proposes to report a new lectin extracted from the seeds of the ornamental palm *D. decaryi*, in addition to elucidating its biological activities (antibacterial, antifungal and cytotoxic).

2. Material and methods

2.1 Vegetable material and extract preparation

The fruits from *D. decaryi* were collected in the city of Recife-PE. The fruits were washed and dried at 50 °C for five days, then the bark was removed to obtain the seeds. The bark extract was prepared 10% with 0.15 M NaCl in constant stirring for 3 hours. The extract of the tegument, tissue lining the endosperm, was obtained with 0.15 M NaCl by mechanical agitation. After removal of the tegument, the endosperm extract was obtained by trituration in a blender with 0.15 M NaCl. The extracts were filtered with filter paper using vacuum pump. The extracts were then stored at -20 °C.

2.2 Hemagglutinating activity

The hemagglutination activity (HA) was performed as described by Correia and Coelho [21] in 96-well microtiter plates using a suspension of rabbit erythrocytes or human blood suspensions (A, B, O and AB) (2.5% v/v) previously treated with glutaraldehyde. Briefly, 50 µL of the sample was serially two-fold diluted in 0.15 M NaCl in a plate row and then 50 µL of the erythrocyte suspension was added to each well. HA was defined as the inverse of the titer; corresponding to a lower dilution of the sample that presented complete hemagglutination, after incubation for 45 min. The specific HA was defined as the ratio between HA and protein concentration (mg/mL). Rabbit erythrocytes were chosen for subsequent assays. This activity was performed after each purification step and lectin characterization tests.

2.3 Protein content

The protein dosage during the extraction and purification steps of the lectin was performed by the bicinchoninic acid method (BCA) described by Smith [22], with small modifications, where 25 μ L of the sample was added to 200 μ L of BCA solution in a microplate and incubated at 37 ° C for 30 min. Absorbances were measured at 595 nm on a microplate reader (iMark TM Microplate Absorbance Reader - Bio Rad).

2.4 Purification of *Dypsis decaryi* seed lectin and molecular weight determination

The extract of the tegument was precipitated at 70% with acetone and the pellet resuspended in 5 mL of 0.15 M NaCl solution to determine the protein content and hemagglutinating activity. Thereafter, a 1mL aliquot of the ketone precipitate was subjected to gel filtration chromatography using a Äkta Avant 25 system (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) on a PC 3.2/30 Superdex 75 (HR10/300GL) column according to the instructions the manufacturer. The run was monitored at 215 nm and 280 nm, and fractions of 1 mL were collected by automatic fraction collector. The peaks were then subjected to the detection of hemagglutination activity. The molecular weight estimation was obtained using the calibration curve of the Superdex G75 HR 10/300GL column. Calibration was performed using a mixture of gel filtration molecular weight markers (1.0 mg/mL each): bovine serum albumin, carbonic anhydrase, chicken egg albumin and a trypsin inhibitor. The standard curve was plotted using UNICORN-6.0 software following the equation $y = -7.674x + 134.7$ ($R^2 = 0.991$).

2.5 Specificity for carbohydrates and glycoproteins

Specificity to carbohydrates and glycoproteins was evaluated in microtiter plates according to Correia e Coelho [21]. The lectin (50 μ L) was serially diluted in the carbohydrate solutions, after dilution, the microplate remained at room temperature for 45 minutes and then 50 μ L of the rabbit red blood cell suspension at 2.5% (v/v) was added. Plates were maintained at room temperature for 45 minutes for the evaluation of inhibition of hemagglutinating activity. The sugars evaluated were: rhamnose, arabinose, fructose, sucrose, glucose, galactose,

raffinose, all at 0.2 M. The glycoproteins used at 1 mg/mL concentration: lactoferrin, azoalbumin, azocasein, lysozyme and albumin.

2.6 Effects of pH and temperature on DdeL HA

Hemagglutinating activity of DdeL was evaluated in the presence at different pH values and after heating to different temperatures. The effect of the pH on the DdeL AH was performed in different 0.01 M pH solutions (citrate-phosphate pH 5.0 and 6.0; Tris-HCl pH 7.0-9.0; glycine-NaOH pH 10), with DdeL being serially diluted twice in these solutions in microplate for the determination of HA. The effect of temperature was evaluated by incubating DdeL at 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 °C for 30 min before conducting the hemagglutination assay.

2.7 Antibacterial activity

The antibacterial activity DdeL were performed by the determination of the minimum inhibition concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) using a microdilution broth method according to the Clinical and Laboratory Standards Institute [23]. Initially, was added Müller-Hinton broth in each well of the microdilution plates. DdeL were added by serial dilution at the concentration ranged from 2.9 - 1500 µg/mL. The bacterial suspensions, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Providencia stuartii* clinical isolate, extended spectrum beta-lactamase producing enterobacteria (ESBL) clinical isolate, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 33591, *Streptococcus mutans* clinical isolate and *Enterococcus faecalis* clinical isolate were adjusted in the density of 0.5 McFarland standard, diluted and deposited into the wells to obtain a final concentration of 10⁵ UFC/well. Then, the plates were incubated at 35 ± 2 °C for 24 h. The MIC was determined as the lowest concentration capable of inhibit the microbial growth by spectrophotometry at 620 nm (Multiskan microplate photometer FC, Thermo Scientific, Madrid, Spain). The minimum bactericidal concentration (MBC) was determined after the MIC results. An aliquot of the wells with no microbial growth was inoculated on Müller-Hinton agar and the plates were incubated at 35 ± 2 °C for 24 h. The CBM was determined as the lowest

concentration where there was no microbial growth. Three independent experiments were performed for each condition on different days.

2.8 Antifungal activity

The antifungal activity was performed by the 96-well plate microdilution test adapted to the CLSI M38-A document [24]. They were evaluated ten concentrations (2.6 - 1325 µg/mL) of the extract of the tegument, as well as ten concentrations (0.03 - 16.5 µg/mL) to DdeL. The fungi *Sporotrichum schenckii* URM 7968, *S. schenckii* URM 7969, *S. schenckii* URM 7971, *Candida albicans* URM 6401, *C. albicans* URM 4127 and *C. albicans* URM 6400 were obtained from the culture collection of Federal University of Pernambuco, Department of Mycology, Brazil. The fungi were grown in Potato-Dextrose-Agar (BDA) medium, *S. schenckii* for seven days and *C. albicans* 24h at 35 ° C. For preparation of the fungal suspension was added 5 mL of saline solution and with the aid of disposable handles detachment was promoted spores and hyphal fragments. The density of the cultures was adjusted turbidimetrically at a wavelength of 530 nm to obtain 80% transmittance for *S. schenckii* and 90% transmittance for *C. albicans*. The suspensions were diluted (1:50) in RPMI 1640 medium.

The culture medium used for the microdilution test was RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, USA) with L-glutamine and no sodium bicarbonate, buffered at pH 7.0 with 0.165 M morpho-lino-propane-sulfonic acid (MOPS) (Sigma-Aldrich, USA). The medium was sterilized by membrane filtration with a porosity of 0.22 µm (Millipore).

The wells from rows 1 through 10 of the microplates contained 100 µL of the concentrations and 100 µL of the inoculum, wells 11 and 12 consisted of the growth and sterilization controls, respectively. The microplates were incubated at 35°C for 24h (*C. albicans*) and 48h (*S. schenckii*).

The determination of the minimum inhibitory concentration 50% and 100% (MIC₅₀ and MIC₁₀₀) of DdeL and the tegument extract was performed by visual reading, considering the control well that obtained 100% growth, being attributed the percentage of inhibition of the concentrations tested.

2.9 Cytotoxic activity

Macrophages (J774.A1) and renal embryonic cells (HEK-293) were grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with fetal bovine serum (10%) and penicillin-streptomycin (1%) at 37 °C and 5% CO₂. The cells were counted in the newbauer chamber for the cell viability test.

The MTT assay ([3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] was used to determine the effect of DdeL on cell viability [25]. Cells were incubated in 96-well plates. The macrophages to 1x10⁵ cells/mL and the renal embryonic cells to 1x10⁴ cells/mL. After 24h of incubation, were exposed for 24 hours to DdeL, at the final concentrations of 1.5; 2.5; 5; 10 and 20 µg/mL. After the treatment period, 20 µL of MTT solution (4 mg/mL) were added in each well, and the plates were incubated for 2h. After the period, the supernatant was removed and 100 µL of DMSO (Dimethylsulfoxide) added. Absorbance reading was performed on Microplate Reader (BioteK Elx808) at 630 nm.

Cytotoxicity was expressed in cell viability: (Abs of treated cell populationX100/Abs of untreated cell population) [26]. The statistical analysis was performed in GraphPad Prism 5.0 program was used ANOVA followed by Bonferroni test.

3. Results and discussion

3.1 Extraction, purification of lectin from *Dypsis decaryi* seeds and determination of molecular weight

The results of lectin extraction in different parts of the seed are shown in Table 1. The extract of the tegument had a higher HA titre of 8192, protein content of 41.76 mg/mL and specific HA of 196.03 and therefore, was used in the subsequent tests. In the extract of the endosperm of the seed the amount of proteins was smaller (1.90 mg/mL), not being detected HA.

Several lectins have been obtained by extraction with 0.15M NaCl, such as *Punica granatum* (PgTeL) lectin and *Calliandra surinamensis* (CasuL), as well as other lectins have been extracted using buffered solutions such as *Bauhinia unguolata* seed lectin (BUL) which was obtained by extraction with 0.1M Tris-HCl [8; 27-28].

Table 2 shows the steps of purification of the lectin. Purified lectin (0.2 mg/mL) obtained on Superdex G-75 showed purification factor 6.70 with low lectin recovery (0.47%). The low yield may be justified by the fact that part of the sample is retained in the chromatographic column. A chromatographic profile representing the *D. decaryi* lectin isolation is shown in Fig. 1. Analysis of the chromatographic profile obtained on Superdex-G75 HR 10/300GL Column demonstrated a protein peak with estimated molecular mass at 34.8kDa. The purified lectin of *D. decaryi* was named DdeL.

3.2 Biochemical characterization of *D. decaryi* lectin (DdeL)

Table 3 shows the DdeL specificity for different blood types. DdeL agglutinated all evaluated blood types, human blood (A, B, AB and O) and rabbit, showing greater hemagglutinating activity when evaluated in the presence of O (2048) and rabbit (2048) blood types. Similarly, *Apuleia leiocarpa* seed lectin (ApulSL) agglutinated all erythrocytes tested, with emphasis on human type O blood and rabbit [7]. Other lectins are more specific for certain blood types, for example, lectin present in seeds of *Phaseolus lunatus* var. cascavel was able to agglutinate only human A-type erythrocytes [29].

The hemagglutinating activity of the DdeL was not inhibited by monosaccharides or oligosaccharides, however, it was totally inhibited by three glycoproteins (albumin, azoalbumin and azocasein), indicating a specificity for complex sugars (Table 4). The lectin of *Dioscorea bulbifera* (DBL) presented similar specificity, since its activity was inhibited only by glycoproteins such as asialofetuin, fetuin, mucin, asialomucin and transferrin [12]. Other lectins are specific for simple sugars, such as hyacinth bulb lectin which has been shown to be highly specific for mannose [15].

The HA of DdeL was higher (2048) in the range of pH 5-6, decreasing to 8 when pH was 9-10, revealing that lectin is more active at acidic pH (Fig. 2). Similarly, the *Genipa americana* lectin (GaBL) also showed higher hemagglutinating activity at pH 5.0 [10]. Other lectins are more active at basic pH, such as *Platypodium elegans* seed lectin (PELa) which showed maximum activity at pH 9-10 [30]. DdeL presented hemagglutinating activity between 40 and 100 °C and remained active after 3h at 100 °C, demonstrating a high

thermostability (Fig. 2). This resistance to high temperatures is commonly reported in plant lectins, for example, the lectin of *Calliandra surinamensis* maintained the activity after heating at all temperatures tested (30-100 °C) [8]. Another thermostable lectin at high temperatures was that of *Apuleia leiocarpa* (ApuSL) seeds, which had its hemagglutinating activity preserved after heating at 100 °C for 2 h [7]. However, some lectins are not stable at such high temperatures, for example, *Platypodium elegans* lectin (PELa) maintained its haemagglutinating activity up to 60 °C, its activity drastically reduced to 70 °C, and completely lost after 80 °C [25].

3.3 Antibacterial activity

DdeL exhibited bacteriostatic activity against the pathogenic bacteria tested, although the minimum inhibitory concentration (MIC) was high. The MIC and MBC values are given in Table 6. The most sensitive strains were the clinical isolate of *Providencia stuartii* and *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, which presented MICs of 750 µg/mL, while all other strains were inhibited at the concentration of 1500 µg/mL. The bactericidal activity was not detected for the tested isolates.

The bacteriostatic effect of the lectin according to the literature, as described for the lectin extracted from *Apuleia leiocarpa* (ApuSL), showed bacteriostatic effect against all tested isolates (11.2-180.5 µg/mL) [7]. The lectin *Alpinia purpurata* (ApuL) showed bacteriostatic activity (MIC 50 µg/mL) against isolated non-resistant *Staphylococcus aureus* (UFPEDA-02) and isolated from methicillin resistant *S. aureus* (UFPEDA-672) having MIC of 400 µg/mL for this isolate. ApuL showed bactericidal effect only for isolate of non-resistant *S. aureus* [2].

3.4 Antifungal Activity

Table 7 shows the results of the antifungal activity of the extract of the tegument of the seed of *D. decaryi* and DdeL. The extract of the tegument had a MIC₅₀ of 5.18 µg/mL for *S. schenckii* fungi, however the MIC₁₀₀ of the extract was between 10.35 - 82.81 µg/mL for these fungi. In relation to DdeL, *S. schenckii* URM 7971 was the most sensitive in MIC₅₀ of 0.26 µg/mL and the others in MIC₅₀

of 0.52 µg/mL. DdeL did not present MIC₁₀₀ for *S. schenckii* species. The extract of the tegument showed a MIC₅₀ between 2.59 - 20.7 µg/mL for fungi of the *C. albicans* species, where the most resistant was *C. albicans* URM 6401 with MIC₅₀ of 20.7 µg/mL. The MIC₁₀₀ of the extract of the tegument for *C. albicans* was between 662.5 - 1325 µg/mL. The MIC₅₀ from DdeL to *C. albicans* was 2.06 µg/mL, however, did not present MIC₁₀₀ for these fungi.

Antifungal activity of plant lectins has been reported for several species of fungi. Costa et al. [31] reported that *Phthirusa pyrifolia* (PpyLL) lectin did not show antifungal activity for most of the evaluated fungi, inhibiting only the fungi *Fusarium lateritium* URM 2665 and *Rhizoctonia solani* URM 2820. The lectin of *Phaseolus lunatus* (Lunatin) inhibited the growth of the species of fungi *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* and *Botrytis cinerea*, being its inhibitory effect considered concentration-dependent [32].

The report of new bioactive compounds, such as lectins, with antifungal activity is important for the development of new drugs alternative to commercial antifungals that have been losing their effects due to resistance developed by fungi.

3.5 Cytotoxic activity

The results of cytotoxic activity in vitro, through of the MTT assay in macrophages (J774.A) and renal embryonic cells (HEK-293), showed that the lectin did not present a cytotoxic effect, besides having stimulated the proliferation of these cells, the which can be observed by cellular viability greater than 100% when compared to the control (Fig. 3). Lectins are proteins capable of binding to carbohydrates present on the cell surface and this interaction may induce different cellular responses, among them, the stimulation of cell proliferation [33]. The lectin of *Artocarpus lingnanensis* (ALL) stimulated proliferation of T lymphocytes at concentrations ranging from 1.8 to 300.0 µg/mL [34].

The absence of cytotoxicity in normal cells is an important characteristic for a molecule with ability to medical and biotechnological applications. *Moringa oleifera* (cMoL) coagulating lectin presented cytotoxic effects on B16-F10 melanoma cells and was less toxic in normal human fibroblasts, stimulating

further investigations of the anticancer potential and possible therapeutic uses of cMoL [35].

Conclusion

A novel lectin was successfully extracted and purified from the tegument of the seed of *Dypsis decaryi*, being named DdeL. The discovery is linked to the elucidation of its physico-chemical profile and the benefits of its bacteriostatic and antifungal effects, besides the advantage of not presenting cytotoxic potential in the concentrations determined in this research. Thus, it is suggested that the new lectin be the source of new investigations and applications for its immediate use in the clinical segment.

Acknowledgements

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) and by the Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia de PE – FACEPE.

References

- [1] A. F. S, Santos, T. H. Napoleão, R. F. Bezerra, E. V. M. M. Carvalho, M. T. S. Correia, P. M. G. Paiva, L. C. B. B. Coelho, Strategies to Obtain Lectins from Distinct Sources In: L. V. Berhardt Advances (Ed.), Medicine and Biology, Nova Science Publishers, 2013.
- [2] G. R. S. Ferreira, J. de S. Brito, T. F. Procópio, N. D. de L. Santos, B. J. R. C. de Lima, L. C. B. B. Coelho, D. M. do A. F. Navarro, P. M. G. Paiva, T. Soares, M. C. de Moura, T. H. Napoleão, Antimicrobial potential of *Alpinia purpurata* lectin (ApuL): Growth inhibitory action, synergistic effects in combination with antibiotics, and antibiofilm activity. Microbial Pathogenesis 124 (2018) 152–162.
- [3] A. K Gautam, N. Srivastava, D. P. Nagar, S. S. Bhagyawant, Biochemical and functional properties of a lectin purified from the seeds of *Cicer arietinum* L. 3 Biotech. 8 (2018) 272.

- [4] C. Bai, J. Hao, X. Hao, M. Feng, Preparation of *Astragalus membranaceus* lectin and evaluation of its biological function. *Biomedical Reports*. 9 (2018) 345-349.
- [5] J. R. S. L. Camaroti, W. A. de Almeida, B. do R. Belmonte, A. P. S. de Oliveira, T. de A. Lima, M. R. A. Ferreira, P. M. G. Paiva, L. A. L. Soares, E. V. Pontual, T. H. Napoleão, *Sitophilus zeamais* adults have survival and nutrition affected by *Schinus terebinthifolius* leaf extract and its lectin (SteLL). *Industrial Crops & Products* 116 (2018) 81–89.
- [6] M. L. S. de Medeiros, M. C. de Moura, T. H. Napoleão, P. M. G. Paiva, L. C. B. B. Coelho, A. C. D. S. Bezerra, M. D. C. da Silva, Nematicidal activity of a water soluble lectin from seeds of *Moringa oleífera*, *International Journal of Biological Macromolecules*. 108 (2018) 782–789.
- [7] A. de S. Carvalho, M. V. da Silva, F. S. Gomes, P. M. G. Paiva, C. B. Malafaia, T. D. da Silva, A. F. de M. Vaz, A. G. da Silva, I. R. de S. Arruda, T. H. Napoleão, M. das G. Carneiro-da-Cunha, M. T. dos S. Correia, Purification, characterization and antibacterial potential of a lectin isolated from *Apuleia leiocarpa* seeds. *International Journal of Biological Macromolecules* 75 (2015) 402–408.
- [8] T. F. Procópio, L. L. de S. Patriota, M. C. de Moura, P. M. da Silva, A. P. S. de Oliveira, L. V. do N. Carvalho, T. de A. Lima, T. Soares, T. D. da Silva, L. C. B. B. Coelho, M. G. da R. Pitta, M. J. B. de M. Rêgo, R. C. B. Q. de 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. *International Journal of Biological Macromolecules* 98 (2017) 419–429.
- [9] Q. Yao, C. Wu, P. Luo, X. Xiang, J. Liu, L. Mou. A new chitin-binding lectin from rhizome of *Setcreasea purpurea* with antifungal, antiviral and apoptosis-inducing activities. *Process Biochemistry* 45 (2010) 1477–1485.
- [10] R. B. Costa, P. T. Campana, F. S. Chambergo, T. H. Napoleão, P. M. G. Paiva, H. J. V. Pereira, M. L. V. Oliva, F. S. Gomes, Purification and characterization of a lectin with refolding ability from *Genipa americana* bark. *International Journal of Biological Macromolecules* 119 (2018) 517–523.
- [11] A. Wilches-Torres, J. Rojas-Caraballo, E. Sanabria, E. Reyes-Montano, J. L. Fernández-Alonso, A. Varrot, A. Imberty, N. Vega. Purification and biochemical

characterization of a t/tn specific lectin from *Lepechinia bullata* seeds (Lamiaceae). Int J Pharm Pharm Sci 9 (2017) Issue 11 165-174.

[12] M. Sharma, H. Vishwanathreddy, B.R. Sindhura, A.S. Kamalanathan, B. M. Swamy, S. R. Inamdar, Purification, characterization and biological significance of mannosebinding lectin from *Dioscorea bulbifera* bulbils. International Journal of Biological Macromolecules, 102 (2017)1146–1155.

[13] K. B. Bobbili, G. Pohlentz, A. Narahari, K. Sharma, A. Surolia, M. Mormann, M. J. Swamy, *Coccinia indica* agglutinin, a 17 kDa PP2 like phloem lectin: Affinity purification, primary structure and formation of self-assembled filaments. International Journal of Biological Macromolecules 108 (2018) 1227–1236.

[14] K. Thakur, T. Kaur, J. Singh, G. Rabbani, R. H. Khan, R. Hora, M. Kaur. *Sauromatum guttatum* lectin: Spectral studies, lectin-carbohydrate interaction, molecular cloning and in silico analysis. International Journal of Biological Macromolecules 104 (2017) 1267–1279.

[15] S. Naik, R. S. Rawat, S. Khandai, M. Kumar, S. S. Jena, M. A. Vijayalakshmia, S. Kumara, Biochemical characterisation of lectin from Indian hyacinth plant bulbs with potential inhibitory action against human cancer cells. International Journal of Biological Macromolecules 105 (2017) 1349–1356.

[16] J. Dransfield, N. W. Uhl, C. B. Asmussen, W. J. Baker, M. M. Harley, C. E. Lewis. A new phylogenetic classification of the palm family, Arecaceae. KEW BULLETIN 60 (2005) 559–569.

[17] J. W. Horn, J. B. Fisher, P. B. Tomlinson, C. E. Lewis, K. Laubengayer. Evolution of lamina anatomy in the palm family (arecaceae). American Journal of Botany 96(8) 2009 1462–1486.

[18] A. P. Ramos, M. F. Caetano, M. Rocha, S. Belchior, A. Lima. Doenças e pragas que condicionam o uso de palmeiras em espaços verdes. Revista da APH (112) 2013.

[19] F. Bao, P. B. da Luz, S. de P. Sobrinho, L. G. Neves, Morfologia do diásporo e da plântula de *Dypsis decaryi* (Jum.) Beentje & J. Dransf. (Arecaceae). Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas 4 (2010) 3-9.

[20] H. Lorenzi, H. M. de Souza, L. S. C, Cerqueira, J. T. de Medeiros-Costa, N. V. Behr, Palmeiras no Brasil: nativas e exóticas. Nova odessa: Plantarum (2004) 303p.

- [21] M. T. S. Correia, L. C. B. B. Coelho, Purification of a glucose/mannose specific lectin, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* mart. (Camaratu Bean). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 55 (1995) 261–273.
- [22] P. K. Smith, R. I. Krohn, G. T. Hermanson. Measurement of protein using bicinchonic acid. *Anal Biochem* 150 (1985) 76–85.
- [23] CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 26th ed. CLSI supplement M100S. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2016.
- [24] CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard. CLSI document M38-A 2002.
- [25] T. Mossman. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity. *Journal Immunology Methods*, 65 (1983) 55-63.
- [26] N. P. S. Santos, et al. Usnic Acid - Loaded Nanocapsules: An Evaluation of Cytotoxicity. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 15 (2005) 355-361.
- [27] P. M. da Silva, M. C. de Moura, F. S. Gomes, D. da S. Trentin, A. P. S. de Oliveira, G. S. V. de Mello, M. G. da R. Pitta, M. J. B. de M. Rego, L. C. B. B. Coelho, A. J. Macedo, R. C. B. Q. de Figueiredo, P. M. G. Paiva, T. H. Napoleão, PgTeL, the lectin found in *Punica granatum* juice, is an antifungal agente against *Candida albicans* and *Candida krusei*. *International Journal of Biological Macromolecules* 108 (2018) 391–400.
- [28] H. C. Silva, L. da S. Pinto, E. H. Teixeira, K. S. Nascimento, B. S. Cavada, A. L. C. Silva, BUL: A novel lectin from *Bauhinia unguolata* L. seeds with fungistatic and antiproliferative activities. *Process Biochemistry* 49 (2014) 203–209.
- [29] R. R. e Lacerda, E. S. do Nascimento, J. T. J. G. de Lacerda, L. da S. Pinto, C. R. M. M. Bezerra, I. R. Pinto, S. M. P. Filho, V. de P. T. Pinto, G. C. Filho, C. A. de A. Gadelha, T. S. Gadelha, Lectin from seeds of a Brazilian lima bean variety (*Phaseolus lunatus* L.var. cascavel) presents antioxidant, antitumour and gastroprotectiveactivities. *International Journal of Biological Macromolecules*, 95 (2017) 1072–1081.
- [30] D. A. Araripe, V. R. Pinto-Junior, A. H. B. Neco, M. Q. Santiago, V. J. S. Osterne, A. F. Pires, C. F. Lossio, M. G. Q. Martins, J. L. A. Correia, R. G.

Benevides, R. B. Leal, A. M. S. Assreuy, K. S. Nascimento, B. S. Cavada, Partial characterization and immobilization in CNBr-activated Sepharose of a native lectin from *Platypodium elegans* seeds (PELa) and comparative study of edematogenic effect with the recombinant form. *International Journal of Biological Macromolecules*, 102 (2017) 323–330.

[31] R. M. P. B. Costa, A. F. M. Vaz, M. L. V. Oliva, L. C. B. B. Coelho, M. T. S. Correia, M. G. Carneiro-da-Cunha, A new mistletoe *Phthirusa pyrifolia* leaf lectin with antimicrobial properties. *Process Biochemistry* 45 (2010) 526–533.

[32] J. Wu, J. Wang, S. Wang, P. Rao, Lunatin, a novel lectin with antifungal and antiproliferative bioactivities from *Phaseolus lunatus* billb. *International Journal of Biological Macromolecules* 89 (2016) 717–724.

[33] E. V. M. M. Carvalho, W. F. Oliveira, L. C. B. B. Coelho, M. T. S. Correia, Lectins as mitosis stimulating factors: Briefly reviewed. *Life Sciences* 207 (2018) 152–157.

[34] B. Cui, L. Li, Q. Zeng, F. Lin, L. Yin, L. Liao, M. Huang, J. Wang, A novel lectin from *Artocarpus lingnanensis* induces proliferation and Th1/Th2 cytokine secretion through CD45 signaling pathway in human T lymphocytes. *J Nat Med* (2017) DOI 10.1007/s11418-017-1073-x.

[35] L. de A. Luz, F. A. Rossato, R. A. P. e Costa, T. H. Napoleão, P. M. G. Paiva, L. C. B. B. Coelho. Cytotoxicity of the coagulant *Moringa oleifera* lectin (cMoL) to B16-F10 melanoma cells. *Toxicology in Vitro*, 44 (2017) 94-99.

Highlights

- ✓ Biological implications of proteins may be elucidated under radiation assays.
- ✓ Lectin may be partial affected by low doses of carbohydrates.
- ✓ DdeL is a thermostable lectin.

Figures

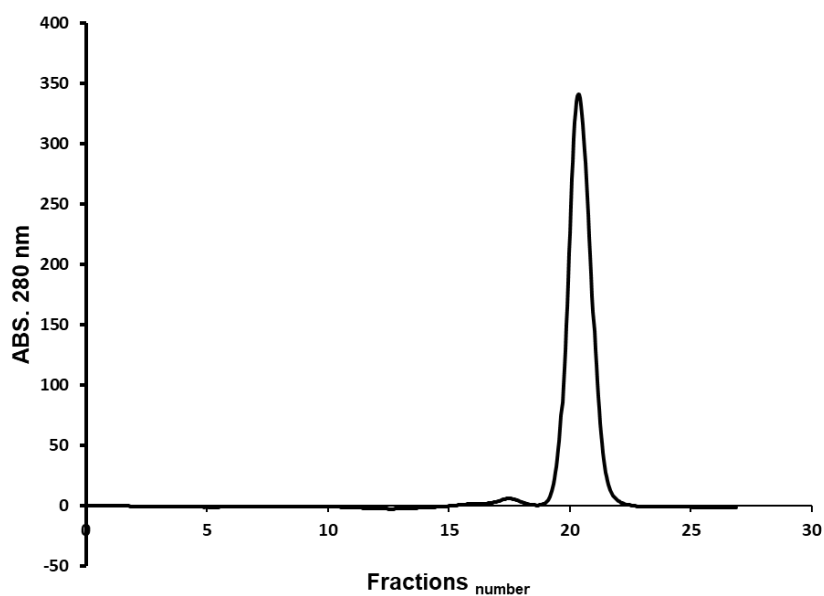


Fig. 1. DdeL chromatographic profile on Superdex G-75 molecular exclusion chromatography. AHE: 1312.82.

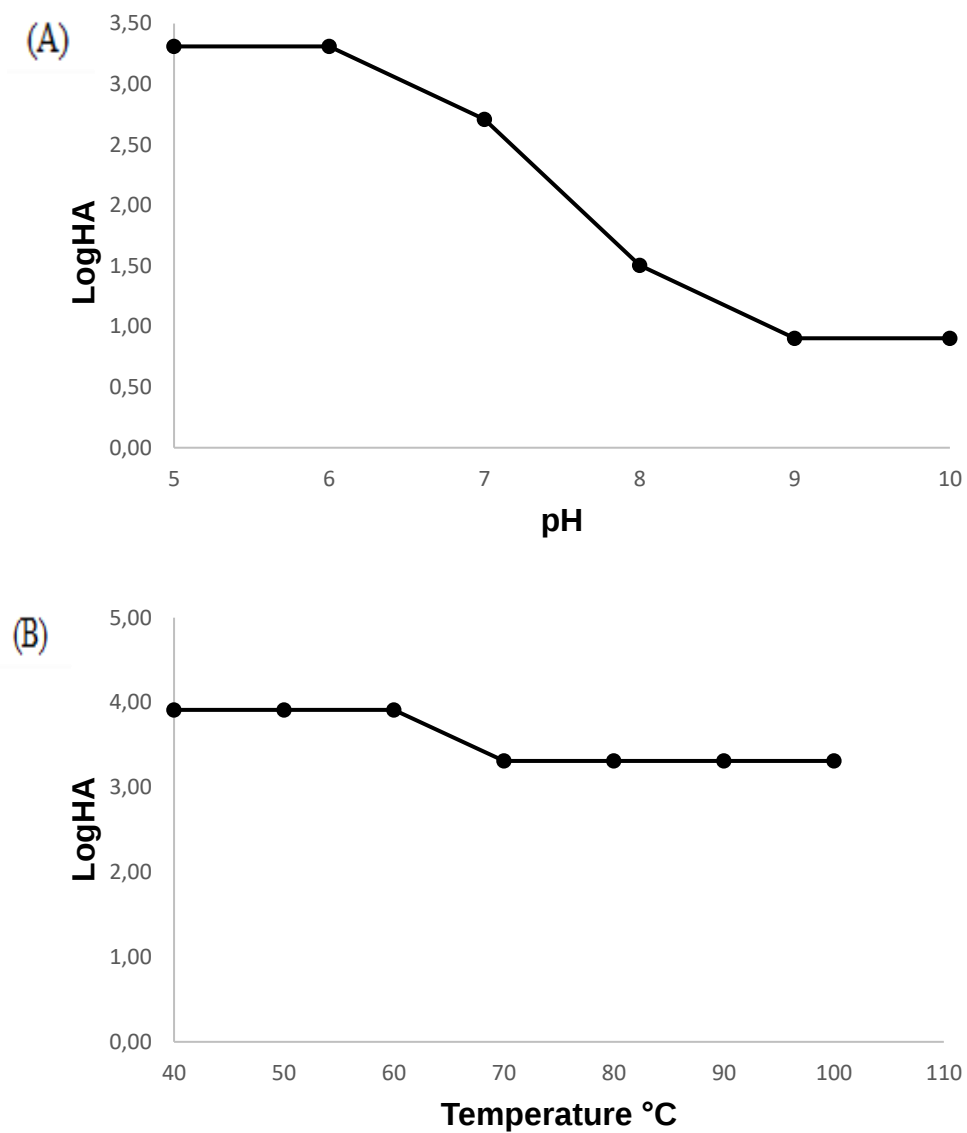


Fig. 2. (A) Effect of pH on the hemagglutinating activity (HA) of DdeL (AH). (B) Effect of temperature on the HA of DdeL.

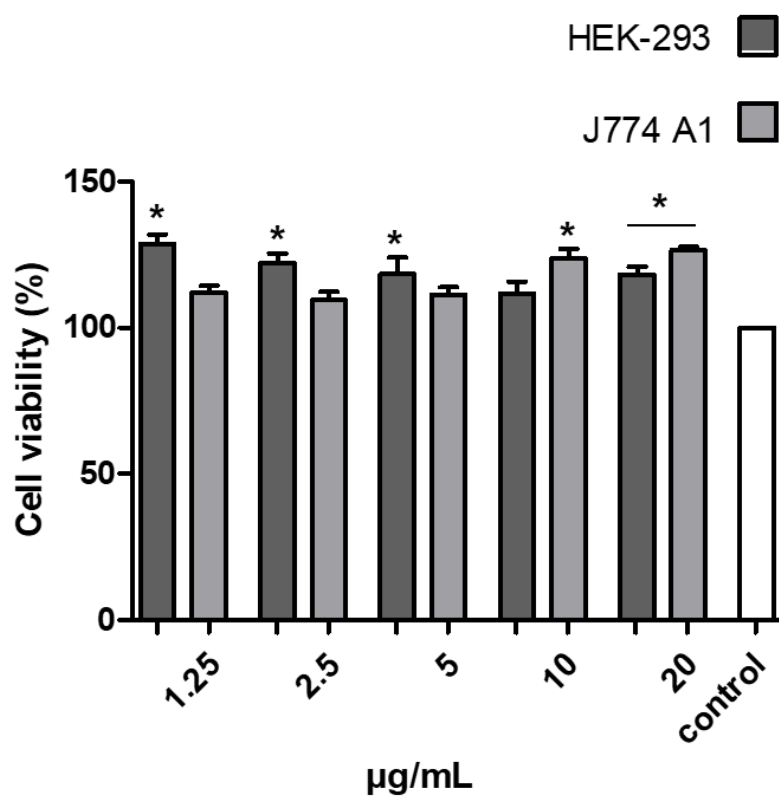


Fig. 3. Cell viability of DdeL in HEK-293 and J774.A1. Statistical differences with control were determined by ANOVA followed by Bonferroni, * $P < 0.05$. Each value determines the mean $\pm$ SD of three independent experiments. Each experiment in quadruplicate.

Tables

Table 1. Extracts from the seeds of *D. decaryi*, their protein dosages and hemagglutinating activity total and specific.

Sample	Protein (mg/mL)	HA	SHA (HA/mg)
Bark	15.45	2048	132.55
Tegument	41.79	8192	196.03
Endosperm	1.90	0	0

HA: hemagglutinating activity; SHA: specific hemagglutinating activity.

Table 2. Summary of purification of the lectin from the tegument of seed *D. decaryi* (DdeL).

Sample	Volume (mL)	Protein (mg/mL)	Total activity (HA)	SHA (HA/mg)	Purification factor	Recovery (%)
Crude extract	200	41.79	8192	196.03	1.00	100
Precipitate	2	4.07	2048	503.61	2.57	9.57
DdeL	20	0.20	256	1312.82	6.70	0.47

HA: hemagglutinating activity; SHA: specific hemagglutinating activity.

Table 3. Hemagglutinating activity of DdeL according to blood type.

Blood type	Hemagglutinating activity (HA)
A ⁺	512
B ⁺	512
AB ⁺	1024
O ⁺	2048
Rabbit	2048

Table 4. Inhibition of DdeL by different carbohydrates and glycoproteins.

Carbohydrates:	INHIBITION
Ramnose	NI
Arabinose	NI
Fructose	NI
Sucrose	NI
Glucose	NI
Galactose	NI
Raffinose	NI
Glycoproteins:	
Lactoferrin	-
Azoalbumin	100%
Azocasein	100%
Lysozyme	-
Albumin	100%

NI: no inhibition.

Table 5. Antibacterial activity of DdeL.

	Lectin concentration range 0 – 2000 µg/mL	
	MIC	MBC
	(µg/mL)	
▪ <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	1500	> 1500
▪ <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	1500	> 1500
▪ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	1500	> 1500
▪ <i>Providencia stuartii</i> clinical isolate	750	> 1500
▪ ESBL clinical isolate	1500	> 1500
▪ <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	750	> 1500
▪ MRSA ATCC 33591	1500	> 1500
▪ <i>Streptococcus mutans</i> clinical isolate	1500	> 1500
▪ <i>Enterococcus faecalis</i> clinical isolate	1500	> 1500

MIC: Minimum Inhibitory Concentration; MBC: Minimum Bactericidal Concentration; ATCC: American Type Culture Collection; ESBL: Extended spectrum beta-lactamase producing enterobacteria; MRSA: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

Table 6. Antifungal activity of DdeL and extract of the tegument of seeds of *D. decaryi*.

Microorganism	MIC ₅₀ µg/mL		MIC ₁₀₀ µg/mL	
	EXTRACT	DdeL	EXTRACT	DdeL
	2.6 - 1325 µg/mL	0.03 – 16.5 µg/mL	2.6 - 1325 µg/mL	0.03 – 16.5 µg/mL
<i>Sporotrichum schenckii</i> URM 7968	5.18	0.52	82.81	-
<i>Sporotrichum schenckii</i> URM 7969	5.18	0.52	20.7	-
<i>Sporotrichum schenckii</i> URM 7971	5.18	0.26	10.35	-
<i>Candida albicans</i> URM 6401	20.7	2.06	1325	-
<i>Candida albicans</i> URM 4127	2.59	2.06	1325	-
<i>Candida albicans</i> URM 6400	2.59	2.06	662.5	-

MIC₅₀: Minimum Inhibitory Concentration able to inhibit 50% of the microorganism; MIC₁₀₀: Minimum Inhibitory Concentration able to inhibit 100% of microorganism.

CAPÍTULO II

Artigo intitulado “Análise fitoquímica do extrato do tegumento de sementes de *Dypsis decaryi*, potencial antioxidante e atividade carrapaticida frente a *Dermacentor nitens*”
a ser submetido à revista:



Fator de impacto: **1.442**

Análise fitoquímica do extrato do tegumento de sementes de *Dypsís decaryi*, potencial antioxidante e atividade carrapaticida frente a *Dermacentor nitens*

Michelly E.L. M. Torres¹, Romero M. P. B. Costa¹, Cynthia O. Nascimento¹,
Ana L.F. Porto^{1,2*}

¹Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal- UFRPE - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos – CEP 52171-900 – Recife – PE – Brasil. *Autor para correspondência: analuporto@yahoo.com.br

²LIKA-UFPE - Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Av. Prof. Moraes Lins do Rego, s/n, 50670-901, Recife, PE, Brasil.

RESUMO

Este trabalho objetivou analisar os compostos fitoquímicos presentes no extrato aquoso do tegumento de sementes de *D. decaryi*, avaliar a capacidade sequestradora do radical DPPH e a atividade carrapaticida do extrato aquoso, precipitado proteico e sobrenadante cetônico. O extrato aquoso de *D. decaryi* indicou a presença de diferentes grupos de metabólitos secundários, sugerindo biodisponibilidade de saponinas, taninos e flavonoides. O extrato aquoso do tegumento das sementes de *D. decaryi*, avaliado em diferentes concentrações, apresentou capacidade do consumo de DPPH. O comportamento cinético da reação do DPPH com as diferentes concentrações do extrato, onde as três concentrações maiores (1,73 mg/ml; 0,87 mg/ml; 0,35 mg/ml) atingiram o consumo máximo com dois minutos da reação. No bioensaio carrapaticida frente a *D. nitens*, o controle positivo Cipermetrina 15%, foi ineficiente, apresentando 98,81% de resistência. O extrato bruto na concentração de 17,3 mg/ml também não foi eficiente (100% de resistência). A concentração do 1,73 mg/ml apresentou 19,23% de eficiência. O precipitado proteico na concentração de 1,25 mg/ml obteve maior eficiência com 71,65%. O sobrenadante cetônico apresentou 38,62% de eficiência. Este é o primeiro relato sobre de perfil fitoquímico de sementes de *D. decaryi*, do potencial sequestrador de radical DPPH e a atividade carrapaticida de compostos presentes nesta planta.

Palavras-chaves: *D. decaryi*, fitoquímico, antioxidante, *D. nitens*.

1. Introdução

A palmeira ornamental *Dypsis decaryi*, conhecida popularmente como palmeira triangular devido a forma como as suas folhas estão dispostas, pertence à família Arecaceae (Baker et al., 2011). Nesta vasta família estão inseridas palmeiras de importância econômica, alimentícia, medicinal e ornamental. Por exemplo, o coco (*Cocos nucifera*), uma palmeira cultivada que apresenta valor nutricional e medicinal, pois sua polpa e água apresentam propriedades medicinais como antibacteriana, antifúngica, antiviral, antiparasitária, antioxidante, hipoglicemiante, hepatoprotetiva e munoestimulante (Debmandal; Mandal, 2011). Em relação a espécie *D. decaryi*, não há na literatura relatos sobre sua composição fitoquímica, como também, de suas atividades biológicas. O conhecimento dos compostos presentes nesta planta pode impulsionar a descoberta de suas atividades biológicas e possíveis aplicações na medicina humana ou animal.

As plantas podem sintetizar diversos metabólitos secundários, utilizados na sua defesa contra predadores ou patógenos, que são responsáveis por atividades biológicas e podem ser importantes recursos terapêuticos devido aos seus efeitos biológicos sobre a saúde do ser humano (Barcelos et al., 2017; Campos et al., 2016; Pereira; Cardoso, 2012; Tôrres, 2005).

Os metabólitos secundários encontrados em plantas se agrupam em quatro classes principais: terpenos, compostos fenólicos, glicosídeos e alcaloides (García; Carril, 2009). Dentre esses, encontram-se compostos com propriedades antioxidantes, como os fenólicos. A polpa de açaí, também pertencente à família Arecaceae, apresentou elevado conteúdo de compostos fenólicos totais e antocianinas totais, como também ação anti radical livre maior em relação a outros tipos de frutas abundantes na região amazônica (Silva et al., 2017).

Extratos vegetais, aquosos ou orgânicos, também foram avaliados quanto a atividade carrapaticida, no intuito de encontrar uma alternativa de controle para estes ectoparasitas quem vêm desenvolvendo resistência aos carrapaticidas químicos utilizados indiscriminadamente. O extrato hidroalcoólico de eucalipto, *Eucalyptus dunnii*, foi avaliado quanto a atividade carrapaticida frente ao

carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e apresentou eficácia de 73,6% no controle deste ectoparasita.

O objetivo deste trabalho foi analisar o perfil fitoquímico do extrato aquoso do tegumento das sementes de *D. decaryi*, avaliar o potencial sequestrador do radical DPPH e a atividade carrapaticida deste extrato, precipitado proteico e sobrenadante acetônico frente ao carrapato-da-orelha-do-cavalo *D. nitens*.

2. Material e Métodos

2.1 Obtenção do material vegetal, extrato e precipitado protéico

Os frutos de *D. decaryi* foram coletados na cidade de Recife-PE. Os frutos foram lavados e secos a 50 °C durante cinco dias, em seguida, retirou-se as cascas para obtenção das sementes. O extrato do tegumento das sementes foi obtido através da agitação em agitador mecânico de hélices, até total retirada do tegumento sem trituração do endosperma, utilizando NaCl 0,15 M. A solubilização de proteínas foi realizada com acetona a 70% como solvente. Em seguida, esta solução foi centrifugada a 3500 rpm durante 20 min, o sobrenadante coletado e o precipitado protéico ressuspendido com NaCl 0,15 M.

2.2 Teor de fenóis totais

Os fenóis totais foram determinados de acordo com o método descrito por Julkunen-Titto (1985). Uma alíquota (50 µL) do extrato aquoso ou solução padrão foi misturada com 1 mL de H₂O e 500 µL de reagente de fenol Folin – Ciocalteu. Em seguida, 2,5 mL de solução Na₂CO₃ a 20% foram adicionados à mistura seguida por incubação à temperatura ambiente no escuro durante 20 min. A absorbância foi medida a 735 nm (espectrofotômetro Spectro UV-vis, Labomed Inc., Culver City, CA). O ácido gálico foi usado para preparar uma curva padrão (0,025-0,6 mg / mL; $y = 1,3058x + 0,065$; $r^2 = 0,9993$; y é a absorbância; x é a concentração da solução). Os resultados foram expressos como equivalentes em mg de ácido gálico (EAG)/g de extrato. O teor de fenóis totais (FT) foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra a curva de calibração construída com ácido gálico e expressos como mg de EAG (equivalentes de ácido gálico) por g de extrato.

2.3 Teor de flavonoides totais

O conteúdo de flavonoides foi determinado de acordo com o método de Zhishen, Mengcheng e Jianming (1999). Uma alíquota (250 μ L) do extrato aquoso foi misturada com 1,25 mL de H₂O e 75 μ L de solução de NaNO₂ a 5%. Após 6 min, foram adicionados 150 μ L de solução de AlCl₃ a 10%. Após 5 min, adicionou-se 0,5 mL de solução de NaOH 1 M e depois completou-se o volume total até 2,5 mL com H₂O. Após a mistura completa da solução, a absorbância foi determinada a 510 nm. Catequina foi utilizada para construir a curva padrão (0,05-0,5 mg/mL; $y = 0,79 \times 0,048$; $r^2 = 0,9997$; y é a absorbância; x é a concentração da solução). Os resultados foram expressos como mg equivalentes de catequina (EC)/g de extrato.

2.4 Teor de tanino condensado

Taninos condensados foram determinados de acordo com o método de Julkunen-Titto (1985). Uma alíquota (50 μ L) do extrato aquoso foi misturada com 1,5 mL de vanilina a 4% (preparada com MeOH) e, em seguida, 750 μ L de HCl concentrado foram adicionados. A solução foi incubada à temperatura ambiente no escuro durante 20 min. A absorbância foi lida a 500 nm. Catequina foi usada para fazer a curva padrão (0,05-1 mg/mL; $y = 0,801x + 0,0555$; $r^2 = 0,9992$; y é a absorbância; x é a concentração da solução). Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido tânico (AT)/g de extrato.

2.5 Teor total de saponina

O teor de saponina foi medido conforme descrito por Vuong et al. (2013). A saponina foi utilizada como padrão de referência com um teor de saponina expresso em mg de saponina/g de extrato.

2.6 Atividade sequestradora de radicais DPPH[•]

A atividade antirradicalar foi determinada segundo a metodologia descrita por Silva et al. (2006) com modificações. Neste método ocorre a doação de hidrogênio para o radical DPPH[•] (coloração púrpura) que se reduz formando o DPPH-H (hidrazina) de coloração amarela. O extrato aquoso foi avaliado em diferentes concentrações (1,73 mg/mL; 0,87 mg/mL; 0,35 mg/mL; 0,17 mg/mL).

A solução de DPPH[•] foi preparada na concentração de 23,6 µg/mL em EtOH. Uma alíquota de 25 µL de cada concentração foi colocada em microplaca de 96 poços, posteriormente, adicionou-se 200 µL de solução de DPPH[•], usando como branco EtOH. A microplaca foi colocada em leitor espectrofotômetro Elisa UV-Vis a 490 nm, sendo realizadas leituras a cada 5 min durante 30 min. Como controle positivo foi empregado o ácido ascórbico. A porcentagem de DPPH remanescente (% DPPHREM) foi calculada de acordo para Brand-Williams et al. (1995), como se segue:

$$\% \text{ DPPHREM} = [\text{DPPH}]_T / [\text{DPPH}]_{T_0} \times 100$$

onde T é o momento em que a absorbância foi determinada (1 a 30 minutos) e T₀ é a absorbância inicial.

2.7 Espécie e coleta dos carrapatos

Os carrapatos da espécie *D. nitens* foram coletados manualmente de um cavalo infestado, o qual estava livre de tratamento há mais de 45 dias, em uma propriedade situada no município de Jaboatão dos Guararapes-PE. As fêmeas ingurgitadas foram acondicionadas em caixa plástica perfurada que favorecia a ventilação para o transporte até o Laboratório de Tecnologia de Bioativos da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE. As fêmeas foram selecionadas de acordo com a sua integridade, motilidade e ingurgitamento máximo. Em seguida, foram lavadas em água destilada, secas em papel absorvente, separadas em grupos homogêneos de 10 fêmeas cada um e pesadas em balança analítica.

2.8 Bioensaio carrapaticida frente a *D. nitens*

O bioensaio carrapaticida foi realizado de acordo com o teste de imersão de adultos descrito por Drummond et al. (1973). O extrato do tegumento foi avaliado nas concentrações: 17,3 mg/mL, 3,46 mg/mL e 1,73 mg/mL. O precipitado proteico nas concentrações: 1,25 mg/mL; 0,625 mg/mL e 0,312 mg/mL. Além destes, também foi avaliado o sobrenadante acetônico. Como controle positivo foi utilizado Cipermetrina 15%, na dose recomendada pelo

fabricante, e o controle negativo foi utilizado água destilada. As fêmeas ingurgitadas foram imersas em 10 ml do respectivo tratamento durante 5 minutos, em seguida, foram secas em papel absorvente e colocadas em placas de petri, mantidas à temperatura ambiente com umidade > 80%. Após três dias, iniciou-se a postura dos ovos, a qual teve duração de 12 dias. Ao término da postura, os ovos foram pesados e transferidos para tubos de vidro tampados com algodão até a eclosão dos ovos. Os tubos com os ovos foram mantidos nas mesmas condições descritas anteriormente. A eclosão dos ovos iniciou após 12 dias e no 17º dia, a porcentagem de eclosão foi estimada, visualmente, com o auxílio de um estereomicroscópio, através da comparação do número de ovos não eclodidos e a visualização das larvas. Os dados obtidos foram utilizados para calcular os seguintes parâmetros: Índice de produção de ovos (IPO) = $[(\text{peso dos ovos} / \text{peso das fêmeas}) \times 100]$ (Bennett, 1974); Índice de eficiência reprodutiva (IER) = $[(\text{peso do ovo (g)} \times \% \text{ de eclosão} / \text{peso da fêmea (g)}) \times 20.000]$; Eficácia de produto (EP) = $[(\text{IER grupo controle negativo} - \text{IER grupo tratado} / \text{IER grupo controle negativo} \times 100)]$ (Drummond et al., 1973). Foi considerada como eficácia das amostras o valor mínimo de 95%, conforme legislação para carrapaticidas no país (Brasil, 1990).

3. Resultados e Discussões

3.1 Análise fitoquímica do extrato aquoso do tegumento de sementes de *D. decaryi*

Os resultados da análise fitoquímica são relevantes para avaliar e identificar grupos de metabólitos secundários, os quais podem apresentar propriedades medicinais.

O extrato aquoso de *D. decaryi* indicou a presença de diferentes grupos de metabólitos secundários e alguns constituintes, sugerindo biodisponibilidade de saponinas, taninos e flavonoides (Tabela 1), sendo observado o alto teor de taninos (76,8g AT/g de extrato) presentes no extrato. Tal presença também foi confirmada através de coloração avermelhada da amostra, caracterizando a presença de taninos. A presença dos constituintes químicos referidos para esta espécie permite inferir que futuras indicações para usos medicinais poderão ser

descritas na literatura. Estudos fitoquímicos de plantas da família Arecaceae são encontrados na literatura. Por exemplo, a análise fitoquímica do extrato da polpa de *Cocos nucifera* revelou a presença de terpenóides, taninos, esteroides e glicosídeos; a atividade antimalárica confirmou a aplicação do coco na medicina popular no tratamento da malária tem base na sua composição farmacológica (Al-Adhroeya et al., 2011). Silva et al. (2017) caracterizaram a polpa de açaí (palmeira tropical *Euterpe oleracea*) em relação à composição nutricional e funcional, através da quantificação de compostos fenólicos totais, antocianinas totais e determinação da capacidade antioxidante total. Estes autores relataram que a polpa de açaí apresentou elevado conteúdo de compostos fenólicos totais (346,14 mg de AGE/100g) e antocianinas totais (73,54 mg/100g), podendo ser considerada fonte destes fitoquímicos.

A escassez de resultados frente ao uso das sementes de *D. decaryi*, vislumbra uma possível ferramenta biotecnológica na área medicinal através do uso dessa espécie, ainda pouco estudada na comunidade científica.

Tabela 1. Conteúdo de fenólicos, flavonóides, taninos e saponinas em extrato aquoso de *Dypsis decaryi*

EXTRATO AQUOSO	Conteúdo			
	Fenóis Totais	Flavonóides	Taninos	Saponinas
	mg EAG/g extrato	Totais mg EC/g extrato	condensados mg TA/g extrato	mg Saponina/g
	164.04 ± 0.08	21.33 ± 0.32	76.08 ± 0.02	1.08 ± 0.02

3.2 Atividade sequestradora de radicais DPPH

O DPPH é um método rápido, prático e com boa estabilidade, aplicado para determinar a capacidade antioxidante de um composto em sequestrar radicais livres (Sucupira et al., 2012). O extrato aquoso do tegumento das sementes de *D. decaryi*, avaliado em diferentes concentrações, apresentou capacidade do consumo de DPPH, tendo em vista as alterações da coloração e das reduzidas absorbâncias em relação ao controle negativo.

O comportamento cinético da reação do DPPH com as diferentes concentrações do extrato é mostrado na Figura 2, o qual pode ser observado

pela curva de dose-resposta em relação ao decréscimo da porcentagem remanescente de DPPH (% DPPHREM) em função do tempo (min). As três concentrações maiores (1,73 mg/mL; 0,87 mg/mL e 0,35 mg/mL) atingiram o consumo máximo com dois minutos da reação, e o decaimento do DPPH foi se estabilizando rapidamente. A maior concentração do extrato (1,73 mg/mL) sequestrou em torno de 100% do radical com dois minutos da reação. Na menor concentração, praticamente não houve sequestro de DPPH.

A atividade antioxidante de extratos vegetais tem sido atribuída a compostos fitoquímicos como os flavonoides e as saponinas (Nascimento et al., 2011). Os flavonóides atraíram grande interesse como potenciais agentes terapêuticos contra uma ampla variedade de doenças, a maioria das quais envolve danos causados pelo excesso de radicais livres (Costa et al., 2015).

A polpa do açaí além de apresentar elevado conteúdo de compostos fenólicos totais e antocianinas, a análise da capacidade antioxidante mostrou que a ação anti radical livre deste produto é maior em relação a outros tipos de frutas abundantes na região amazônica (Silva et al., 2017). Os extratos metanólicos dos frutos das palmeiras “babaçu” (*Orbignia speciose*) e “buriti” (*Mauritia flexuosa*) apresentaram compostos fenólicos, como flavonoides e atividades antioxidantes significativas, demonstrando que tais frutos são fontes de substâncias antioxidantes que podem ser úteis no desenvolvimento de novos produtos para prevenir doenças associadas ao estresse oxidativo (Nobre et al., 2018).

O extrato aquoso do tegumento da semente de *D. decaryi* também apresentou altas concentrações de compostos fenólicos e taninos condensados, o que nos permite inferir que a atividade sequestradora de DPPH encontrada neste extrato pode estar relacionada à presença destes compostos.

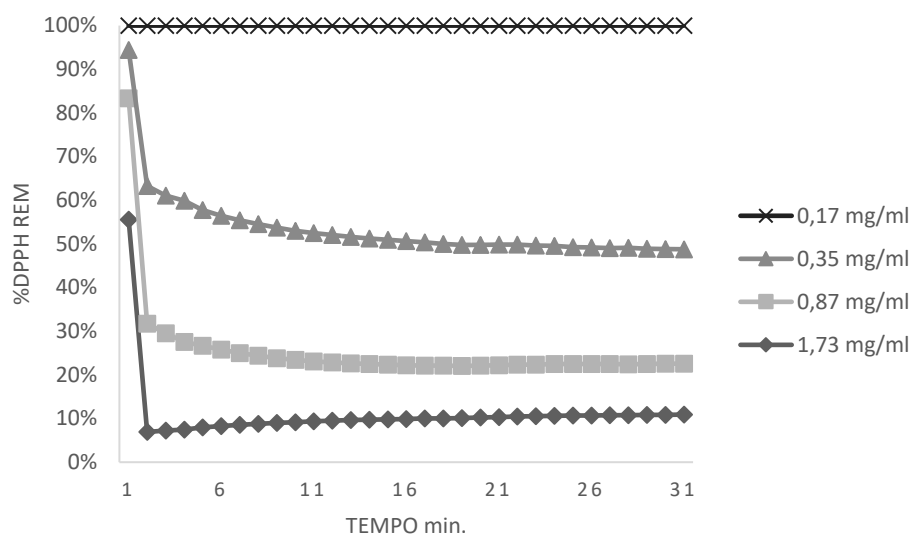


Figura 1. Efeito de diferentes concentrações do extrato aquoso na %DPPH remanescente em função do tempo.

3.3 Bioensaio carrapaticida do extrato e precipitado proteico frente ao carrapato *D. nitens*

A Tabela 2 mostra os resultados do bioensaio carrapaticida do extrato aquoso, precipitado proteico e sobrenadante cetônico. O controle positivo Cipermetrina 15%, embora recomendado para o controle de *D. nitens*, foi ineficiente, pois, os carrapatos apresentaram resistência de 98,81% a este carrapaticida. O extrato bruto também não foi eficiente e os carrapatos apresentaram 100% de resistência às concentrações mais elevadas do extrato. A concentração 3,46 mg/ml do extrato apresentou 19,23% de eficiência, embora baixa, foi superior ao cipermetrina com 1,19% de eficiência.

Em relação ao precipitado proteico, a concentração de 1,25 mg/ml obteve maior eficiência com 71,65%. Um carrapaticida para ser eficaz deve apresentar eficiência >95%, no entanto, a eficiência de 71,65% apresentada pela concentração de 1,25 mg/ml de proteínas é satisfatória, considerando a sua fonte natural e a baixa concentração, por isso, concentrações maiores de proteínas obtidas a partir do extrato do tegumento de sementes de *D. decaryi* podem ser avaliadas no intuito de aumentar esta eficiência.

O sobrenadante cetônico foi avaliado, pois o mesmo concentrou os demais metabólitos presentes no extrato aquoso do tegumento das sementes de

D. decaryi. Este sobrenadante cetônico apresentou 38,62% de eficiência. Em suma, estes resultados sugerem que a atividade presente no extrato a 3,46 mg/ml deve-se em parte pela presença de proteínas, pois a eficiência aumentou quando estas proteínas foram concentradas na precipitação com acetona. Na Figura 2, pode-se observar o efeito do precipitado proteico a 1,25 mg/ml na eclodibilidade das larvas apresentando ovos não eclodidos, em comparação ao controle negativo e Cipermetrina 15% quase que totalmente eclodidos.

Extratos de diversas plantas foram avaliados quanto a atividade carrapaticida, por exemplo, os extratos obtidos com hexano, acetato de etila e etanol das folhas de *Ocotea aciphylla* foram investigados por meio de testes de imersão com fêmeas ingurgitadas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e larvas. Todos os extratos mostraram-se eficazes contra os diferentes estágios do carrapato, no entanto, o extrato etanólico na concentração mais alta (50 mg/mL) foi o mais ativo (mais de 90% de eficácia em ambos os ensaios) (Conceição et al., 2017).

A atividade carrapaticida do extrato metanólico de *Acmella oleracea* e spilanthol foi avaliada frente a fêmeas ingurgitadas e larvas de *R. (Boophilus) microplus* e a larvas de *D. nitens*. O extrato metanólico de *A. oleracea* e as frações de spilanthol demonstraram eficácia *in vitro* contra larvas e fêmeas ingurgitadas de *R. (Boophilus) microplus* e larvas de *D. nitens*, demonstrando o potencial dessa planta no controle de carrapatos (Cruz et al., 2016).

O extrato proteico de proteínas de defesa induzidas por injúrias obtido de folhas de *Leucaena leucocephala* foi avaliado quanto ao seu potencial para de controle de carrapatos, através do teste em fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus*, apresentou eficácia de 56,3%. Os autores relacionaram o efeito carrapaticida do extrato proteico obtido de folhas injuriadas a alta atividade proteásica presente no extrato (Wanderley et al., 2017).

Os resultados obtidos neste trabalho, juntamente com os encontrados na literatura, demonstram a potencialidade de produtos naturais de origem vegetal para o controle alternativo de carrapatos, no entanto, pesquisas futuras devem ser conduzidas para de fato sugerir a utilização destes produtos.

Tabela 2. Atividade carrapaticida do extrato aquoso do tegumento das sementes de *D. decaryi*, precipitado protéico e sobrenadante cetônico frente ao carrapato *D. nitens*.

Amostras	Produção de ovos (%)	Eficiência do produto (%)	Resistência (%)
Controle (-)	41,49		
Cipermetrina 15%	42,47	1,19	98,81
Extrato (17,3 mg/mL)	53,29	0,00	100
Extrato (3,46 mg/mL)	50,55	0,00	100
Extrato (1,73 mg/mL)	33,49	19,23	80,77
Precipitado proteico 1,25 mg	40,52	71,65	28,35
Precipitado proteico 0,625 mg	51,80	0,00	100
Precipitado proteico 0,312 mg	47,05	0,00	100
Sobrenadante cetônico	43,60	38,62	61,38

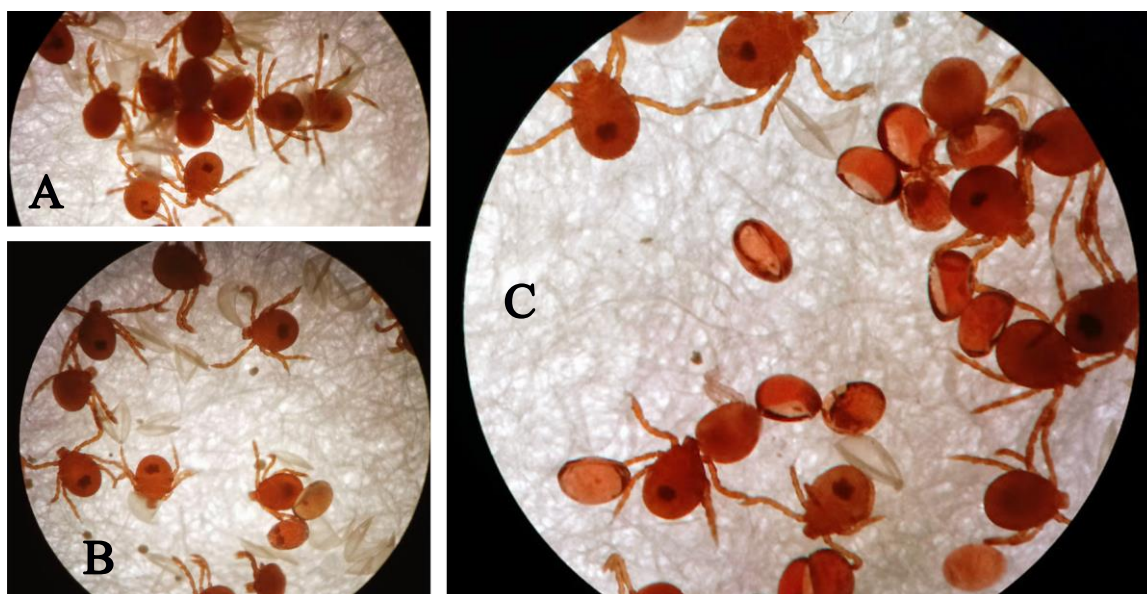


Figura 2. Eclodibilidade de larvas de *D. nitens*. (A) Controle negativo (91,18% de eclosão); (B) Cipermetrina 15% (88,00% de eclosão); (C) Precipitado proteico 1,25 mg/ml (26,47% de eclosão).

Conclusão

Este trabalho trata-se do primeiro relato sobre compostos fitoquímicos presentes em sementes de *D. decaryi*, no qual observamos a presença de compostos fenólicos, flavonoides, taninos condensados e saponinas, onde foi detectado o seu potencial sequestrador de radical DPPH, além da atividade carrapaticida frente a *D. nitens*, demonstrando que *D. decaryi* apresenta potencial para aplicações na medicina humana e animal.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, da Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia de PE – FACEPE e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

Referências

- Al-Adhroey A. H., Nora, Z. M., Al-Mekhlafia, H. M., Amranb, A. A., Mahmud, R. 2011. Evaluation of the use of *Cocos nucifera* as antimalarial remedy in Malaysian folk medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 134, p. 988–991.
- Baker, W. J., Norup, M. V., Clarkson, J. J., Couvreur, T. L. P., Dowe, J. L., Lewis, C. E., Pintau J., Savolainen, V., Wilmot T., Chase, M. W. 2011. Phylogenetic relationships among arecoid palms (Arecaceae: Arecoideae). *Annals of Botany*. v. 108, p. 1417–1432, 2011. *Annals of Botany* 108, pp. 1417–1432.
- Bennett, G. F. 1974. Oviposition of *Boophilus microplus* (CANESTRINI) (ACARIDA: IXODIDAE) I. Influence of tick size on egg production. *Acarologia*, 16 (1), pp. 52-61.
- Barcelos, I. B., Bulian, A. L., Calazans, R. da S. P., Degen, A. N., Alves, L. de O., Sobral, F. de O. S., Salvi, J. De O. 2017. Análise fitoquímica e das atividades citotóxica, antioxidante, e antibacteriana das flores de *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nicholson. *Revista Fitos*, Rio de Janeiro. 11(1), pp. 1-118.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria n.90, de 04 de dezembro de 1989. Normas para produção, controle e utilização de produtos antiparasitários. *Diário Oficial*, 22 jan. 1990, séc. 1, col. 2.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. 1995. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* 28, pp. 25-30.
- Campos, S. C.; Silva, C. G.; Campana, P. R. V.; Almeida, V. L. 2016. Toxicidade de espécies vegetais. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*. 18 (1), pp. 373-382.
- Conceição, R. S., Carneiro, M. M. A. de A., Reis, I. M. A., Branco, A., Vieira, I. J. C., Braz-Filho, R., Botura, M. B. 2017. In vitro acaricide activity of *Ocotea*

- aciphylla* (Nees) Mez. (Lauraceae) extracts and identification of the compounds from the active fractions. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 8, pp. 275–282.
- Costa, R. M. P.B. a, Vaz, A. F. M., Xavier, H. S., Correia, M. T. S., Carneiro-da-Cunha, M. G. 2015. Phytochemical screening of *Phthirusa pyrifolia* leaf extracts: Free-radical scavenging activities and environmental toxicity. *South African Journal of Botany*, 99, pp. 132–137.
- Cruz, P. B., Barbosa, A. F., Zeringóta, V., Meloh, D., Novato, T., Fidelis, Q. C., Fabri, R. L., Carvalho, M. G. de, Sabaa-Srur, A. U. O., Daemon, E., Monteiro, C. M. O. 2016. Acaricidal activity of methanol extract of *Acmella oleracea* L. (Asteraceae) and spilanthal on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology* 228, pp. 137–143.
- DebMandal, M., Mandal, S. 2011. Coconut (*Cocos nucifera* L.: Arecaceae): In health promotion and disease prevention. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. pp. 241-247.
- Drummond R. O., Ernst S. E., Trevino, J. L., Gladn'ey, W. J, Graham, O. H. 1973. *Boophilus annulatu/* and *B. microplus/* Laboratory Tests of Insecticides. *Journal of Economic Entomology*. 66 (1).
- García, A. Á., Carril, E. P. 2009. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*. Serie Fisiología Vegetal. 2 (3), pp. 119-145.
- Julkunen-Titto, R., 1985. Phenolic constituents in the leaves of northern willows: Methods for the analysis of certain phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 33, pp. 213–217.
- Nascimento, J. C., Lage, L. F. O., Camargos, C. R. D., Amaral, J. C., Costa, L. M., Sousa, A. N. de, Oliveira, F. Q. 2011. Antioxidant determination activity by DPPH method and assay for total flavonoids in leaves extracts of *Bauhinia variegata* L. *Rev. Bras. Farm.* 92(4), pp. 327-332.
- Nobre, C., B., Sousa, E. O., Camilo, C. J., Machado, J. F., Silva, J. M. F. L., Filho, J. R., Coutinho, H. D. M., Costa, J. G. M. 2018. Antioxidative effect and phytochemical profile of natural products from the fruits of “babaçu” (*Orbignia speciose*) and “buriti” (*Mauritia flexuosa*). *Food and Chemical Toxicology*, 121, pp. 423–429.
- Pereira, R. J., Cardoso, M. das G. 2012. Vegetable secondary metabolites and antioxidants benefits. *J. Biotec. Biodivers*, 3 (4) pp. 146-152.
- Silva, T. M. S.; Camara, C. A.; Lins, A. C. S.; Filho, J. M. B.; Silva, E. M. S.; Freitas, B. M., Santos, F. de A. R. dos. 2006. Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee *Melipona subnitida* Ducke. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, p. 507–511.
- Silva, A. K. N. da, Beckman, J. C., Rodrigues, A. M. da C., Silva, L. H. M. da. 2017. Avaliação da composição nutricional e capacidade antioxidante de compostos bioativos da polpa de açaí. *R. bras. Tecnol. Agroindustr.* 11 (1) pp. 2205-2216.
- Sucupira, N.R.; Silva, A.B.; Pereira, G.; Costa, J.N. 2012. Métodos para determinação da atividade antioxidante de frutos. *UNOPAR Científica Ciências Biológicas e Saúde*, 14 (4), pp. 263 – 269.
- Tôrres, A. R., Oliveira, R. A. G., Diniz, M. F. F.M., Araújo, E. C. 2005. Estudo sobre o uso de plantas medicinais em crianças hospitalizadas da cidade de

- João Pessoa: riscos e benefícios. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 15 (4), pp.373-380.
- Vuong, Q.V., Hirun, S., Roach, P.D., Bowyer, M.C., Phillips, P.A., Scarlett, C.J., 2013. Effect of extraction conditions on total phenolic compounds and antioxidant activities of *Carica papaya* leaf aqueous extracts. *J. Herb. Med.* 3, pp. 104–111.
- Wanderley, L. F., Batista, K. L. R., Carvalho, J. F. de, Lima, A. da S., Landulfo, G. A., Soares, A. M. dos S., Junior, L. M. C. 2017. The first assessment of the stress inducible defense of *Leucaena leucocephala* with acaricidal potential effect against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Braz. J. Vet. Parasitol.*, 26 (2), pp. 171-176.
- Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W., 1999. The determination of flavonoids contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry* 64, pp. 555–559.

CONCLUSÃO GERAL

Os resultados obtidos nesta tese mostraram a purificação e caracterização de uma nova lectina de sementes de *Dypsis decaryi* (DdeL). DdeL é uma lectina termoresistente, com atividade bacteriostática a bactérias patogênicas, antifúngica a patógenos de humanos e que não apresentou efeitos citotóxicos, sendo uma proteína com potencial para aplicações biotecnológicas. Além disso, a presente tese apresenta a composição fitoquímica do extrato aquoso do tegumento das sementes de *D. decaryi*, onde foi detectada a presença de compostos fenólicos, taninos e saponinas, substâncias que podem está relacionada ao potencial antioxidante detectado através da atividade sequestradora do radical DPPH. A atividade carrapaticida do extrato, precipitado proteico e sobrenadante cetônico foi observada frente ao carrapato *D. nitens*, onde o precipitado proteico apresentou eficiência no controle deste ectoparasita. Estes resultado demonstram o potencial biotecnológico do uso dessa espécie, ainda pouco estudada na comunidade científica, na medicina humana e animal.