

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

ALINE DE SOUZA CARVALHO

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LECTINAS EM SEMENTES DE *Apuleia
leiocarpa* (VOGEL) J.F. MACBRIDE (FABACEAE): POTENCIAL
ANTIMICROBIANO**

Recife

2013

ALINE DE SOUZA CARVALHO

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LECTINAS EM SEMENTES DE *Apuleia
leiocarpa* (VOGEL) J.F. MACBRIDE (FABACEAE): POTENCIAL
ANTIMICROBIANO**

Dissertação apresentada para o cumprimento
parcial das exigências para obtenção do título
de Mestre em Bioquímica e Fisiologia pela
Universidade Federal de Pernambuco

Orientadora: Prof^ª. Dr^a. Maria Tereza dos
Santos Correia

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^a. Márcia Vanusa
da Silva

Recife

2013

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Carvalho, Aline de Souza

Purificação e caracterização de lectinas em sementes de *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J.F. Macbride (Fabaceae): potencial antimicrobiano / Aline de Souza Carvalho.
Recife: O Autor, 2013.

115 f.: il., fig., tab.

Orientadores: Maria Tereza dos Santos Correia, Márcia Vanusa da Silva
Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Pernambuco. Centro
de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia, 2014.
Inclui bibliografia e anexos

1. Lectinas 2. Leguminosa I. Correia, Maria Tereza dos Santos (orient.)
II. Silva, Márcia Vanusa da (coorient.) III. Título.

572.6

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2014-118

ALINE DE SOUZA CARVALHO

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LECTINAS EM SEMENTES DE *Apuleia
leiocarpa* (VOGEL) J.F. MACBRIDE (FABACEAE): POTENCIAL
ANTIMICROBIANO**

Dissertação apresentada para o cumprimento
parcial das exigências para obtenção do título
de Mestre em Bioquímica e Fisiologia pela
Universidade Federal de Pernambuco

Aprovada em: 28/02/2013.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dra. Maria Tereza dos Santos Correia (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dra. Márcia Vanusa da Silva (Membro Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão (Membro Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^o Dr. Alexandre José Macedo (Membro Externo)
Universidade Federal de Rio Grande do Sul

*Dedico este trabalho a todos
que um dia venham beneficiar-se dele
de maneira honesta e digna.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pois é nEle que tenho encontrado vida e razões para vivê-la. É Ele quem tem me dado alegria, esperança e força para seguir em frente. É Ele quem tem me instruído e ensinado o caminho que devo seguir e com Seus olhos tem me guiado (Salmo 32:8).

A meus pais, Cláudio e Eva, pelos valores ensinados, pelo apoio, amor, investimento, paciência e assistência aos longos de todos esses árduos anos de estudo, desafios, esforços e conquistas. Todo empenho de vocês por mim sempre foi visando meu sucesso e felicidade, portanto, todas essas conquistas que tenho obtido também são de vocês.

A meu namorado, Renato, pelo amor, paciência, apoio e compreensão nesta etapa. Obrigada por acreditar em mim, por escolher fazer parte dos meus dias e querer contruir uma história juntos. Através de você Deus tem me ensinado muitas coisas, por isso te considero presente dEle pra mim.

Aos meus amigos fora do contexto acadêmico, principalmente os de Carpina, dos quais me ausentei temporariamente em prol deste trabalho. É sempre muito bom estar com vocês. São bençãos de Deus na minha vida.

Aos vários amigos que ganhei durante este mestrado, em especial à Isabel Renata, que cuida de quem está próximo como uma mãe, dando conselhos e repreensões, se preocupando e se preciso for, até acolhe em sua casa. Sou grata pela grande ajuda, paciência nos experimentos e pela pessoa iluminada que você é! À Priscilla Sales, a óMaricotaô mais querida. Sua alegria é contagiante e sua amizade é preciosa para mim! A Thiago Henrique pela competência, dedicação, prestatividade, amizade e, principalmente, pela humildade admirável. Você é um referencial e um orgulho para todos à sua volta! A Emmanuel Pontual, Francis Soares, Carol Malafaia, Túlio Diego, Marthyna Souza, Fernando Vaz pela competência, prestatividade sempre que precisei, assistência nos experimentos e a muita paciência com minhas dúvidas. À Raiana Apolinário e Mychely Melo pela amizade, competência, prestatividade e beleza inspiradoras de vocês. E aos amigos Alexandre Gomes, Danilo Cavalcanti, Priscila Marcelino, Renata Souza, Carlos, Mary Aranda, Evelyne Figueirôa, Nataly Diniz, Thâmarah Albuquerque, Kézia de Moura, Ana Patrícia de Oliveira, Lidiane Albuquerque, Maiara Moura, Luís Cláudio, Paulo Soares, Clóvis Macedo, que me fizeram companhia nos diversos laboratórios (Glicoproteínas, Biotecnologia, Biologia Molecular, Produtos Naturais), deixaram o dia a dia mais leve e participaram nessa caminhada.

À minha orientadora Dra. Maria Tereza dos Santos Correia e co-orientadora Dra. Márcia Vanusa da Silva, por me acolherem quando precisei e por confiarem em mim. Vocês são exemplo de competência, humanidade, humildade, classe e elegância. Muito obrigada por tudo!!!

Aos funcionários do departamento de bioquímica, Djalma, Ademar, João, Miron e Dona Helena.

Ao CNPq, FACEPE, CAPES e UFPE pelo auxílio financeiro e incentivo à pesquisa.

*Ó Há pessoas que desejam saber só por saber,
e isso é curiosidade;
outras, para alcançarem fama,
e isso é vaidade;
outras, para enriquecerem com a sua ciência,
e isso é um negócio torpe;
outras, para serem edificadas,
e isso é prudência;
outras, para edificarem os outros,
e isso é caridade.ô*

Santo Agostinho de Hipona

RESUMO

Apuleia leiocarpa (Voguel) J. F. Macbride, uma árvore com grande valor na indústria madeireira, é uma leguminosa (Fabaceae) encontrada na Caatinga. Lectinas são proteínas capazes de reconhecer e se ligar a carboidratos e glicoconjugados de acordo com sua especificidade e, por isso, têm diversas aplicações bioquímicas e biotecnológicas. Sementes de leguminosas são reconhecidas por serem boas fontes de lectinas. Este trabalho descreve a purificação, caracterização e a atividade antimicrobiana de ApulSL (*Apuleia leiocarpa* seeds lectin). ApulSL foi extraída misturando a farinha das sementes em solução salina (NaCl 150 mM), gerando o extrato bruto (EB) que foi aplicado em cromatografia em coluna de quitina eluída com ácido acético 1M, obtendo-se um único pico ativo. A ApulSL é termorresistente (100°C/2h) e íon dependente (Mn^{2+}), tem caráter ácido e afinidade por N-acetilglicosamina, D(-)-arabinose e azocaseína. Trata-se de uma proteína com estrutura conformacional desordenada, com resíduos de tirosina no cerne hidrofóbico e um peso molecular nativo de 55,8 kDa, mas que em condições desnaturantes e redutoras se desdobra em três a quatro oligopeptídeos, sendo portanto, uma proteína oligomérica. A análise em MALDI TOF/TOF detectou vários peptídeos, mas não houve homologia suficiente (< 30%) entre os peptídeos detectados e o banco de dados de proteínas para a elucidação da sequência primária. A ApulSL apresentou atividade inibitória e bactericida contra três variedades de *Xanthomonas campestris*, como também inibiu outras cepas gram-negativas e gram-positivas. Em conclusão, a ApulSL é uma lectina sem registros anteriores na literatura e que apresentou potencial antimicrobiano contra a espécie *Xanthomonas campestris*.

Palavras-chaves: Lectina. ApulSL. *Apuleia leiocarpa*. *Xanthomonas campestris*.

ABSTRACT

Apuleia leiocarpa (Voguel) J. F. Macbride, a tree with great value in the timber industry, is a leguminous (Fabaceae) found at the Caatinga. Lectins are proteins that recognize and bind to carbohydrates and glycoconjugates according to their specificity, and therefore, they have different biochemical and biotechnological applications. Legume seeds are known to be good sources of lectins. This paper describes the purification, characterization and potential antimicrobial activity of ApulSL (*Apuleia leiocarpa* seeds lectin). ApulSL was extracted mixing the seeds flour in saline solution (150 mM NaCl), generating the crude extract (CE) which was applied in chromatography in chitin column eluted with 1 M acetic acid, yielding a single active peak. ApulSL is thermoresistant (100 °C/2h) and ion-dependent (Mn^{2+}), has acidic character and affinity for N-acetylglucosamine, D (-)-arabinose and azocasein. It is a protein with disordered conformational structure with tyrosine residues in the hydrophobic core and a native molecular mass of 55.8 kDa, but under reducers and denaturing conditions it unfolds in three to four oligopeptides, being therefore, it is an oligomeric protein. The analysis in MALDI TOF/TOF detected several peptides, but there was no sufficient homology (<30%) between the detected peptides and database proteins for the elucidation of the primary sequence. The ApulSL showed inhibitory and bactericidal activity against three varieties of *Xanthomonas campestris*, as well as inhibited others gram-negative and gram-positive strains. In conclusion, ApulSL is a lectin without previous records in the literature and presented antimicrobial activity against *Xanthomonas campestris* specie.

Key-words: Lectin. ApulSL. *Apuleia leiocarpa*. *Xanthomonas campestris*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Representação gráfica da distribuição do bioma da Caatinga no Brasil. Fonte: IBGE (2004) 18
- Figura 2** - Exemplar da *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J.F. Macbride com aproximadamente 10 metros (A); tronco cilíndrico (B) a irregular (C); casca externa pardo-acinzentada e provida de marcas arredondadas ou irregulares bem características; casca interna é dura e de cor rosada e madeira amarelada (D); apresentação da espécie quando a folhagem cai (E); inflorescência (F); ramos com folhas e frutos (G) fruto (direita) e semente (esquerda) (H); sementes (I), corte transversal (J) e longitudinal (L) da semente. end = endosperma, emb = embrião. Fonte: acervo do autor 23
- Figura 3** - Esquema estrutural de um segmento da quitina. A quitina é um homopolímero de unidades de N-acetil-glicosamina ligadas no sentido • 1-4. Fonte: ANTONINO (2007) 31
- Figura 4** - Representação esquemática da ligação da lectina a um carboidrato (A). As linhas pontilhadas representam pontes de hidrogênio. Fonte: KENNEDY *et al.*, (1995) 47
- Figura 5** - Esquema representando a aglutinação de eritrócitos promovida por lectinas. Rede de aglutinação formada pela ligação de uma lectina aos carboidratos da superfície dos eritrócitos (A). Inibição da formação da rede de aglutinação por carboidratos livres. Fonte: PAIVA *et al* (2011b) 47

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Nomes populares da <i>Apuleia leiocarpa</i> (Vogel) J.F. Macbride nos estados brasileiros e em alguns países. Fonte: CARVALHO (2003)	20
Quadro 2 - Classificação estrutural das lectinas. Fonte: Adaptado de Moreno (2008)	29
Quadro 3 - Classificação lectinas segundo as famílias evolutivamente relacionadas. Representação das estruturas em forma de <i>ribbon</i>	30
Quadro 4 - Espectros representativos de dicroísmo circular de acordo com a estrutura secundária. Fonte: FASMAN (1996).	45

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1OBJETIVO.....	15
1.1.1Geral	15
1.1.2Específicos	16
2FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	17
2.1CAATINGA.....	17
2.2 APULEIA LEIOCARPA (VOGEL)J.F. MACBRIDE.....	19
2.2.1Taxonomia e etimologia.....	19
2.2.2Distribuição geográfica.....	21
2.2.3Características botânicas e bioquímicas.....	21
2.2.4Aplicações.....	24
2.3 LECTINAS.....	25
2.3.1História, etimologia e definição.....	25
2.3.2Distribuição.....	26
2.3.3Biossíntese de lectinas de sementes.....	27
2.3.4Classificação das lectinas.....	27
2.3.4.1 Lectinas ligadoras de quitina.....	31
2.3.5Purificação e caracterização de lectinas	32
2.3.5.1 Extração de proteínas.....	34
2.3.5.2 Métodos cromatográficos.....	36
2.3.5.3 Métodos eletroforéticos.....	38
2.3.5.4 Métodos espectroscópicos.....	39
2.3.5.4.1 Espectroscopia de massas.....	39
2.3.5.4.2 Espectroscopia de Dicroísmo circular.....	41
2.3.5.4.3Espectroscopia de Fluorescência.....	44
2.3.6 Detecção e especificidade	46
2.3.7Propriedades biológicas e potencial biotecnológico de lectinas.....	49
2.3.7.1Atividade Antimicrobiana de lectinas.....	50
2.3.7.1.1 <i>Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB)</i>	51
3METODOLOGIA	53

4RESULTADOS	54
5 CONCLUSÕES	55
REFERÊNCIAS	56
APÊNDICE A Artigo: óPurification, characterization and antibacterial potential of a thermo-resistant lectin from seeds of <i>Apuleia leiocarpa</i> (Vogel) J. F. Macbride (Fabaceae).....	74
ANEXO A Guia para autoresë .	108

1INTRODUÇÃO

A Caatinga é uma formação vegetacional exclusivamente brasileira que foi reconhecida como uma das grandes áreas naturais do planeta (GIL, 2002), e para isso é preciso abrigar extensas amostras de ambientes intactos, com suas faunas e floras bem preservadas, com todos os seus predadores, presas, parasitas e as complexas relações que os unem. Além disso, também oferecer inúmeros serviços ambientais, ou seja, benefícios gerados pela natureza que são essenciais à sociedade, como: a proteção de recursos hídricos e do solo, os usos recreativos, os valores culturais, a contribuição ao equilíbrio dos regimes climáticos, entre outros (CONSERVAÇÃO INTERNACIONAL ã BRASIL, 2003). Embora seja um dos biomas mais ameaçados do planeta, são poucos os estudos etnobotânicos no semi-árido nordestino (ALBUQUERQUE; ANDRADE 2002a,b).

As leguminosas (Fabaceae) são consideradas uma das famílias com maior número de espécies em florestas secas e úmidas dos neotrópicos (GENTRY, 1988, 1990, 1995). As leguminosas ocupam um lugar preponderante por sua abundância e, no entanto, tem sido pouco estudadas como fontes potenciais de proteínas, como por exemplos fatores antinutricionais (fitohemaglutinininas ou lectinas, inibidores enzimáticos e aminoácidos tóxicos), entre outros (LIENER, 1969).

Apuleia leiocarpa (Vogel) J.F. Macbride é uma árvore pertencente à família Fabaceae (Caesalpinioideae) (LEWIS *et al.*, 2005) conhecida vulgarmente por grápia, jataí, entre outros nomes. Tem uma distribuição muito ampla, ocorrendo desde o nordeste brasileiro até o Uruguai e Argentina, habitando preferencialmente as encostas de morros e solos bem drenados (MARCHIORI, 1997). A sua madeira tem usos múltiplos, servindo para a indústria madeireira (LORENZI, 2002), na construção civil (REITZ *et al.*, 1988; MARCHIORI, 1997; LORENZI, 2002), potencial para uso em sistemas agroflorestais (SOUZA *et al.*, 1994), ornamentais, reflorestamentos (MARCHIORI, 1997) e produção de substâncias tanantes na indústria de curtumes (HERINGER; FERREIRA, 1973; CARVALHO, 1994; CARVALHO, 2003).

A literatura aponta que é nas sementes de leguminosas onde mais se encontram lectinas (SHARON; LIS, 1995; TRINDADE *et al.*, 2006; SOL *et al.*, 2007) chegando a constituir até 10% da proteína total (SHARO; LIS, 1990; SPILATRO *et al.*, 1996). Entretanto, muitas lectinas de outras famílias e tecidos também têm sido frequentemente isoladas e caracterizadas (ZENTENO *et al.*, 1995; MOREIRA *et al.*, 1998;

WITITSUWANNAKUL *et al.*, 1998; FERNÁNDEZ-ALONSO *et al.*, 2003; PEUMANS *et al.*, 2003).

Lectinas são proteínas de origem não imune que se ligam de maneira específica e reversível (não covalentemente) a resíduos terminais ou subterminais de carboidratos conjugados normalmente às proteínas ou aos lipídeos na superfície celular (PEUMANS *et al.* 1995; BROOKS; LEATHEM, 1998; COELHO; SILVA, 2000).

Por terem a habilidade de se ligar a mono e oligossacarídeos, as lectinas apresentam uma variedade de efeitos biológicos. Estas proteínas têm sido usadas como ferramentas no campo da tecnologia de bioreconhecimento, em investigações estruturais e funcionais dos carboidratos complexos e no mapeamento de mudanças na superfície celular durante processos fisiológicos e patológicos (SHARON; LIS, 2001; GEMEINER *et al.*, 2009; XIE *et al.*, 2009). Ainda, têm atividade imunomoduladora (TIMOSHENKO *et al.*, 1995; ANDRADE *et al.*, 1999; MACIEL *et al.*, 2004; MELO *et al.*, 2010), antiinflamatória (MELO *et al.*, 2010), antitumoral (FANG *et al.*, 2010; NUNES *et al.*, 2012), antifúngica (SÁ *et al.*, 2009a; SANTANA *et al.*, 2009; SOUZA *et al.*, 2011), antibacteriana (SANTI-GADELHA *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2008; SÁ *et al.*, 2009b; NUNES *et al.*, 2011), antiviral (SATO *et al.*, 2011), hipotensiva (WANG *et al.*, 1996), antinociceptiva (FIGUEIREDO *et al.*, 2009), inibidora ou estimuladora da tripsina (NAPOLEÃO *et al.*, 2012; ALBUQUERQUE *et al.*, 2012), inseticida (MACEDO *et al.*, 2007; SÁ *et al.*, 2009b; OLIVEIRA *et al.*, 2011; PAIVA *et al.*, 2011a).

Apesar do crescente interesse pelo isolamento e caracterização estrutural e funcional dessas proteínas, há poucos estudos com o bioma da caatinga a despeito do potencial bioquímico das espécies desta região. Assim, este trabalho aborda a purificação, caracterização e avaliação da atividade antimicrobiana da lectina extraída das sementes da *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J.F. Macbride, constituindo um esforço para estimular o conhecimento sobre o potencial de plantas da caatinga como fontes de lectinas.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivos gerais

Purificar, caracterizar e avaliar atividade antimicrobiana da lectina da semente de *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J. F. Macbride, a ApuSL (*Apuleia leiocarpa* Seeds Lectin), visando agregar valor não-madeireiro à essa espécie da Caatinga.

1.1.2 Objetivos específicos

- Purificar a lectina de semente de *Apuleia leiocarpa*, a ApulSL, utilizando métodos cromatográficos convencionais e avançados para isolamento de proteínas;
- Caracterizar estruturalmente a ApulSL pura por eletroforese em gel de poliacrilamida, eletroforese bidimensional, fluorimetria, dicroísmo circular, e espectrometria de massas;
- Caracterizar a ApulSL determinando a afinidade da lectina por carboidratos e/ou glicoproteínas, estabilidade frente à variações de temperatura e necessidade de íons;
- Avaliar a atividade antimicrobiana da lectina, determinando a concentração mínima inibitória (CMI), a concentração mínima bactericida (CMB) e a concentração mínima fungicida (CMF) frente a diferentes espécies.

2FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 CAATINGA

O Brasil detém a maior diversidade biológica do mundo, contando com uma rica flora, despertando interesses de comunidades científicas internacionais para o estudo, conservação e utilização racional destes recursos (SOUZA; FELFILI, 2006).

A Caatinga é uma formação vegetacional exclusivamente brasileira que foi reconhecida como uma das 37 grandes áreas naturais do planeta (GIL, 2002). Estende-se de 2°54' S a 17°21' S, possuindo uma área aproximada de 844,453 km² (IBGE, 2004), correspondente a aproximadamente 10% do território nacional. Estende-se pela totalidade do estado do Ceará (100%) e mais de metade da Bahia (54%), da Paraíba (92%), de Pernambuco (83%), do Piauí (63%) e do Rio Grande do Norte (95%), quase metade de Alagoas (48%) e Sergipe (49%), além de pequenas porções de Minas Gerais (2%) e do Maranhão (1%). (IBGE, 2004; IBAMA/MMA, 2010) (Figura 1).

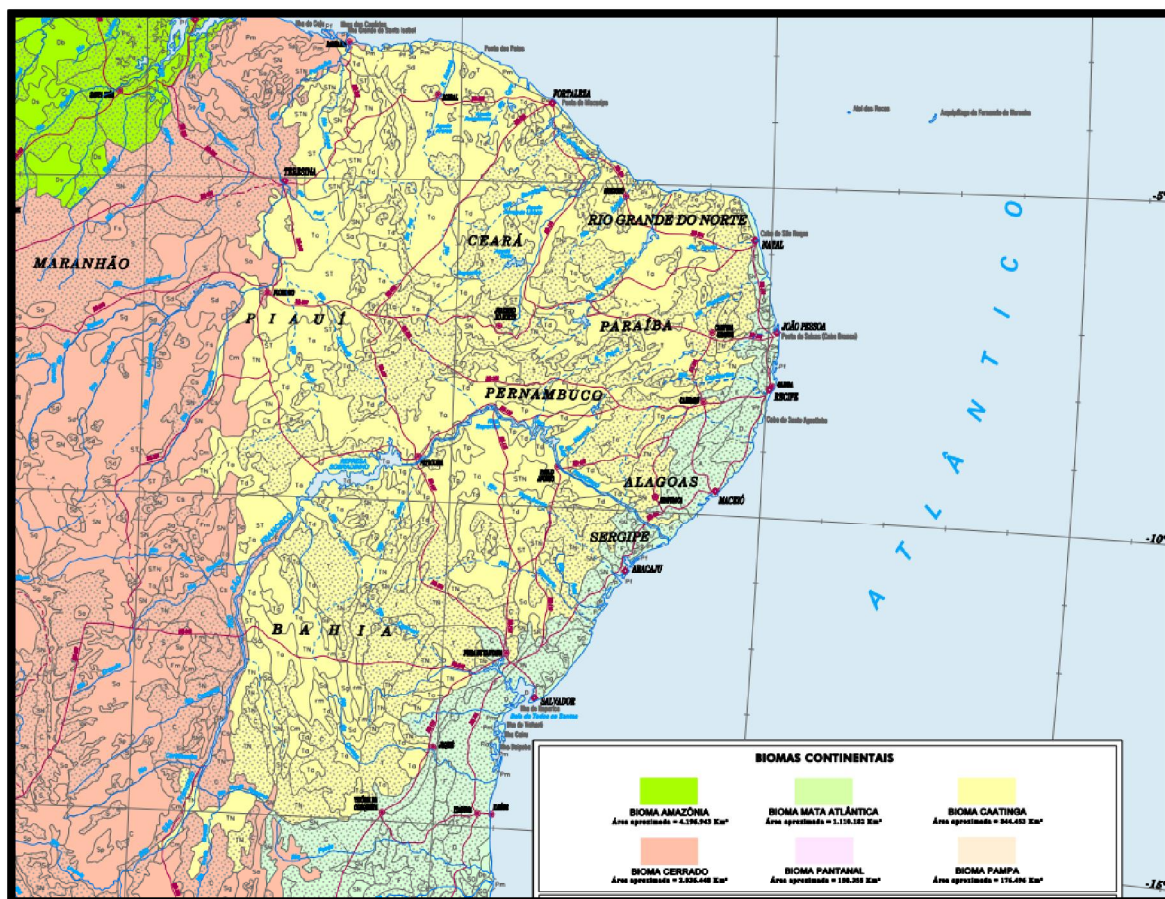
O termo *ócaatinga* é de origem Tupi-Guarani [caã = planta ou floresta; tâ = branco (derivado de morotî, branco); e o sufixo ãngá (de angá) = perto de (PERALTA; OSUNA, 1952), assim, *óca* floresta esbranquiçada] e significa *ómata branca*, referindo-se ao aspecto da vegetação durante a estação seca, quando a maioria das árvores perde as folhas e os troncos esbranquiçados e brilhantes dominam a paisagem (PRADO, 2003). Este aspecto é devido ao índice pluviométrico total entre 250 e 900 mm (IBGE, 1985) com distribuição muito irregular e temperatura elevada, resultando em altas taxas de evaporação e evapo-transpiração (REIS, 1976, NIMER, 1977). Esses fatores trazem como consequência um clima quente, marcado por uma longa estação seca (sete a nove meses) e uma curta estação chuvosa (três a cinco meses) (FERNANDES; BEZERRA, 1990).

Neste ambiente, predominam florestas arbóreas ou arbustivas, compreendendo principalmente árvores e arbustos baixos, muitos dos quais apresentam espinhos, microfilia e algumas características xerofíticas. (LEAL *et al.*, 2003; 2005).

Infelizmente, a denominação *ócaatinga* tem sido muito usada para a região geográfica no nordeste do Brasil, e isto tem gerado algumas confusões (CASTELLANOS, 1960). O conceito de *óregião* das Caatingas inclui áreas tais como a chapada do Araripe, com vegetação de Cerrado, ou outras áreas mais úmidas dos *óbrejos* de Pernambuco, com florestas úmidas. Porém, o conceito exclui áreas que, apesar de floristicamente serem parte da

vegetação de caatinga, não são consideradas dentro da região geográfica, tais como o vale seco do rio Jequitinhonha em Minas Gerais (SAMPAIO, 1995) ou certas regiões da bacia Rio Grande no oeste da Bahia.

Figura 1 -Representação gráfica da distribuição do bioma da Caatinga no Brasil



Fonte: IBGE(2004)

Apesar de ser o único bioma genuinamente brasileiro, poucas ações de proteção são desenvolvidas, pois aproximadamente 50% desse ambiente foi degradado em virtude das atividades humanas, especialmente a pecuária, agricultura e o corte de madeira para lenha, que estão modificando a paisagem natural desse ecossistema (IBAMA/MMA, 2010). Atualmente, o bioma apresenta menos de 1% de sua área protegida em unidades de conservação de proteção integral, não contemplando todos os tipos de formações da caatinga, assim como suas riquezas (LEAL *et al.*, 2005).

Embora seja um dos biomas mais ameaçados do planeta, são poucos os estudos etnobotânicos no semi-árido nordestino (ALBUQUERQUE; ANDRADE, 2002a; b). Os levantamentos etnobotânicos podem subsidiar estudos etnofarmacológicos na busca por fitoterápicos no tratamento de várias enfermidades (ALBUQUERQUE; HANAZAKI, 2006) e as plantas tropicais fornecem material para a produção de analgésicos tranqüilizantes, diuréticos, laxativos e antibióticos entre outros (SOUZA; FELFILI, 2006).

Segundo Gentry (1995), Fabaceae é considerada uma das famílias com maior número de espécies em florestas secas dos neotrópicos. Baseando-se em dados de 20 florestas secas nos neotrópicos, este autor encontrou que Fabaceae é a família mais importante em 17 localidades (85%) e a segunda mais importante nas demais. Além disso, Fabaceae também é uma das famílias mais importantes para as florestas úmidas dos neotrópicos, apresentando-se sempre entre as 10 famílias mais ricas em espécies (GENTRY, 1988, 1990).

As leguminosas cujo consumo é escasso ou nulo ocupam um lugar preponderante por sua abundância e, no entanto, tem sido pouco estudadas como fontes potenciais de proteínas. Um dos aspectos que se devem considerar quando se avalia o valor nutricional das sementes de leguminosas, é a possível existência de fatores antinutricionais tais como fitohemaglutinininas (lectinas), inibidores enzimáticos, alcaloides, aminoácidos tóxicos, etc (LIENER, 1969).

2.2 *Apuleia leiocarpa* (VOGEL) J.F. MACBRIDE

2.2.1 Taxonomia e etimologia

Fabaceae compreende 727 gêneros e cerca de 19.325 espécies, distribuídas nas subfamílias Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae. A subfamília Caesalpinioideae compreende quatro tribos: Cercideae, Detarieae, Cassieae e Caesalpinieae, com 172 gêneros e cerca de 2.250 espécies com ampla distribuição nas regiões tropicais e subtropicais do globo (LEWIS *et al.*, 2005).

Apuleia leiocarpa (Vogel) J.F. Macbride é uma árvore pertencente à família Fabaceae (Caesalpinioideae) (LEWIS *et al.*, 2005) conhecida vulgarmente por grápia, entre outros nomes (Tabela 1). Segundo Carvalho (2003), a etimologia do nome *Apuleia* é uma homenagem a L. Apuleus Madaurensis, filósofo e escritor do século 2 DC; *leiocarpa* significa fruto liso, sem ornamentações.

Quadro 1 - Nomes populares da *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J.F. Macbride nos estados brasileiros e em alguns países

Estado	Nome popular
Mato Grosso	Amarelão, cumarurana, garapa, garapeira, muirajuba
Mato Grosso do Sul	Amarelinho, mulateira,
Paraná	Amarelinho, garapeira, gramiamunha, grápea,
Santa Catarina	Amarelinho, amarelinho-da-serra, garapiapanha, grapiapunha-branca e guarapeapunha, grapiapunha,
São Paulo	Amarelinho, barajuba; cetim; coração-de-negro, Cumarurana, garapa, garapa-amarela, garapa-branca, garapiapunha, gema-de-ovo, grapiapunha,
Maranhão	Aricirana, muirajuba
Bahia	Cumarurana, garapa, garapeiro, gemada, grapeapunha, guaretá; jataí; jataí-amarelo, jitaí, jitaí-amarelo
Espírito Santo	Cumarurana, garapa, garapa-amarela, gotaí-amarelo, parajuba; pau-cetim, pau-mulato
Minas Gerais	Cumarurana, garapa, garapa-branca, garapeapunha, gemada, grapeapunha, jitaí, parajuba; pau-cetim, pau-mulato
Rio de Janeiro	Cumarurana, garapa, minrajuba
Pará	Garapeira, gema-de-ovo,
Rio Grande do Sul	grapeapunha-branca, grapiá
Alagoas	guaretá; jataí; jataí-amarelo
Paraíba	Jetaí, jitaí, jutaí
Pernambuco	Jitaí, jutaí
Ceará	Jutaí
País	Nome Popular
Peru	Anacaspi
Argentina	Grapia
Paraguai	Yvyra pere

Fonte: Carvalho (2003)

2.2.2 Distribuição geográfica

A. leiocarpa é considerada uma das espécies da Floresta Estacional Decidual do Alto Uruguai e Depressão Central do Sul do Brasil e tem uma distribuição muito ampla, ocorrendo desde o nordeste brasileiro até o Uruguai e Argentina, sendo na Amazônia tratada como uma variedade (*Apuleia leiocarpa* var. *mollaris*) ou então como espécie distinta (*Apuleia mollaris*).

Esta espécie habita preferencialmente as encostas de morros e solos bem drenados (MARCHIORI, 1997), em altitudes de 20 a 1.200m (CARVALHO, 2003).

Apesar da ampla distribuição, essa espécie torna-se cada vez mais escassa devido à devastação das florestas na sua área de ocorrência natural e à exploração de sua madeira de forma extrativista, sem haver reposição através de reflorestamento. (HERINGER; FERREIRA, 1973; MATTOS; GUARANHA, 1983).

2.2.3 Características botânicas e bioquímicas

De acordo com Reitz et al. (1988), Heringer e Ferreira (1973) e Carvalho (2003) a *A. leiocarpa* é uma espécie arbórea decidual (perde as folhas em determinadas épocas do ano), heliófita (cresce melhor em locais bem iluminados), pioneira (se originam a partir de lugares inóspitos, inabitáveis), podendo alcançar 40 m de altura e 100 cm de diâmetro. De modo geral, a espécie é mais abundante em solos com rápida drenagem, mas também em regiões de planalto, em solos secos e de baixa fertilidade, notando-se não haver pronunciada afinidade por determinadas condições físicas de solo (HERINGER; FERREIRA, 1973)

Copa larga, ramificada, aplanada e não muito densa, de até 8 m de diâmetro, que proporciona uma sombra média (Figura 2 A). Carvalho (2003) destaca a presença de tronco irregular (em lugares mais ou menos abertos) a cilíndrico (floresta fechada) (Figura 2 B e C).

A casca externa é pardo-acinzentada e provida de marcas arredondadas ou irregulares muito características, resultantes da deiscência em finas placas. A casca interna é dura, de cor rosada, fluindo uma seiva que se escurece em contato com o ar, após incisão (Figura 2 D).

Segundo Marchiori (1997), é também muito característico o enraizamento superficial, na base do tronco.

As folhas são alternas e imparipinadas, com 7 a 11 folíolos alternos, elípticos ou oblongos, coriáceos, de ápice agudo-acuminado ou emarginado, com margem inteira e base obtusa a arredondada (MARCHIORI, 1997), perdendo suas folhas total ou parcialmente durante o inverno (Figura 2 E e G) (REITZ et al., 1988).

As flores são pequenas, melíferas, masculinas ou hermafroditas (monóica), de coloração branca, amarela ou bege, reunidas em inflorescências dispostas em pequenas panículas, terminais do tipo cima ou cimeira, com 25 a 35 flores ou solitárias, compactifloras, inseridas sobre os ramos desfolhados ou com folhas novas (Figura 2 F) (HERINGER; FERREIRA, 1973; REITZ *et al.*, 1988; MARCHIORI, 1997). Sua polinização é realizada principalmente por abelhas (CARVALHO, 2003).

O fruto é uma vagem oblonga ou ovado-oblonga, achatada, ligeiramente oblíqua, indeiscente, elíptica, de cor castanho-clara, comprimida lateralmente, com ápice e base agudos, estrutura levemente (HERINGER; FERREIRA, 1973) ou totalmente coriácea (MARCHIORI, 1997), com indumento dourado (Figura 2H) (REITZ *et al.*, 1988). Aproximadamente 93% dos frutos contêm uma única semente e 7% duas (HERINGER; FERREIRA, 1973). Souza *et al.*, (1994) observaram de uma a três sementes por fruto, de coloração variando do castanho-esverdeado ao castanho-escuro (Figura 2 I, J e L).

A semente possui tegumento de consistência dura e germinação lenta (20-40 dias) e desuniforme (inferior a 60%) (LORENZI, 2002), devido à presença de dormência tegumentar, comum em leguminosas (POPIGINIS, 1977). As sementes são ortodoxas (EIBL *et al.*, 1994), com longevidade de aproximadamente dois anos, ou seja, sobrevivem a secagem e congelamento durante a conservação *ex situ*. Amaral *et al.* (1988) encontraram 96% de germinação logo após a coleta, e 72 a 85%, 19 meses depois, tendo sido armazenadas em sacos de papel, em câmara seca, à temperatura ambiente, com umidade relativa de 50%.

No Sul e Sudeste, floresce na primavera (CARVALHO, 2003) e frutifica durante os meses de verão (MARCHIORI, 1997; CARVALHO, 2003) ou no meio do ano (RIZZINI, 1971) e, às vezes, as sementes permanecem nas árvores por vários meses (LORENZI, 2002).

De acordo com anotações durante 3 anos, Felippi (2010) observou que o aparecimento de flores foi perceptível durante a transição para o período de maior pluviosidade na região (agosto a novembro), o que pode estar relacionado à disponibilidade de água e luz. Conforme Pereira *et al.* (2008), esse dado pode indicar que, antes da antese, os primórdios florais se encontram em estado de latência, imposto pelo período de seca, que pode ser rompido com o aumento da umidade do ambiente. A maturação dos frutos ocorreu de janeiro a abril nos três anos de estudo, predominando no período de janeiro a março. Entretanto, alguns frutos persistiram por um período maior nas árvores, concordando com Lorenzi (2002).

Segundo Pontes *et al.* (2002) as sementes de *A. leiocarpa* possuem reserva de açúcares (glicose, manose, xilose, arabinose, amido, galactose), ácidos graxos (ácido esteárico, mirístico, palmítico, esteárico, láurico, oléico e linoléico) e proteínas. A reserva de lipídio no

Figura 2 - Exemplar da *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J.F. Macbride com aproximadamente 10 metros (A); tronco cilíndrico (B) a irregular (C); casca externa pardo-acinzentada e provida de marcas arredondadas ou irregulares bem características; casca interna é dura e de cor rosada e madeira amarelada (D); apresentação da espécie quando a folhagem cai (E); inflorescência (F); ramos com folhas e frutos (G) fruto (direita) e semente (esquerda) (H); sementes (I), corte transversal (J) e longitudinal (L) da semente. end = endosperma, emb = embrião



embrião de *A. leiocarpa* é a única a ser utilizada durante a fase pré-germinativa, enquanto as demais, permanecem constantes em seus teores. Por outro lado, os cotilédones acumulam reservas que seriam usadas na fase de plântula (PONTES *et al.*, 2002).

A *A. leiocarpa* não é muito resistente ao ataque de fungos, apresentando tendência a manchar-se sendo conveniente a preparação de banhos preventivos com fungicidas (CELULOSA ARGENTINA, 1975).

2.2.4 Aplicações

Por ter uma madeira de elevado porte, amarela e densa (0,75 a 1,00g/cm³) (MARCHIORI, 1997), a *A. leiocarpa* é de interesse madeireiro, tendo múltiplos usos (LORENZI, 2002). Devido à resistência mecânica média a alta e boa durabilidade natural, é indicada para obras externas, construção civil (REITZ *et al.*, 1988; MARCHIORI, 1997; LORENZI, 2002), e utilizada para a produção de álcool, coque e carvão (CARVALHO, 1994).

Na literatura também há registros de que possui propriedades antiofídicas (RUPPELT *et al.*, 1991; RIBEIRO; LEITÃO, 1996) e anti-sifilíticas (MENTZ *et al.*, 1997), tem potencial para uso em sistemas agroflorestais (SOUZA *et al.*, 1994), ornamentação, reflorestamentos (MARCHIORI, 1997) e produção de substâncias tanantes na indústria de curtumes (CARVALHO, 1994), já que sua casca chega a ter 24% de taninos (HERINGER; FERREIRA, 1973; NICOLOSO *et al.*, 1999; CARVALHO, 2003).

Braz Filho e Gottlieb (1971) isolaram e identificaram nas cascas e cerne da *A. leiocarpa*, dez novos flavonóides, um pterocarpano, sitosterol, bamirina e pinitol.

Segundo Carvalho (2003), face às suas múltiplas aplicações, a *A. leiocarpa* deve ser considerada como uma das mais valiosas madeiras do Rio Grande do Sul e, conseqüentemente, merece uma atenção especial nos estudos sobre a viabilidade de seu reflorestamento em larga escala, possuindo uma importância ecológica inquestionável (BIONDO *et al.*, 2008). Mas, por haver exploração de sua madeira de forma extrativista, sem haver reposição através de reflorestamento, essa espécie torna-se cada vez mais escassa. (NICOLOSO *et al.*, 1997; LELES *et al.*, 1998; NICOLOSO *et al.*, 2001; RUSCHE *et al.*, 2003)

2.3 LECTINAS

2.3.1 História, etimologia e definição

O primeiro relato a respeito de lectinas se deu em 1888, quando Stillmark, ao estudar a toxicidade de extratos de *Ricinus communis* (mamona), observou sua capacidade para aglutinar eritrócitos, devido à presença de uma proteína extraída, a ricina, e foi essa descoberta que marcou o início das pesquisas envolvendo lectinas (KENNEDY *et al.*, 1995). Pouco tempo depois, outra hemaglutinina, chamada abrina, foi encontrada em sementes de *Abrus precatorius* (Jequiriti). Mas foi apenas em 1960 que o estudo sobre lectinas começou a ganhar ímpeto, atraindo a atenção para a investigação e aplicação das lectinas (GABOR *et al.*, 2004).

O termo *lectina* é originado do latim *ólectus*, que significa óseleccionado e refere-se à habilidade dessas proteínas ligarem-se seletivamente e reversivelmente (não-covalentemente) a carboidratos (HONG *et al.*, 2001; SHARON; LIS, 2001). O termo aglutinina é usado como um sinônimo para lectina, porque se refere à habilidade de aglutinar eritrócitos ou outras células (PEUMANS; VAN DAMME, 1995).

Dixon (1981) entendeu como lectinas aquelas proteínas com pelo menos um sítio de ligação de carboidratos; Barondes (1988) e Sharon e Lis (1990) referiram-se à existência de sítios hidrofóbicos adicionais.

Hoje, após anos de pesquisa, pode-se conceituar lectinas como (glico)proteínas de origem não imune que se ligam de maneira específica e reversível (não covalentemente) a resíduos terminais ou subterminais de carboidratos. Dessa forma, desempenham função relacionada com o reconhecimento das informações contidas na enorme variedade de estruturas oligossacarídicas conjugadas normalmente às proteínas ou aos lipídeos na superfície celular (PEUMANS; VAN DAMME, 1995; COELHO; BROOKS; LEATHEM, 1998; SILVA, 2000).

Esta interação ocorre através de ligações de hidrogênio, interação de Van der Waals e interações hidrofóbicas em uma determinada região da molécula proteica, denominada de Domínio de Reconhecimento a Carboidrato (KENNEDY; VAN DAMME, 1995; NISHIMURA *et al.*, 2006), que tende a se localizar na superfície da molécula (COMINETTI *et al.*, 2002; SHARON; LIS, 2002).

A hidrofobicidade é a força principal de interação das lectinas com os carboidratos, com as glicoproteínas, ou outras substâncias glicosiladas (ROBERTS; GOLDSTEIN, 1983; KELLA *et al.*, 1984; ROBERTS *et al.*, 1986; BARONDES, 1988).

A ênfase dada quanto à origem não-imunológica das lectinas serve para distingui-las de anticorpos anticarboidratos que aglutinam células. Os anticorpos são estruturalmente similares, enquanto as lectinas diferem entre si quanto à composição aminoacídica, requerimento de metais, peso molecular e estrutura tridimensional (VAN DAMME *et al.*, 1998).

Devido a essa habilidade, as lectinas ou hemaglutininas, apresentam alto grau de especificidade em suas reações com grupos sanguíneos do sistema ABO e MN (SHARON; LIS, 1993) e eritrócitos de diferentes espécies animais (PAIVA E COELHO, 1992; CORREIA E COELHO, 1995; REYNOSO-CAMACHO *et al.*, 2003)

2.3.2 Distribuição

Lectinas estão amplamente distribuídas na natureza, estão presentes em todos os reinos da natureza e podem ser encontradas em bactérias (IMBERT *et al.*, 2004); vírus (GAMBLIN *et al.*, 2004); algas (HAN *et al.*, 2010); vegetais (LEITE *et al.*, 2005; SOL *et al.*, 2007); fungos (KHAN *et al.*, 2007; LEONIDAS *et al.*, 2007); líquens (SILVA *et al.*, 2009); invertebrados: esponjas (MOURA *et al.*, 2006); cnidários (FENTON-NAVARRO *et al.*, 2003); moluscos (TAKAHASHI *et al.*, 2008; KONG *et al.*, 2011); crustáceos (XU *et al.*, 2010); insetos (OURTH *et al.*, 2005); vertebrados: peixes (TERADA *et al.*, 2007); répteis (NUNES *et al.*, 2011); aves (HOGENKAMP *et al.*, 2006); mamíferos (OLA *et al.*, 2007).

Em plantas, as lectinas têm sido detectadas em: cascas (NASCIMENTO *et al.*, 2008; SÁ *et al.*, 2009b; VAZ *et al.*, 2010; ARAÚJO *et al.*, 2012); cerne (SÁ *et al.*, 2008); cladônias (SANTANA *et al.*, 2009); flores (SANTOS *et al.*, 2009); folhas (COELHO; SILVA, 2000; COSTA *et al.*, 2010); raízes (SOUZA *et al.*, 2011); rizomas (BAINS *et al.*, 2005; SANTANA *et al.*, 2012); sementes (COELHO *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2009).

As lectinas mais estudadas são da família Fabaceae, pois é nas sementes de leguminosas onde são mais encontradas (SHARON; LIS, 1995; TRINDADE *et al.*, 2006; SOL *et al.*, 2007) chegando a constituir até 10% da proteína total (SHARON; LIS, 1990; SPILATRO *et al.*, 1996). Entretanto, muitas lectinas de outras famílias também têm sido frequentemente isoladas e caracterizadas como, por exemplo, lectinas de Solanaceae (PEUMANS *et al.*, 2003), Cactaceae (ZENTENO *et al.*, 1995), Euphorbiaceae

(WITITSUWANNAKUL et al., 1998), Labiateae (FERNÁNDEZ-ALONSO et al., 2003) e Moraceae (MOREIRA et al., 1998) entre diversas outras.

2.3.3 Biossíntese de lectinas de sementes

A rota biossintética de muitas lectinas de plantas segue a seguinte via secretora: as lectinas são sintetizadas pelos ribossomos, entram no retículo endoplasmático, são transportadas para o complexo de Golgi, de onde vão para os vacúolos, os quais se dividem em partes menores, os corpos proteicos, durante o desenvolvimento das sementes, ficando aí armazenadas. Comumente as lectinas sofrem processos co-traducionais como N-glicosilação e pós-traducionais como permutações, clivagem proteolítica para remoção de peptídeos-sinais e separação em cadeias. (VAN DAMME *et al.*, 1998; RÜDIGER; GABIUS, 2001).

2.3.4 Classificação das lectinas

As lectinas variam quanto às fontes, especificidade, estrutura, propriedades biológicas, e por isso, são várias as classificações dessas proteínas.

A especificidade de lectinas de plantas a carboidratos é primeiramente determinada pela estrutura tridimensional dos seus sítios de ligação que se apresenta conservada a nível aminoacídico, dentro de famílias de lectinas (PEUMANS; VAN DAMME, 1998). As lectinas exibem uma elevada homologia em seus resíduos de aminoácidos, incluindo aqueles envolvidos na ligação a carboidratos e a maioria dos que coordena os íons metálicos, necessários à integridade das subunidades e ao correto posicionamento dos resíduos para a ligação (SPILATRO *et al.*, 1996).

Com base na estrutura geral das proteínas, as lectinas de plantas têm sido subdivididas em merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas (Tabela 2) (PEUMANS; VAN DAMME, 1998):

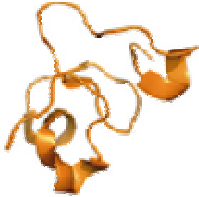
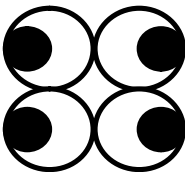
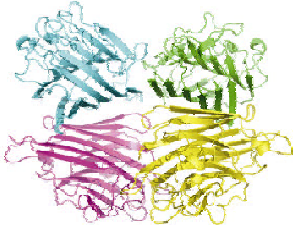
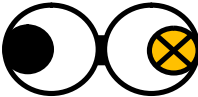
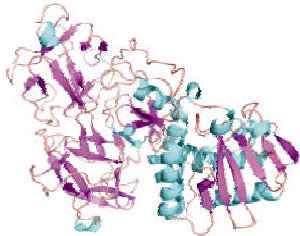
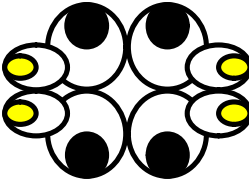
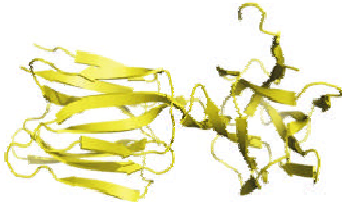
- a) **Merolectinas** são aquelas que possuem apenas um domínio para ligação a carboidratos. São monovalentes e por isso não podem precipitar glicoconjugados ou aglutinar células.
- b) **Hololectinas** também possuem domínio específico para ligação a carboidratos, mas contêm, pelo menos, dois domínios idênticos ou mais domínios homólogos ligantes a açúcares; sendo di ou multivalentes, aglutinam células e/ou precipitam glicoconjugados. A maioria das lectinas de plantas pertence a esse grupo.

- c) **Quimerolectinas** são proteínas com um ou mais domínios de ligação a carboidratos e um domínio não-relacionado. Esse domínio diferente pode ter uma atividade enzimática bem definida ou outra atividade biológica, mas age independentemente dos outros domínios de ligação a carboidratos. Dependendo do número de sítios de ligação para carboidratos, quimerolectinas agem como merolectinas ou hololectinas.
- d) **Superlectinas** consistem exclusivamente de pelo menos dois domínios de ligação a açúcares diferentes. Esse pode ser considerado um grupo especial de quimerolectinas, consistindo de dois domínios estruturalmente e funcionalmente diferentes de ligação a carboidratos (VAN DAMME *et al.*, 1996).

Segundo Moreno (2008), atualmente é possível classificar as lectinas também segundo às famílias evolutivamente relacionadas (Tabela 3):

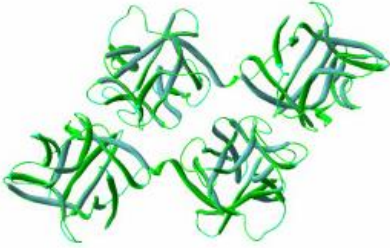
- a) **Lectinas de monocotiledôneas ligadoras de manose:** as estruturas foram resolvidas e complexadas apenas com açúcares constituídos por manose. São estruturas ricas em folhas betas interconectadas por loops;
- b) **Lectinas ligadoras de quitina e homólogas à heveína (domínio heveínico):** lectinas com domínios homólogos ao da Heveína (*Hevea brasiliensis*) Estruturas ricas em regiões de loops, estabilizados principalmente por pontes de dissulfeto;
- c) **Lectinas homólogas à jacalina (lectinas do tipo Prisma- β):** lectinas com domínios homólogos ao da jacalina. Estruturas ricas em regiões de folhas betas interconectadas por loops. São pobres em pontes de dissulfeto e podem ter afinidade por oligossacarídeos ricos em *D*-galactose e *D*-manose;
- d) **Lectinas inativadoras de ribossomos (RIPs) tipo 2:** lectinas com domínios homólogos à ricina. São, geralmente, quimerolectinas com estruturas ricas em regiões de folhas betas e alfa hélices. Podem ser dotadas de domínios distintos, que se ligam reversivelmente a carboidratos e que também possuem atividade enzimática;
- e) **Lectinas de leguminosas;**
- f) **Lectinas da família das Amarantaceae;**
- g) **Lectinas de floema de Curcubitaceae.**

Quadro2 -Classificação estrutural das lectinas. Fonte: Adaptado de Moreno (2008). (●) sítio de ligação ao carboidrato X; (●) = sítio de ligação ao carboidrato Y; (⊗) = domínio não-relacionado.

Classificação	Representação Esquemática	Exemplo
Merolectina		 Heveína, lectina da <i>Hevea brasiliensis</i> (ANDERSEN <i>et al</i> , 1993)
Hololectina		 PNA, lectina da <i>Arachis Hypogaea</i> (RAVISHANKAR <i>et al.</i> , 2001)
Quimerolectina		 Ricina, lectina da espécie <i>Ricinus communis</i> (RUTEMBER; ROBERTUS, 1991)
Superlectina		 Lectina da espécie <i>Musa acuminata</i> (MEAGHER <i>et al.</i> , 2005)

Fonte:Elaborado com base em Moreno (2008)

Quadro3 - Classificação das lectinas segundo as famílias evolutivamente relacionadas. Representação das estruturas em forma de *ribbon*.

Classificação	Exemplo	Estrutura
Lectinas de monocotiledôneas ligadoras de manose	Lectina presente na espécie <i>Allium sativum</i> . (RAMACHANDRAIAH <i>et al.</i> , 2002) (CHANDRA <i>et al.</i> , 1999).	
Lectinas ligadoras de quitina e homólogas à heveína	Lectina presente na espécie <i>Urtica dioica</i> . (HARATA; MURAKI, 2000) (SAUL <i>et al.</i> , 2000) (HARATA <i>et al.</i> , 2001).	
Lectinas homólogas à jacalina	Lectina presente na espécie <i>Helianthus tuberosus</i> . (BOURNE <i>et al.</i> , 1999)	
Lectinas inativadoras de ribossomos (RIPs) tipo 2	Lectina presente na espécie <i>Amaranthus caudatus</i> (TRANSUE <i>et al.</i> , 1997).	

Fonte: Elaborado com base em Moreno (2008)

Lectinas ainda podem ser classificadas quanto à especificidade por monossacarídeos (MÄKELÄ, 1957), entre elas as lectinas dos tipos ligadoras de 1) manose/glicose, 2) D-galactose, 3) N-acetilglicosamina, 4) N-acetilgalactosamina, 5) L-fucose, 6) ácido N-acetil-neuramínico e 7) grupos glicanos complexos (PEUMANS; VAN DAMME, 1998; RÜDIGER, 2000), entretanto, a maioria das lectinas que compartilham entre si a característica de reconhecerem primariamente o mesmo tipo de monossacarídeo, diferem entre si em relação a

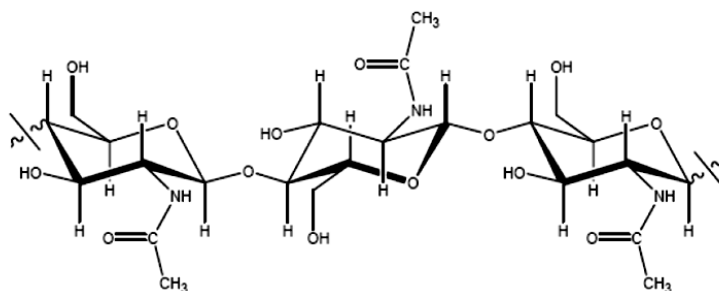
afinidades por oligossacarídeos, ou seja, a interação com monossacarídeos é bem menos complexa do que por polissacarídeos (MORENO, 2008). Algumas lectinas podem ter afinidade por diferentes carboidratos, não sendo portanto específicas. Não está claro como lectinas podem identificar diversos açúcares presentes em diferentes posições em bactérias, fungos, enzimas e outras glicoproteínas (TAKAHASHI et al., 2008).

2.3.4.1 Lectinas ligadoras de quitina

Lectinas ligadoras de quitina têm sido isoladas de diversas fontes, incluindo bactérias, insetos, plantas e mamíferos e muitas delas apresentam atividade antifúngica e inseticida uma vez que a quitina (Figura 3) é o componente-chave da parede celular de fungos e de diversas estruturas no corpo dos insetos. Lectinas com potencial antifúngico e inseticida têm sido estudadas sob vários aspectos, seja como moléculas que protegem as plantas que as produzem naturalmente ou como resultado de um material genético modificado que expresse este tipo de lectina, desde que seja atóxica ao homem (PEUMANS; VAN DAMME 1996, CARLINI; GROSSI DE SÁ, 2002).

As mais estudadas são aquelas pertencentes à família das heveínas, assim chamadas por possuírem em comum o domínio heveínico como motivo estrutural de reconhecimento da quitina.

Figura 3 - Esquema estrutural de um segmento da quitina. A quitina é um homopolímero de unidades de N-acetil-glicosamina ligadas no sentido •1-4.



Fonte: Antonino(2007).

A heveína é uma merolectina constituída por 43 aminoácidos (cerca de 4,5 kDa), encontrada na seringueira (*Hevea brasiliensis*). É especialmente rica em resíduos de glicina e cisteína e sua estrutura é mantida por 4 pontes dissulfeto, o que lhe confere uma estabilidade notável, característica que se estende às demais lectinas da família das heveínas. Mesmo

depois de aquecida a 90 °C por 10 minutos, a heveína ainda inibe o crescimento de fungos (NEUMANN *et al.*, 2004). Do ponto de vista biológico, a heveína, além de aglutinar eritrócitos e ligar-se a IgE, é o principal fator alérgico do látex, por isso, também, tem sido apontada como envolvida na defesa da planta frente ao ataque de insetos e fungos. Uma vez que o exoesqueleto de insetos e a parede celular de fungos são constituídos por quitina, o primeiro passo dado para proteger a planta poderia ser o reconhecimento da quitina por esta pequena lectina (NEWMAN *et al.* 2004).

Os pontos de ligação da heveína e dos oligossacarídeos de quitina envolvem um resíduo de serina e dois resíduos de triptofanos, Ser 19 e Trp 21 e 23. A afinidade com oligômeros de N-acetilglicosamina é maior do que com o monossacarídeo, cuja interação é entálpicamente favorecida. O anel da N-acetilglicosamina exibe forte interação hidrofóbica com um resíduo aromático, no caso da heveína, Trp23. Este pronunciado empacotamento do anel é permitido pela falta de grupos axiais na N-acetilglicosamina. Uma interação hidrofóbica adicional ocorre entre o grupo N-acetil e Trp21 da heveína e, finalmente, existe uma interação polar entre a Ser19 e o grupo carboxil da N-acetilglicosamina (NEUMAN *et al.* 2004, ASENSIO *et al.* 2000, ESPINOSA *et al.* 2000). Uma interação hidrofóbica adicional ocorre entre o grupo N-acetil e Trp21 da heveína e, finalmente, existe uma interação polar entre a Ser19 e o grupo carboxil da N-acetilglicosamina (NEUMAN *et al.* 2004, ASENSIO *et al.* 2000, ESPINOSA *et al.* 2000).

Apesar de possuírem vários domínios heveínicos e envolverem os mesmos aminoácidos no reconhecimento de seus ligantes, as lectinas ligadoras de quitina desta família se associam diferentemente com os fragmentos de quitina, de modo que o número de domínios heveínicos não reflete o número de unidades monoméricas de açúcar que eles reconhecem. O grupo N-acetilamino é único na estrutura da N-acetilglicosamina, comparado com outros açúcares reconhecidos por lectinas e o reconhecimento deste grupo é essencial para ligação exclusivamente com a quitina (HARATA *et al.*, 2000).

2.3.5 Purificação e caracterização de lectinas

A purificação de produtos produzidos por células vegetais, microbianas ou animais constitui uma etapa complexa, dada as variadas características dos meios e das biomoléculas de interesse, como peptídeos, proteínas, ácidos graxos, polissacarídeos e hormônios. Em resultado à variedade de características descritas, as etapas de purificação são desafiantes,

pois não há processo de purificação de aplicação geral (PESSOA JÚNIOR; KILIKIAN, 2005).

Os métodos de purificação de proteínas utilizam o conjunto de propriedades características de cada proteína, para distingui-las e separá-las umas das outras. Estas propriedades envolvem seu volume molecular, carga superficial, hidrofobicidade e afinidade por ligantes. Dessa maneira, foram desenvolvidos inúmeros métodos para se purificar proteínas. (MORAES *et al.*, 2013)

As operações de concentração e/ou purificação de baixa resolução compreendem a separação da molécula-alvo de acordo com as características físico-químicas significativamente diferentes, como pode-se notar comparando água com íons, aminoácidos, ácidos nucleicos, polissacarídeos e lipídeos. Já a purificação de alta resolução compreende a separação de classes moléculas com características físico-químicas muito semelhantes, como as proteínas (PESSOA JÚNIOR; KILIKIAN, 2005).

Cada etapa aplicada durante o processo de purificação não compreende necessariamente a aplicação de uma única operação unitária. Como por exemplo, após a precipitação por adição de um sal, é necessário uma diálise (processo de separação por membrana) para ajuste da força iônica a valores adequados à uma etapa cromatográfica.

A completa purificação pode exigir mais de uma etapa cromatográfica, cada qual baseada em um princípio diferente de separação das moléculas, a fim de atingir o grau de pureza necessário (PESSOA JÚNIOR; KILIKIAN, 2005).

A definição do processo de purificação depende da aplicação final da molécula-alvo, suas características físico-químicas, bem como das impurezas. A redução do custo e das perdas da molécula-alvo no processo de purificação é de fundamental importância na viabilidade do processo (PESSOA JÚNIOR; KILIKIAN, 2005).

O interesse pela purificação e caracterização de lectinas é importante na elucidação de seu comportamento em diferentes sistemas biológicos (SOUZA *et al.*, 2001) bem como para sua potencial utilização em diversas áreas da medicina clínica e em pesquisa química e biológica (RÜDIGER, 2000; MATSUI *et al.*, 2001; BANERJEE *et al.*, 2004; VEGA E PÉREZ, 2006).

Lectinas de leguminosas são similares nas suas estruturas primária, secundária e terciária (SRINIVAS *et al.*, 2001) e por esta razão tornam-se um excelente modelo para estudos de desdobramento de proteínas diméricas e tetraméricas, e da oligomerização na estabilidade e integridade estrutural (RÜDIGER *et al.*, 2000).

Isolectinas são definidas como um grupo de proteínas intimamente relacionadas, resultantes da expressão de diferentes genes, com estruturas semelhantes em uma mesma espécie, e apresentam formas moleculares com mobilidade eletroforética diferente. O termo isoforma foi proposto para lectinas pertencentes à mesma espécie, cuja heterogeneidade de origem genética não foi bem definida (PAIVA; COELHO, 1992). Um grande número de lectinas tem sido clonado e a homologia em suas sequências de aminoácidos e similaridades em suas estruturas moleculares têm sido estabelecidas (GOLDSTEIN, 2002).

Métodos comuns utilizados na purificação de proteínas são aplicados para purificar as lectinas e protocolos distintos podem mudar consideravelmente a atividade da proteína (KOLBERG; SLETTEN, 1982; AGRAWAL; GOLDSTEIN, 1972).

As proteínas podem ser desnaturadas pela utilização de métodos físicos como aquecimento, agitação, radiações ultravioleta ou visível, raios x, ou de agentes químicos como ácidos e bases fortes, solventes orgânicos (como etanol ou acetona), detergentes, soluções concentradas de uréia e cloreto de guanidina e metais pesados (como chumbo ou mercúrio) (MORAES *et al.*, 2013). A estabilidade e integridade estrutural de proteínas oligoméricas são determinadas por suas interações inter e intracadeias (SRINIVAS *et al.*, 2001) e os fatores descritos são importantes por terem a capacidade de influenciar as interações (ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas, interações de Van der Waals) da estrutura nativa das proteínas, pois em condições desfavoráveis as interações que as mantêm em sua conformação nativa poderão se desestabilizar, prejudicando a sua funcionalidade. Valores extremos de pH podem induzir a uma desnaturação protéica, expondo regiões hidrofóbicas, o que poderá gerar agregados (por interação hidrofóbica) levando à precipitação. Mudanças bruscas de temperatura podem levar à desnaturação protéica afetando seu funcionamento e solubilidade por desnaturar as proteínas, o que na maior parte dos casos leva à formação de agregados e precipitação. É interessante observar que a desnaturação também pode ocorrer em baixas temperaturas, sendo que cada proteína terá uma determinada estabilidade para uma dada temperatura (MORAES *et al.*, 2013).

2.3.5.1 Extração de proteínas

Uma típica proteína globular apresenta na superfície regiões polares com cargas positivas e negativas, regiões polares sem carga ou hidrofílicas, e regiões apolares ou hidrofóbicas, e a distribuição dos resíduos hidrofóbicos e hidrofílicos na superfície das proteínas determinará sua solubilidade em diferentes solventes. O caráter polar ou apolar é

determinado, sobretudo, pelos resíduos de aminoácidos que se encontram na superfície da proteína (PESSOA JÚNIOR; KILIKIAN, 2005).

Além dos aminoácidos, outras moléculas que fazem parte da estrutura da proteína podem influenciar a solubilidade das proteínas. Íons, oligossacarídeos (glicoproteínas) e lipídeos (lipoproteínas) são esses agentes. As glicoproteínas são solúveis em soluções aquosas, pois os resíduos de carboidrato são fortemente hidratados, enquanto as lipoproteínas são relativamente insolúveis em virtude da natureza hidrofóbica do componente lipídico (PESSOA JÚNIOR; KILIKIAN, 2005).

A formação compacta de uma proteína globular é resultado das múltiplas dobras da cadeia polipeptídica, efeito conhecido como enovelamento (*folding*), em que as principais forças estabilizadoras são as interações intramoleculares, como ligações de hidrogênio, interações de Van der Waals (interações hidrofóbicas) e pontes salinas. Em solução aquosa o *folding* é movido pela hidrofobicidade de tal forma que os resíduos carregados e polares tendem a se encontrar no exterior da proteína e os resíduos apolares são encontrados no interior da molécula. A proteína assume a conformação de acordo com sua sequência de aminoácidos e promove o mínimo contato dos resíduos hidrofóbicos com o solvente aquoso, ou seja, ocorre uma interiorização dos resíduos hidrofóbicos, maximizando as interações entre resíduos polares e o solvente. Mesmo assim, alguns resíduos hidrofóbicos permanecem na superfície em contato com o solvente (PESSOA JÚNIOR; KILIKIAN, 2005).

Extratos lectínicos podem ser feitos a partir de uma solução salina (KONOZY *et al.*, 2003) ou usando tampões (WITITSUWANNAKUL *et al.*, 1998; OLIVEIRA *et al.*, 2002; SUSEELAN *et al.*, 2002; ROJO *et al.*, 2003; ROUGÉ *et al.*, 2003). Para a preparação do extrato, o material é submetido à extração sob determinado período de tempo e condições de temperatura estabelecidas, sob agitação constante.

A partir do extrato bruto, as proteínas podem ser isoladas por alguns métodos, tais como o fracionamento de proteínas através da precipitação destas pelo aumento da concentração de sais no meio (*salting out*). O sulfato de amônio, altamente hidrofílico, remove a camada de solvatação das proteínas fazendo com que as mesmas se precipitem (DELATORRE *et al.*, 2006). Em alguns casos a precipitação salina da lectina com o sulfato de amônio estabiliza a atividade hemaglutinante mesmo após o armazenamento prolongado (KENNEDY *et al.*, 1995). O polietilenoglicol (PEG) pode ser empregado também nesta etapa a fim de se obter as proteínas precipitadas pela remoção da proteína do meio aquoso (PESSOA JÚNIOR; KILIKIAN, 2005). A presença de um inibidor de proteína ou carboidrato natural

tem sido sugeridos para justificar os altos rendimentos obtidos após extração ou precipitação salina (KOLBERG; SLETTEN, 1982; AGRAWAL; GOLDSTEIN, 1972).

As lectinas parcialmente purificadas pelo tratamento salino são geralmente submetidas ao processo de diálise exaustiva em membranas semipermeáveis, método baseado na separação de moléculas por diferenças de peso molecular; as proteínas ficam retidas dentro da membrana enquanto moléculas menores (como carboidratos ou sais), presentes na amostra, passam para a solução solvente (THAKUR *et al.*, 2007).

2.3.5.2 Métodos cromatográficos

As operações cromatográficas são empregadas para isolar e purificar o metabólito de interesse dos demais, levando-o à pureza adequada ao seu uso.

Idealmente, a purificação desejada deve ser alcançada em uma única etapa cromatográfica a fim de evitar perdas do produto. A aplicação de mais de um processo, porém, pode ser necessária e eficiente, tendo em vista os fundamentos distintos que regem a separação em cada método, o que possibilita a eliminação de diferentes impurezas por métodos distintos (PESSOA JÚNIOR; KILIKIAN, 2005).

As lectinas podem ser purificadas à homogeneidade através de cromatografia de afinidade (SUN *et al.*, 2007), cromatografia de troca iônica (SANTI-GADELHA *et al.*, 2006) ou cromatografia de gel filtração (MOURA *et al.*, 2006). O que varia, principalmente, são as matrizes que são utilizadas nessas cromatografias, cuja escolha depende da especificidade a carboidratos (cromatografia de afinidade), carga líquida (cromatografia de troca iônica) e tamanho molecular da proteína (cromatografia de gel filtração).

A cromatografia por afinidade é uma técnica de separação que depende das interações altamente específicas entre materiais biológicos, como por exemplo: enzima-substrato, enzima-inibidor, antígeno-anticorpo e lectina-carboidrato. Um dos componentes dessa interação, o ligante, é imobilizado em um suporte insolúvel, matriz porosa, e o outro componente é seletivamente adsorvido neste ligante previamente imobilizado. O componente adsorvido pode ser eluído com uma solução que enfraqueça as interações entre os dois componentes. Baseado neste princípio, torna-se possível separar uma proteína a partir de uma mistura biológica complexa, com base no reconhecimento e ligação da molécula-alvo às estruturas específicas. Diferente das outras técnicas cromatográficas, o fundamento para a separação das moléculas não se baseia nas diferenças das propriedades físico-químicas como massa molar, solubilidade, hidrofobicidade e ponto isoeletrico, mas na afinidade

biológica (PESSOA JÚNIOR; KILIKIAN, 2005). A aplicação desta técnica à purificação de lectinas fundamenta-se na habilidade das lectinas se ligarem especificamente a suportes polissacarídicos, através de ligações não-covalentes. A proteína desejada é obtida com alto grau de pureza, alterando-se as condições de pH, força iônica ou pela eluição com uma solução contendo um competidor (PEUMANS; VAN DAMME, 1998). Para o isolamento eficaz de um carboidrato ou glicoproteína, o desenvolvimento de um suporte de afinidade contendo lectina imobilizada é uma alternativa (ROSENFELD *et al.*, 2005; LARSEN *et al.*, 2006).

A cromatografia de troca iônica é comumente utilizada para purificar proteínas por apresentar a característica de ser simples, de fácil ampliação de escala, alta resolução, alta capacidade de adsorção e versatilidade, além de poder ser aplicada de forma analítica ou preparativa, seja na pesquisa ou na indústria. Nesta cromatografia há uma etapa de adsorção reversível de moléculas de solutos eletricamente carregados a grupos com cargas opostas, imobilizadas na fase sólida. Os solutos adsorvidos são subsequentemente eluídos após serem trocados por outros íons, com mesmo tipo de carga, porém com maior afinidade pela fase estacionária. São os diferentes graus de afinidade eletrostática entre a fase estacionária e os íons da fase móvel que regem esse tipo de cromatografia. Tendo em vista que as proteínas possuem uma carga elétrica líquida, resultante do somatório entre as cargas positivas e negativas dos grupamentos em sua superfície, estas moléculas podem se ligar à uma matriz sólida contendo grupos com cargas elétricas opostas, permitindo a separação entre proteínas e contaminantes.

Os contra-íons, ou íons de substituição, serão os responsáveis pela competição com a proteína pela matriz sólida, causando a dessorção das proteínas da matriz. Para isto, estes íons devem possuir carga elétrica do mesmo tipo da proteína (PESSOA JÚNIOR; KILIKIAN, 2005).

Como a maioria das proteínas tem como característica marcante o peso molecular elevado, a cromatografia de gel de filtração ou de exclusão molecular pode ser aplicada para separar as proteínas de acordo com o tamanho. O princípio básico desse método é que as moléculas sofrem partição, em virtude das diferenças de tamanho entre elas, quando se encontram entre uma fase móvel (solvente) e uma fase estacionária de porosidade definida. Assim, uma mistura de proteínas dissolvidas em solução flui, por gravidade ou com o auxílio de bombas de pressão, por uma coluna preenchida por esferas microscópicas de material polimérico poroso altamente hidratado e inerte, previamente lavado e equilibrado apenas com tampão. A fase estacionária caracteriza-se por apresentar uma faixa de fracionamento, o que

significa que moléculas nessa faixa de massa molecular podem ser separadas. As moléculas menores podem penetrar em todos os poros da matriz e, então, movem-se lentamente ao longo da coluna, tendo acesso tanto à fase móvel no interior dos poros quanto à existente entre as partículas. Assim, em um cromatograma, as moléculas menores são as últimas a deixar a coluna e as maiores, por sua vez, são eluídas antes que as outras. Esta modalidade de cromatografia constitui a mais suave e a mais simples de todas (PESSOA JÚNIOR; KILIKIAN, 2005). A vantagem dessa técnica não é apenas separar a proteína desejada, mas também preservar o padrão natural de glicosilação (LARSEN *et al.*, 2006; OPTIZ *et al.*, 2007), pois as proteínas possuem um grande número de grupos reativos e podem ser imobilizados sem a destruição de sua estrutura ou função (MONZO *et al.*, 2007).

2.3.5.3 Métodos eletroforéticos

Métodos eletroforéticos são utilizados para a caracterização estrutural das lectinas (STRYER *et al.*, 2004), assim como para verificar o grau de pureza das mesmas (COELHO; SILVA, 2000). Através dessa técnica, a separação de macromoléculas proteicas pode ser feita aplicando-se um campo elétrico numa matriz sólida de gel de poliacrilamida (PAGE) que contém a mistura de interesse. Esse método baseia-se na migração das moléculas em relação a um campo elétrico, devido à sua carga (STRYER *et al.*, 2004). O gel funciona como uma peneira molecular, permitindo a separação das proteínas por peso molecular (HAMES, 1998). O gel de poliacrilamida é constituído de um polímero de acrilamida cuja polimerização ocorre na presença de radicais livres, os quais são gerados pelo persulfato de amônio e estabilizados pelo TEMED (N,N,N',N'-tetrametilenodiamino). A polimerização também depende da presença do N,N'-metileno-bis-acrilamida, que facilita a ligação das cadeias entre si, formando um gel cuja porosidade é determinada pelo comprimento das cadeias e pelo grau de interligação entre estas. (BUDOWLE; ALLEN, 1991)

A separação de proteínas pode ocorrer em condições desnaturantes, desdobrando a proteína em suas subunidades constituintes e revelando a massa molecular das mesmas (PAIVA *et al.*, 2011a). A mistura de proteínas é dissolvida em tampão de amostra. Este tampão de amostra contém dodecil sulfato de sódio (SDS), que é um detergente aniônico que rompe as ligações não covalentes existentes na proteína nativa, resultando na sua desnaturação. Neste tampão também pode conter β -mercaptoetanol, que reduz as pontes de dissulfeto existentes na proteína. (LAEMMI, 1970)

A eletroforese bidimensional é um método de separação extremamente eficiente porque as proteínas em uma amostra são separadas simultaneamente através da combinação de duas etapas fornecendo informações sobre o seu ponto isoelétrico, massa molecular, expressão, abundância relativa e modificações pós-traducionais, verificadas pela alteração da mobilidade eletroforética (PANDEY; MANN, 2000).

Dependendo da natureza dos complexos de proteínas a serem resolvidos, em 2D-PAGE podem incluir focagem isoelétrica (IEF) ou eletroforese em gel de poliacrilamida de uréia-ácido acético (AU-PAGE) na primeira dimensão, seguido de eletroforese em gel de poliacrilamida em dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) na segunda. Portanto, esta técnica combina fracionamento de proteínas de acordo com o ponto isoelétrico no IFE ou tamanho e carga líquida na AU-PAGE com a separação de acordo com os seus pesos moleculares nos géis de SDS-PAGE. (GÖRG *et al.*, 2004; WEISS; GÖRG, 2009).

Na grande maioria dos casos, a segunda dimensão é arranjada em SDS-PAGE. A fim de maximizar a resolução, a primeira dimensão deve ser tão espaçada quanto possível, em princípios de separação. Embora este seja um conceito muito vago para eletroforeses bidimensionais não clássicas, a primeira dimensão geralmente cai em três categorias principais, nomeadamente i) eletroforese de zona de desnaturação (BOOTH, 1977; MACFARLANE, 1989), ii) eletroforese de zona nativa (SCHÄGGER; VON JAGOW, 1991) e na maioria dos casos iii) focalização isoelétrica desnaturante (MACGILLIVRAY; RICKWOOD, 1974; O'FARRELL, 1975).

Por todas estas três configurações básicas, muitas mudanças e adaptações foram concebidas ao longo dos anos para melhorar o desempenho da separação eletroforética bidimensional e/ou adaptá-las às necessidades experimentais. A palavra desempenho pode englobar resolução de analitos, janela de análise em termos de parâmetros de proteína, capacidade de carga e qualquer tipo de combinação destes parâmetros (CHIARI; RIGHETTI, 1992; MILLER *et al.*, 2006; WITTIG; SHÄGGER, 2008).

2.3.5.4 Métodos espectroscópicos

2.3.5.4.1 Espectroscopia de massas

A análise por espectroscopia de massas é uma maneira analítica extremamente útil e versátil para identificação ou caracterização química de peptídeos e proteínas. Um espectrômetro de massa é formado basicamente de duas partes: o sistema de ionização das

moléculas, responsável por vaporiza-las e carregá-las eletricamente, e o analisador de massa ã o espectrômetro de massa propriamente dito ã que separa os íons resultantes de acordo com as massas (CUNHA, 2006). A amostra é submetida a condições experimentais específicas; então as moléculas se ionizam e vaporizam e os íons de valores variados de massa/carga (m/z) são separados e detectados. O conjunto de valores m/z obtido possibilita a determinação da(s) massa(s) molar(es) e estrutura(s) primária(s) dos peptídeo(s) e proteína(s) em estudo (PESSOA JÚNIOR; KILIKIAN, 2005).

Três modalidades de espectroscopia de massa são aplicáveis atualmente à análise de peptídeos: por bombardeamento rápido de átomos (*Fast Atom Bombardment Mass Spectroscopy*, FAB-MS), por *spray* de elétrons (*Electrospray Ionization Mass Spectroscopy*, ESI-MS) e por dessorção de matriz assistida por laser (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectroscopy*, MALDI-MS). Para a determinação de massa molar de proteínas são utilizadas as duas últimas modalidades, devido à faixa de detecção de massa molar de até 7000 Da (FAB-MS), até 300.000 Da (ESI-MS) e até 70.000 Da (MALDI-MS) (PESSOA JÚNIOR; KILIKIAN, 2005).

Uma amostra proteica, sob análise na modalidade MALDI, é misturada uniformemente com uma matriz ácida, a qual transfere prótons à amostra. A matriz absorve o laser de nitrogênio (UV, comprimento de onda = 337nm) convertendo-o em energia térmica. Então, a pequena matriz é aquecida rapidamente (frações de nanosegundos) sendo vaporizada com a amostra. A dessorção das moléculas da matriz e da proteína faz com que elas passem para o estado gasoso. Estar na forma ionizada e no estado gasoso é a condição para que uma molécula possa ser analisada por espectrometria de massas. Diferentes tamanhos de íons positivos e negativos são extraídos da amostra e assumem uma direção devido à existência de diferença de potencial entre o suporte da amostra e o eletrodo (CUNHA, 2006).

Combinado com o método acima, o sistema TOF (Time-Of-Flight ou Tempo-de-Vôo) é uma forma de detector do espectrômetro de massa, o qual utiliza a diferença de tempo-de-vôo graças às diferenças de tamanho das substâncias ionizadas. Nesse sistema, as moléculas ionizadas são aceleradas em um tubo sob vácuo e sem campo elétrico para a medida do seu tempo de vôo até o detector. Esse tempo de vôo é proporcional à massa molar da molécula. Há uma diferença de potencial e é constante para todos os íons. Então, quanto mais leve o íon, mais rápido este "voa" através do espaço entre a amostra e o detector. Desta forma, a variação das massas dos íons - indicada através da diferença de tempo de vôo dos mesmos - é utilizada na espectrometria de massa, sendo conhecida como MALDI-TOF (CUNHA, 2006).

Trabalhos de sequenciamento por espectroscopia de massa são conduzidos normalmente em equipamentos conjugados, ou seja, que possuem pelo menos dois analisadores de massa. Tais equipamentos associam dois analisadores de massa em série e, por isso, a técnica é conhecida como MS/MS (*Mass Spectrometry*), por alusão a uma espectroscopia de massa seguida de outra. Então, equipamentos com ionização do tipo MALDI com dois analisadores TOF, por exemplo, são citados como MALDI-TOF/TOF (CUNHA, 2006).

2.3.5.4.2 Espectroscopia de Dicroísmo circular

Dicroísmo circular (DC) é uma das mais sensíveis técnicas físicas para determinar estruturas e monitorar alterações estruturais de biomoléculas. Pode-se interpretar diretamente as mudanças da estrutura secundária proteica, apesar do método ser empírico (FASMANet *al.*, 1996).

A luz polarizada plana pode ser vista como sendo constituída por dois componentes polarizados circularmente de igual magnitude, um com rotação anti-horária (canhoto, L) e o outro no sentido horário (destro, R). Dicroísmo circular (DC) refere-se à absorção diferencial destes dois componentes. Se, após a passagem através da amostra a ser analisada, os componentes L e R não são absorvidos ou são absorvidos em graus iguais, a recombinação de L e R regeneraria a radiação polarizada no plano original. No entanto, se L e R são absorvidos em diferentes graus, a radiação resultante possui polarização elíptica. Um sinal de DC é observado quando um cromóforo é opticamente ativo por uma das seguintes razões: (a) é intrinsecamente quiral devido à sua estrutura, por exemplo, um átomo de C com quatro substituintes diferentes, ou a ligação dissulfeto que é quiral por causa dos ângulos diedros da cadeia de átomos de carbono, (b) está covalentemente ligado a um centro quiral na molécula, ou (c) é colocado num ambiente assimétrico em virtude da estrutura tridimensional adotada pela molécula. Os equipamentos de DC (conhecidos como espectropolarímetros) medem a diferença de absorbância entre os componentes R e L da luz circularmente polarizada, mas geralmente, referem-se em termos de elipcidade (") em graus (KELLY, 2005).

Num equipamento de DC, a luz polarizada plana é dividida nos componentes L e R pela passagem através um modulador submetido a um campo elétrico alternado (50 kHz é a frequência mais comumente empregada). O campo elétrico alternado induz alterações estruturais do cristal de quartzo, as quais fazem a placa de transmissão de luz com polarização

circular nos extremos do campo. À medida que a radiação emitida é alternada entre componentes R e L, estes são detectados, por sua vez, pelo fotomultiplicador (KELLY, 2005).

No que diz respeito aos requisitos do DC, deve notar-se que certos sistemas de tampão também podem causar problemas devido à sua elevada absorbância a comprimentos de onda baixos no espectro UV ou por interações indesejáveis, tais como agentes quelantes de íons metálicos essenciais, o que pode ser um problema com os tampões de fosfato, por exemplo. O tipo de solvente, a concentração da amostra e o comprimento da trajetória óptica podem ser modificados para melhorar a qualidade do espectro medido (KELLY, 2005).

A conformação de uma molécula está intimamente relacionada à sua atividade óptica e, por isso, esta técnica é muito utilizada para monitorar mudanças conformacionais, bem como para estimar o conteúdo de estrutura secundária de proteínas. O espectro de DC pode apenas prover estimativas de percentual de resíduos de aminoácidos na estrutura secundária (WOODY *et al.*, 1994).

Os principais grupos opticamente ativos das proteínas são as ligações amida da cadeia peptídica, monitoradas na região do ultravioleta (UV) distante (190-250 nm); as cadeias laterais aromáticas e as ligações dissulfeto, monitoradas no UV próximo (250-360 nm)(FASMAN, 1996).

A facilidade da mensuração através do DC é atraente, mas ao contrário de outras duas técnicas poderosas (difração de raios-x de cristais de proteínas e RMN para soluções de proteínas) não pode determinar a estrutura tridimensional proteica. Estes métodos empíricos utilizam um conjunto de proteínas de referência com estrutura conhecida a partir de estudos com difração de raios-x. Então, essas proteínas são presumidas terem a mesma estrutura no estado cristalino e na solução aquosa (FASMAN, 1996).

Há quatro níveis de estrutura proteica. Cada proteína tem uma sequência definida de aminoácidos, que constitui o primeiro nível de organização, a estrutura primária. O próximo nível, a estrutura secundária, refere-se aos arranjos regulares do esqueleto da cadeia polipeptídica em α -hélice, folhas β e dobra β . O dobramento dos segmentos da estrutura secundária em uma molécula compacta em toda a cadeia polipeptídica é chamada estrutura terciária. Aquelas proteínas com subunidades arranjadas de maneira regular são ditas ter um quarto nível de organização, a estrutura quaternária (FASMAN, 1996). Portanto, devido ao perfil espectral particular destes arranjos entre 190 e 250 nm (região ultravioleta distante), o DC pode identificar diferentes tipos de estrutura secundária como α -hélice, folhas β e estruturas desordenadas (WOODY *et al.*, 1994).

Proteínas podem ser agrupadas em quatro ou cinco classes, incluindo a estrutura desordenada, de acordo com suas estruturas secundárias. Proteínas somente α têm apenas α hélice, e somente β têm quase exclusivamente folhas β . É entendido que aquelas somente α ou somente β não significa que possuam 100% α -hélice ou folhas β . Proteínas α/β têm α -hélice e folhas β geralmente em domínios diferentes, enquanto que proteínas β/α têm segmentos alternados ao longo da cadeia peptídica. A quinta classe refere-se às proteínas desordenadas ou desnaturadas que têm pouca estrutura organizada. (FASMAN, 1996).

Uma proteína somente α mostra um forte mínimo duplo em 222 e 208-210 nm e um forte máximo em 191-193 nm, que são característicos de uma α -hélice (Tabela 4). A intensidade das 3 bandas reflete a quantidade da helicidade na proteína. Uma proteína somente β usualmente tem uma banda simples e negativa, e outra banda simples e positiva, cujas intensidades são muito mais baixas que aquelas de α -hélice (Tabela 4). Seus espectros de DC podem variar consideravelmente entre todas as proteínas somente β . Todas as proteínas somente β regulares se assemelham ao espectro de DC das folhas β (Lys)_n, e usualmente tem uma banda mínima simples entre 210-225 nm e uma banda forte máxima entre 190-200 nm.

Recentemente, um segundo conjunto de proteínas somente β relatadas por Manavalan e Johnson (1983) foi denominado de proteínas β -II. Seus espectros de DC têm uma banda forte negativa próximo de 200 nm similar àquelas encontradas para as formas desordenadas. De acordo com os dados da difração de raio-x, essas folhas β ou são altamente distorcidas ou feitas de uma fita β curta, irregular.

Para proteínas α/β , as intensidades do espectro de DC relataram uma α -hélice usualmente predominante sobre as folhas β . Então, ambas as classes de proteínas geralmente mostram duas bandas negativas em 222 e 208-210 nm e uma positiva próximo de 190-195 nm, similar às proteínas somente α (Tabela 4). Às vezes uma banda simples e larga aparece entre 210-220 nm por causa da sobreposição de várias bandas de α -hélices e folhas β . Para as proteínas β/α o mínimo é sempre enviesado em direção à banda em 220 nm quando há uma banda larga mínima (Tabela 4).

A classe de proteínas desordenadas inclui muitos oligopeptídeos, polipeptídeos curtos com ligações dissulfeto ou grupos prostéticos e proteínas desnaturadas. Estes oligo- e polipeptídeos usualmente mostram um espectro de DC com uma forte banda negativa próxima a 200 nm e alguns picos entre 220-230 nm, que podem ser ou positivo ou negativo (Tabela 4) (FASMAN, 1996).

A estimativa de frações de estrutura secundária está apoiada no conceito de que o espectro de DC de uma proteína é uma combinação linear de todas as frações de estrutura

secundária que a constitui. Dada à complexidade do espectro, a determinação quantitativa da estrutura secundária de uma proteína apenas pela análise do espectro de DC é inviável. Por outro lado, os métodos de desconvolução de espectros extraem diretamente as componentes comuns dos espectros experimentais de DC, permitindo a obtenção de suas curvas puras (hélices- α , folhas- β , voltas- γ , estruturas desordenadas, contribuição de resíduos aromáticos, pontes dissulfeto) e porcentagens que representam no espectro (SREERAMA; WOODY, 2000).

2.3.5.4.3 Espectroscopia de Fluorescência

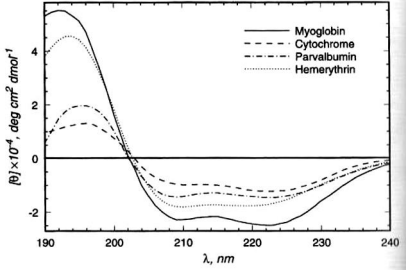
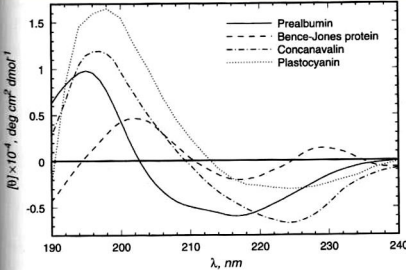
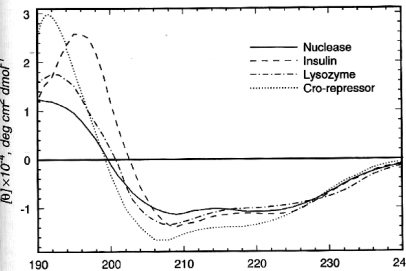
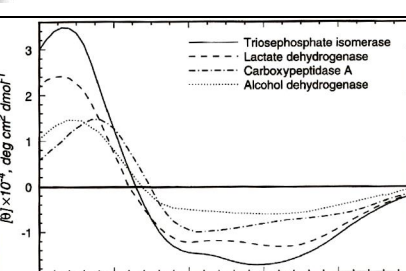
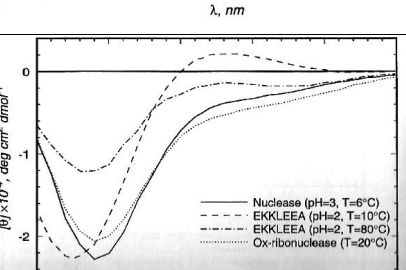
A fluorimetria é muito utilizada para o estudo de alterações conformacionais em proteínas, baseando-se na emissão da radiação eletromagnética devido a transições eletrônicas entre os estados eletrônicos excitados e estados de menor energia. (LAKOWICZ, 1983).

Tendo absorvido energia e atingido um nível mais elevado de vibração, a molécula rapidamente perde seu excesso de energia vibracional por colisão e cai para o menor nível vibracional. A molécula pode retornar a qualquer dos níveis de vibração do estado fundamental, emitindo a sua energia sob a forma de fluorescência.

Na prática, os espectros de absorção e emissão raramente coincidem exatamente. A diferença representa uma pequena perda de energia pela interação da molécula de absorção com moléculas de solvente circundante. A absorção de energia para produzir o primeiro estado animado não perturba muito a forma da molécula e isto significa que os níveis distribuição da vibração são muito similares entre o estado fundamental e o primeiro estado excitado. As diferenças de energia entre as bandas do espectro de emissão serão semelhantes às do espectro de absorção e, frequentemente, o espectro de emissão será aproximadamente a imagem espelhada do espectro de absorção. Uma vez que a emissão de fluorescência ocorre sempre a partir do nível mais baixo vibracional do primeiro estado animado, a forma do espectro de emissão é sempre o mesmo, apesar da alteração do comprimento de onda da luz de excitação (PERKINELMER, 2000).

Dois tipos de cromóforos são usados em análise de fluorescência de macromoléculas: fluoróforos intrínsecos (contidos nas macromoléculas) e fluoróforos

Quadro 4 -Espectros representativos de dicroísmo circular de acordo com a estrutura secundária

Estrutura secundária	Bandas	Espectro de DC representativo
Somente $\bar{U}$	- forte mínimo em 222 nm; - forte mínimo entre 208-210 nm; - forte máximo em 191-193 nm.	
Somente $\bullet$	- mínima entre 210-225 nm; - forte positiva entre 190-200 nm.	
$\bar{U}+\bullet$	- negativa em 222 nm; - forte negativa entre 208-210 nm; - forte positiva entre 190-195 nm.	
$\bar{U}\bullet$	- forte negativa em 220 nm; - negativa entre 208-210 nm; - forte positiva entre 190-195 nm	
Desordenadas	- forte negativa em 200 nm; - alguns picos entre 220-230 nm, podem ser ou positivo ou negativo.	

Fonte: Fasman (1996)

extrínsecos (adicionados ao sistema). As proteínas contêm cromóforos intrínsecos, os resíduos de aminoácidos triptofano, tirosina e fenilalanina, cuja fluorescência é altamente específica e sensível ao ambiente em que se encontram. Pequenas mudanças conformacionais envolvendo, em particular o triptofano, e/ou suas vizinhanças, induzem resultados distintos no espectro de emissão da fluorescência, no rendimento quântico ou no deslocamento do máximo de emissão (LAKOWICZ, 1983).

Em uma proteína, a emissão da fluorescência é a soma das contribuições de seus fluoróforos individuais, que dependem do microambiente de cada resíduo. Pequenas alterações neste microambiente são reveladas pela fluorescência. Portanto, essa técnica é capaz de estudar ocorrências de mudanças conformacionais locais em nível terciário, principalmente na vizinhança dos resíduos de aminoácidos aromáticos, permitindo inferir-se sobre o microambiente destes resíduos no composto em estudo (LUCCA *et al.*, 2005).

As lectinas podem também ser caracterizadas por fluorescência quanto às estruturas primária, secundária, terciária e quaternária (TRINDADE *et al.*, 2006; NAEEM *et al.*, 2007; SOL *et al.*, 2007; TERADA *et al.*, 2007).

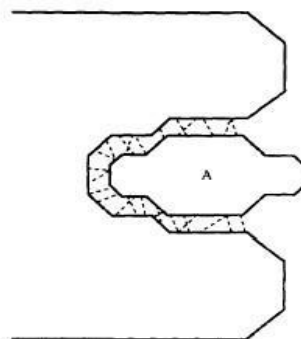
2.3.6 Detecção e especificidade

As lectinas são, em sua maioria, di ou polivalentes e são capazes de formar pontes entre carboidratos ou glicoproteínas, que se apresentam em solução ou ligadas à membrana celular (Figura 4) (CORREIA *et al.*, 2008).

A presença de lectinas em uma amostra pode ser facilmente detectada a partir de ensaios de aglutinação, nos quais elas interagem com carboidratos da superfície celular através de seus sítios, formando diversas ligações cruzadas reversíveis entre células distintas (Figura 5).

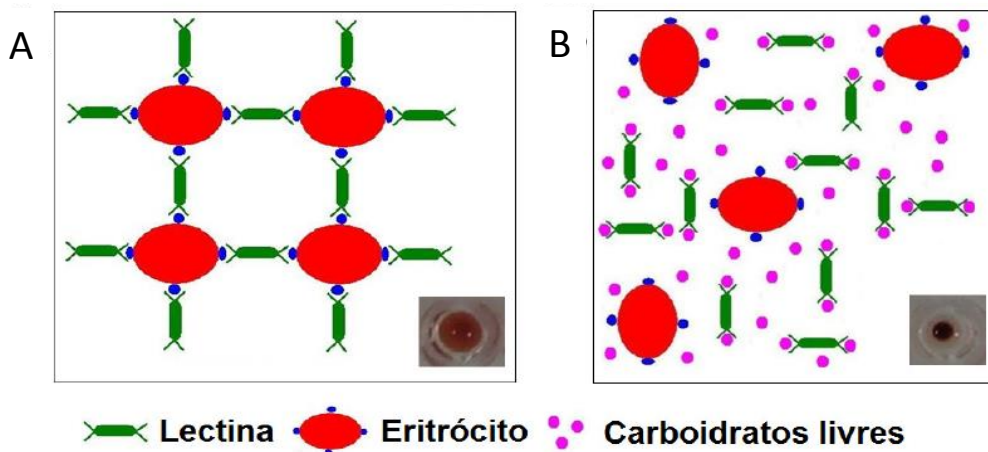
As lectinas podem aglutinar diversos tipos de células. O ensaio mais comumente utilizado é o de hemaglutinação, o qual é realizado através de uma diluição seriada da amostra contendo lectina e posterior incubação com eritrócitos; a rede formada entre os eritrócitos constitui o fenômeno de hemaglutinação. O inverso da maior diluição em que se observa a hemaglutinação (título) corresponde à atividade hemaglutinante (AH) (SANTOS *et al.*, 2005).

Figura 4 -Representação esquemática da ligação da lectina a um carboidrato (A). As linhas pontilhadas representam pontes de hidrogênio



Fonte: Kennedy *et al.* (1995).

Figura 5 -Esquema representando a aglutinação de eritrócitos promovida por lectinas. Rede de aglutinação formada pela ligação de uma lectina aos carboidratos da superfície dos eritrócitos (A). Inibição da formação da rede de aglutinação por carboidratos livres



Fonte: Paiva *et al.* (2011b).

A atividade hemaglutinante é detectada pela formação de uma rede ou malha decorrente da interação entre a lectina e os carboidratos presentes na membrana dos eritrócitos (NAEEM *et al.*, 2007). O ensaio possibilita, além da sua detecção, determinar a especificidade de uma lectina, para carboidratos e/ou eritrócitos. Os eritrócitos utilizados podem ser de humanos ou de animais, os quais podem ser tratados enzimaticamente (com tripsina, papaína,

entre outras) ou quimicamente (com glutaraldeído ou formaldeído), aumentando ou não a sensibilidade das células à lectina (COELHO; SILVA, 2000; SANTOS *et al.*, 2005).

Lectinas de *Lotus tetragonolobus* e *Ulex europaeus*, ambas específicas de fucose, são empregadas para identificar células tipo O; a lectina de *Vicia gramínea*, específica para sangue tipo N, para diferenciar células N e M e a aglutinina PNA de *Arachis hypogaea*, específica para Gal (•1-3) GalNAc é empregada na detecção de poliaglutinação, uma condição que acompanha processos de infecção viral e bacteriana, no qual eritrócitos humanos tornam-se aglutináveis por anticorpos normalmente presentes no soro de indivíduos adultos (LIS; SHARON, 1998).

Para assegurar que o agente aglutinante é uma lectina, são necessários ensaios subseqüentes de inibição da AH, utilizando-se uma solução do carboidrato ligante livre em solução (WU *et al.*, 2006).

A avaliação da AH de lectinas também pode ser realizada em diversas condições: em diferentes valores de pH; após serem submetidas a distintas temperaturas; após exposição a enzimas proteolíticas e na presença de íons. O pH tem efeito variado sobre as lectinas, podendo ou não afetar a AH (WITITSUWANNAKUL *et al.*, 1998). Algumas lectinas perdem sua atividade em determinada faixa de pH (KONOZY *et al.*, 2003) por causa da desnaturação proteica causada (MORAES *et al.*, 2013). Quanto ao efeito da temperatura, algumas lectinas permanecem estáveis até 55-65°C, outras até 95°C (SUSEELAN *et al.*, 2002), e a partir de então, com a elevação da temperatura a AH decai até ser anulada após haver desnaturação ou permanecer inalterada. Após tratamento com enzimas proteolíticas, a AH da lectina pode ser alterada ou não (WITITSUWANNAKUL *et al.*, 1998), uma vez que os aminoácidos do domínio de reconhecimento aos carboidratos em lectinas intactas ou parcialmente digeridas podem vir a se ligar aos seus substratos (KING *et al.*, 1980).

Os aminoácidos têm capacidade de se complexarem com íons Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} e outros através do grupo NH_2 e carboxílico e formarem quelatos relativamente estáveis. Essa propriedade dos aminoácidos e, portanto, das proteínas, é explorada na ativação da atividade hemaglutinante e em métodos de separação baseados na afinidade entre proteínas e íons metálicos (PESSOA JÚNIOR; KILIKIAN, 2005). Muitas lectinas contêm metais e, em alguns casos, existe evidência da necessidade de íons para sua atividade (SHARON; LIS, 1990). A lectina de *E. speciosa*, por exemplo, é um metaloproteína que contém Ca^{2+} e Mn^{2+} , quando tratada com EDTA, sua AH é totalmente perdida e restaurada após a adição de Ca^{2+} e Mn^{2+} (KONOZY *et al.*, 2003). Por outro lado, a lectina de *H. tuberosus* não teve sua AH abolida quando tratada com EDTA (SUSEELAN *et al.*, 2002).

2.3.7 Propriedades biológicas e potencial biotecnológico de lectinas

As lectinas, por terem a habilidade de se ligar a mono e oligossacarídeos, apresentam uma variedade de efeitos biológicos, alguns dos quais servindo como base para a aplicação de lectinas na investigação de atividades químicas e biológicas, tais como ações como: estimulação da proliferação de linfócitos (MACIEL *et al.*, 2004), macrófagos (ANDRADE *et al.*, 1999) e neutrófilos (TIMOSHENKO *et al.*, 1995), estimulação da produção de interferon- γ por linfócitos (MELO *et al.*, 2010), atividade antiinflamatória (MELO *et al.*, 2010), antitumoral (FANG *et al.*, 2010; NUNES *et al.*, 2012), antifúngica (SÁ *et al.*; 2009a; SANTANA *et al.*, 2009; SOUZA *et al.*, 2011), na elucidação da estrutura de proteínas e carboidratos (KENNEDY *et al.*, 1995), antibacteriana (SANTI-GADELHA *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2008; SÁ *et al.*, 2009b; NUNES *et al.*, 2011), antiviral (SATO *et al.*, 2011), hipotensiva (WANG *et al.*, 1996), antinociceptiva (FIGUEIREDO *et al.*, 2009) e inseticida (MACEDO *et al.*, 2007; SÁ *et al.*, 2009b; PAIVA *et al.*, 2011a; OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Devido ao fato de algumas lectinas possuírem habilidade para mediar mucoadesão, citoadesão e citoinvasão de drogas (GABOR *et al.*, 2004), essas moléculas têm sido exploradas em sistemas de liberação de drogas, já que células tumorais ou alteradas expressam glicanas de superfície celular diferentes das células normais; podendo ser utilizadas como potencializadoras da absorção de drogas, pois ao adicionar o transporte vesicular, algumas lectinas são endocitadas pelas células epiteliais do trato gastrointestinal, como mostram os estudos com aglutinina de gérmen de trigo (WGA), ConA e lectina de tomate (BIES *et al.* 2004, LEHR, 2000). Lectina de folhas de *Bauhinia monandra* (pata-de-vaca) e a lectina de *Lens culinaris* (lentilha) foram incorporadas e também adsorvidas na superfície de nanopartículas, mostrando ser ferramentas potenciais em medicamentos de administração oral, com liberação controlada (RODRIGUES *et al.*, 2003).

A observação de que os carboidratos podem gerar uma variedade ampla de isômeros devido à disponibilidade de vários grupos hidroxilas para a formação de ligações glicosídicas levou os pesquisadores a compreender que os carboidratos complexos, por sua microheterogenicidade, eram moléculas que podem estar envolvidas em processos de sinalização e transferência de informação entre células. Assim, a abordagem do sistema de codificação biológica, sem a inclusão dos carboidratos, seria incompleta (RÜDIGER *et al.*, 2000; GABIUS *et al.*, 2002).

Nesse sentido, as lectinas têm sido usadas como ferramentas de destaque no campo da tecnologia de bioreconhecimento. Com base na elevada capacidade de reconhecimento de carboidratos, as lectinas se tornaram importantes em investigações estruturais e funcionais dos carboidratos complexos e seu mapeamento a fim de analisar as mudanças na superfície celular durante processos fisiológicos e patológicos (SHARON; LIS, 2001; GEMEINER *et al.*, 2009; XIE *et al.*, 2009), diferenciação e transformação neoplásica (LI *et al.*, 2008) e no tratamento de condições pré-cancerosas (WROBLEWSKI *et al.*, 2001). Dessa forma, as lectinas permitem sua utilização na Histologia e Patologia como ferramentas em ensaios citoquímicos para localização de glicoconjugados e resíduos glicosilados e como ferramentas histoquímicas para análises de estruturas de tecidos humanos normais e alterados (FRANCESCHINI *et al.*, 2000; PEDINI *et al.*, 2001; LIMA *et al.*, 2010).

A lectina de *Cratylia mollis* (feijão camaratu) foi capaz de isolar a enzima lecitina colesterol aciltransferase, importante no metabolismo do colesterol (LIMA *et al.*, 1997); o complexo pôde ser, então, utilizado para o estudo de glicoproteínas de soro humano.

2.3.7.1 Atividade Antimicrobiana de lectinas

Proteínas isoladas de tecidos vegetais mostraram forte atividade antibacteriana (ORDÓÑEZ *et al.* 2006) e antifúngica (WANG; BUNKERS, 2000; WANG; NG 2003). A habilidade que lectinas de plantas têm em reagir com carboidratos expostos na superfície celular de micróbios torna possível ainda o emprego dessas biomoléculas como sondas diagnósticas para identificação de bactérias patogênicas, com base na reação de aglutinação seletiva entre lectina e bactéria (DOYLE; SLIFKIN, 1994), permitindo a investigação de fatores de virulência, as estruturas de superfície e a identificação de bactérias (SLIFKIN; GIL, 1984).

Em 1936, Summer e Howell (1936) relataram que a concanavalina A podia aglutinar várias *Mycobacterium spp.* Lectinas parcialmente purificadas a partir de sete plantas medicinais do Sul da África foram avaliadas quanto ao efeito antibacteriano frente às bactérias *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* através de método de aglutinação, apresentando efeito inibitório no crescimento das mesmas (GAIDAMASHVILI; VAN STANDEN, 2002). A lectina extraída das folhas de *Schinus terebinthifolius* (SteLL) mostrou atividade contra *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* (GOMES *et al.*, 2013).

A lectina de *Dolichos biflorus* foi utilizada para a identificação de estreptococos do grupo C (SLIFKIN; GIL, 1984), mas também a lectina de *Helix pomatia* aglutinou na presença de estreptococos do grupo C isolados de cavalos e gado (SCHALLA *et al.*, 1986). Concanavalina A pode ser precipitada por vários polissacáridos bacterianos interagindo especificamente com as paredes celulares das bactérias que contêm resíduos glicosídicos com o ácido teicóico, como no *Lactobacillus plantarum*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* (ARCHIBALD; COAPES, 1971; REEDER; EKSTEDT, 1971; DOYLE *et al.*, 1982). As lectinas de soja (SBA) têm sido utilizadas para ensaio para detectar o *Bacillus anthracis* (COLE *et al.*, 1984). O uso de aglutinina de soja para detectar um número muito baixo de células vegetativas de *Bacillus anthracis* em suspensão tamponada e esporos também tem sido relatado (GRAHAM *et al.*, 1984).

A parede celular de bactérias não só impede qualquer interação entre os glicoconjugados na sua membrana e de proteínas de ligação a carboidratos, como também impede que estas proteínas penetrem no citoplasma. Por isso, as lectinas de plantas que não podem alterar a estrutura e/ou a permeabilidade da membrana ou perturbar os processos intracelulares normais de micróbios invasores. Se as lectinas desempenha um papel importante na defesa da planta contra bactérias, deve ser por meio de um mecanismo indireto, que se baseia em interações com os carboidratos da parede celular ou os glicanos extracelulares. (BOBBARALA, 2012)

As interações entre lectinas de plantas e microorganismos têm sido aplicadas para a identificação de bactérias, fungos e protozoários, sendo útil para a caracterização de componentes celulares das bactérias e para a detecção de receptores de bacteriófagos (NICOLSON, 1974; ETZLER, 1983; LIS; SHARON, 1986)

2.3.7.1.1 Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB)

Concentrações inibitórias mínimas (CIM) são consideradas o padrão ouro para a determinação da susceptibilidade dos organismos a microorganismos e são usados para julgar o desempenho de todos os outros métodos de teste de susceptibilidade. CIM são usados em diagnósticos laboratoriais para confirmar uma resistência anormal, para dar uma resposta definitiva quando um resultado limite é obtido por outros métodos ou quando métodos de teste de difusão em disco não são apropriados (ANDREWS, 2001).

A CIM é a medida da potência de uma droga antimicrobiana. A CIM é definida como a concentração mínima de antibiótico que impede que a suspensão transparente de

10^5 UFC/mL de tornar-se turva após a incubação; turbidez normalmente conota um aumento na densidade bacteriana (LEVISON, 2004).

A atividade antimicrobiana de uma lectina é geralmente avaliada pela determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) *in vitro* após incubação aeróbia por um determinado tempo em um meio a pH 7,2 (LEVISON, 2004).

A CIM e CBM são determinados após um intervalo fixo de tempo após a exposição a concentrações de droga que permanecem constantes durante um período de incubação (24h), mas não fornecem informações sobre a evolução temporal do efeito antimicrobiano que varia em níveis quando em um paciente tratado com a droga. Estas condições *in vitro* são muito provavelmente diferentes das esperadas no local da infecção, em que o meio é frequentemente ácido e anaeróbico, e uma quantidade variável da droga pode-se ligar às proteínas de tecido.

Além disso, a CIM e MCB são medidas contra um inóculo bacteriano padrão (cerca de 10^5 unidades formadoras de colônias [UFC] por mililitro), que não corresponde necessariamente a densidade bacteriana no local da infecção (10^{8-10} UFC por grama de tecido ou pus). O inóculo *in vitro* é também na fase exponencial de crescimento, ao contrário da maioria dos organismos de uma infecção estabelecida, que não estão em crescimento.

Isolados de uma espécie em particular têm diferentes CIMs; cepas sensíveis têm CIMs relativamente baixos e cepas resistentes têm CIM relativamente altas (LEVISON, 2004).

3 METODOLOGIA

As metodologias aplicadas para a coleta do material vegetal, extração e purificação de proteínas a partir das sementes da *A. leiocarpa* estão descritas no artigo (Apêndice A). Também estão descritas as metodologias para cromatografia, eletroforese, espectroscopia de massas, espectroscopia de dicroísmo circular, espectroscopia de fluorescência, avaliação da atividade hemaglutinante, dosagem proteica e avaliação da atividade antimicrobiana.

4 RESULTADOS

Os resultados da pesquisa estão apresentados no artigo (Apêndice A).

5 CONCLUSÕES

- A ApulSL foi pré-purificada a partir das sementes de *Apuleia leiocarpa* (Voguel) J. F. Macbride através de cromatografia em coluna de quitina e eluição com ácido acético apenas, sem a necessidade de um fracionamento salino prévio com sulfato de amônio;
- A ApulSL aglutina eritrócitos de coelho e eritrócitos humanos dos tipos A, B e O, provavelmente devido a sua capacidade de reconhecer o açúcar aminado N-acetilglicosamina;
- A ApulSL é uma lectina termorresistente; necessita da presença de íons divalentes para ter atividade; possui tirosina no cerne hidrofóbico; é uma proteína de caráter ácido, de estrutura conformacional desordenada e oligomérica, com um peso molecular total de 55,8 kDa;
- A ApulSL não apresentou atividade antifúngica contra *Candida albicans* e *Candida tropicalis*, mas apresentou atividade inibitória contra cepas bacterianas Gram-positivas (*Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*) e Gram-negativas (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*). A atividade bactericida da ApulSL foi observada contra as variedades *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* e *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*, devendo ser melhor investigada quanto à sua aplicação no combate das pragas causadas por essas bactérias.

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, B. L., GOLDSTEIN, I. J. Concanavalin A, the jack bean (*Conavalia ensiformis*) phytohemagglutinin. **Methods Enzymol. Complex Carbohydrates**, v. 28, p. 313, 1972.
- ALBUQUERQUE, L.P., SANTANA, G. M. S., PONTUAL, E. V., NAPOLEÃO, T. H., COELHO, L. C. B. B., PAIVA, P. M. G. Effect of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin on survival and digestive enzymes of *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae). **International Biodeterioration & Biodegradation**, n.75, p.158-166, 2012.
- ALBUQUERQUE U. P., HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Rev. Bras Farmacognosia**. v. 16, p. 678-689, 2006.
- ALBUQUERQUE, U.P., ANDRADE, L.H.C. Conhecimento botânico tradicional e conservação em uma área de caatinga no Estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 16, p. 273-285, 2002a.
- ALBUQUERQUE, U.P., ANDRADE, L.H.C. Uso dos recursos vegetais da caatinga: o caso do agreste do Estado de Pernambuco (Nordeste do Brasil). **Interciência**, v. 27, p. 336-345, 2002b.
- ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **J. Antimicrob. Chemother.** n. 48, supl 1, p. 5-16. 2001.
- ANTONINO, N.A. **Otimização do processo de obtenção de quitina e quitosana de exoesqueletos de camarões oriundo da indústria pesqueira paraibana**. João Pessoa, dissertação de mestrado, UFPB/CCEN, 2007.88 p.
- AMARAL, D. M. I.; ALCALAY, N.; ANTONIO, M. G. Armazenamento de sementes de quatro espécies florestais do Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO FLORESTAL ESTADUAL, 6, Nova Prata, 1988. **Anais**. Nova Prata: Prefeitura Municipal de Nova Prata/Meridional, p.373-397, 1988.
- ANDERSEN N.H. *et al.* Hevein: NMR assignment and assessment of solutionstate folding for the agglutinin-toxin motif. **Biochemistry**, v. 32, p. 1407-1422, 1993.
- ANDRADE, J.L. *et al.* Lectin-induced nitric oxide production. **Cellular Immunology**, v. 194, p. 98-102, 1999.
- ARAÚJO, R.M.S., FERREIRA, R.S.; NAPOLEÃO, T.H.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M.G.; COELHO, L.C.B.B.; CORREIA, M.T.S.; OLIVA, M.L.V., PAIVA, P.M.G. *Crataeva tapia* bark lectin is an affinity adsorbent and insecticidal agent. **Plant Science**, v. 183, p. 20-26, 2012.
- ARCHIBALD, A.R., AND COAPES, E.H. The interaction of Concanavalin A with teichoic acids and bacterial cell walls. **Biochemical Journal**, n. 123, p. 665-667, 1971.
- ASENSIO, J.L.; CAÑADA, F.J.; SIEBERT, H.-C.; LAYNEZ, J.; POVEDA, A.; NIETO, P.M.; SOEDJANAAMADJA, U. GABIUS, H.-J. JIMÉNEZ BARBERO, J. Structural basis

for chitin recognition by defense proteins: GlcNAc residues are bound in a multivalent fashion by extended binding sites in hevein domains, **Chem. Biol.**, v. 7, p. 529-543, 2000.

BAINS, J. S. *et al.* Novel lectins from rhizomes of two *Acorus* species with mitogenic activity and inhibitory potential towards murine cancer cell lines. **International Immunopharmacology**, v. 5, p.1470-1478, 2005.

BANERJEE, S. *et al.* The interactions of *Allium sativum* leaf agglutinin with a chaperonin group of unique receptor protein isolated from a bacterial endosymbiont of the mustard aphid. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 23782-23789, 2004.

BARONDES, S.H. Bifunctional properties of lectins: lectins redefined. **Trends Biochem.Sci.**, v. 13, p. 480-482, 1988.

BIES, C., LEHR, C.M., WOODLEY, J.F. Lectin-mediated drug targeting: history and applications. **Adv Drug Deliv Rev.**, v. 56, p. 425-435, 2004.

BIONDO, E., MIOTTO, S.T.S., SCHIFINO-WITTMANN, M.T. Citogenética de espécies arbóreas da subfamília Caesalpinioideae ã leguminosae do Sul do Brasil. **Ciência Florestal**, v. 15, n. 3, p.241-248, 2005.

BOBBARALA,V. Antimicrobial Agents. **InTech**, 422 p., 2012. ISBN 978-953-51-0723-1

BOOTH, A.G. Novel System for 2-Dimensional Electrophoresis of Membrane Proteins. **Biochemical Journal**, v. 163, p. 165-168, 1977.

BOURNE, Y., ROIG-ZAMBONI, V., BARRE, A., PEUMANS, W.J., ASTOUL, C.H., VAN DAMME, E.J.M., ROUGE, P. The crystal structure of the *Calystegia sepium* agglutinin reveals a novel quaternary arrangement of lectin subunits with a beta-prism fold. **J.Biol.Chem.** v. 279, p. 527-533, 2004.

BROOKS, S.A., LEATHEM, A.J. Expression of N-acetyl galactosaminylated and sialylated glycans by metastases arising from primary breast cancer, **Invasion Metastasis**, 18, 115-121.1998.

BUDOWLE, B., ALLEN, R.C. Discontinuous polyacrylamide gel electrophoresis of DNA fragments. *Methods in molecular biology: Protocols in human molecular genetics.* (C.G. Mathew, Ed.). Humana Press Inc., Clifton, NJ. 1991.

CHANDRA, N.R., RAMACHANDRAIAH, G., BACHHAWAT, K., DAM, T.K., SUROLIA, A., VIJAYAN, M. Crystal structure of a dimeric mannose-specific agglutinin from garlic: quaternary association and carbohydrate specificity. **J.Mol.Biol.**, v. 285, p.1157-1168, 1999.

BRAZ FILHO, R.; GOTTLIEB, O. R. The flavones of *Apuleia leiocarpa*. **Phytochemistry**, Elmsford, v. 10, n. 10, p. 2433-2450, 1971.

CARLINI, C.R., GROSSI-DE-SÁ, M.F. Plant toxic proteins with insecticidal properties: A review on their potentialities as bioinsecticides, **Toxicon**, v.40, p. 1515-1539, 2002.

CARVALHO, P. E. R. Espécies arbóreas brasileiras. Colombo: EMBRAPA/CNPR, Brasília: **EMBRAPA/SPI**, v.1, 1039 p., 2003.

CARVALHO, P. E. R. Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. In Paulo Ernani Ramalho Carvalho; Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária; Centro Nacional de Pesquisa de Florestas. Colombo: EMBRAPA e CNPF; Brasília: **EMBRAPA e SPI**, 1994. 640p.

CASTELLANOS, A. Introdução à Geobotânica. **Revista Brasileira de Geografia**, v.22, p. 585-617, 1960.

CHIARI, M., RIGHETTI, P.G. The Immobilin Family - from Vacuum to Plenum Chemistry. **Electrophoresis**. n. 13, p. 187-191. 1992.

CELULOSA ARGENTINA. **Libro del árbol**. Buenos Aires, 3 ed., v. 2, 1975.

COELHO, J.S. *et al.* Effect of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of *Aedes aegypti* larvae. **Chemosphere**, v. 77, p. 934-938, 2009.

COELHO, L.C.B.B., SILVA, M.B.R. Simple method to purify milligram quantities of the galactose-specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*. **Phytochem. Anal.**, v. 11, p. 1-6, 2000.

COLE, H.B., EZZELL, W.J., KELLER, F.K., DOYLE, J.R. Differentiation of *Bacillus anthracis* and other *Bacillus* species by use of lectins. **Journal of Clinical Microbiology**, 19, 48-53, 1984.

COMINETTI, M.R., MARQUES, M.R., LORENZINI, D.M., LÖFGREN, S.E., DAFFRE, S., BARRACCO, M.A. Characterization and partial purification of a lectin from the hemolymph of the white shrimp *Litopenaeus schmitti*. **Developmental & Comparative Immunology**. v. 26, p. 715-721, 2002.

CONSERVAÇÃO INTERNACIONAL do BRASIL. Grandes Regiões Naturais - As Últimas Áreas Silvestres da Terra. 36 p. Edição impressa esgotada. 2003. Disponível em: <http://www.conservation.org.br/publicacoes/index.php?t=2>, acesso em 09/09/2013.

CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G. Lectins, carbohydrate recognition molecules: are they toxic?. In: Yasir Hasan Siddique. (Org.). **Recent Trends in Toxicology**. Kerala, India: Transworld Research Network, v. 37, p. 47-59. 2008.

CORREIA, M. T. S., COELHO, L. C. B. B. Purification of glucose/mannose lectin, isoform 1 from seeds of *Cratylia mollis* Mart. feijão camaratu. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, New York, v. 55, p. 261-273, 1995.

COSTA, R.M.P.B. *et al.* A new mistletoe *Phthirusa pyrifolia* leaf lectin with antimicrobial properties. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 526-533, 2010.

CUNHA, R.B., CASTRO, M.S., FONTES, W. Espectrometria de massa de proteínas. O papel-chave da espectrometria de massa na era pós-genômica. **Biociência e Desenvolvimento**, n. 36, 2006.

DELATORRE, P. *et al.* Crystal structure of a lectin from *Canavalia maritima* (ConM) bin complex with trehalose and maltose reveals relevant mutation in ConA-like lectins. **Journal of Structural Biology**, v. 154, p. 280-286, 2006.

DIXON, H.B.F. Defining a lectin. **Nature**, v. 292, p. 192, 1981.

DOYLE, R. J.; SLIFKIN, M. Lectin-Microorganism Interactions, New York: **Marcel Decker**, Inc., 1994.

DOYLE, R.J., NEDJAT-HAIEM, F., MILLER, R.D., KELLER, K.F. Interaction between plant agglutinins and Legionella species. **Journal of Clinical Microbiology**, n. 15, p. 973-975, 1982.

EIBL, B.I.; SILVA, F.; CARVALHO, A.; CZEREPACK, R.; KEHL, J. Ensayos de germinación y análisis cuantitativo en semillas de especies forestales nativas de Misiones, R.A. **Yvyrareta**, Eldorado, v.5, n.5, p.33-48, 1994.

ESPINOSA, J.F.; ASENSIO, J.L.; GARCIA, J.L.; LAYNEZ, J.; BRUIX, M.; WRIGHT, C.; SIEBERT, H.-C.; GABIUS, H.-J.; CAÑADA, F.J.; JIMÉNEZ-BARBERO, J. NMR investigations of protein-carbohydrate interactions; binding studies and refined three-dimensional solution structure of the complex between the B domain of wheat germ agglutinin and N,N,N-triacetylchitotriose. **Eur. J. Biochem.**, v. 267, p. 3965-3978, 2000.

ETZLER, M.E. Distribution and properties of the Dolichos biflorus lectins: a model system for exploring the role of lectins in plants. **Progress in Clinical and Biological Research**, 138, 197-207. 1983.

FANG, E.F. *et al.* A lectin with anti-HIV-1 reverse transcriptase, antitumor, and nitric oxide inducing activities from seeds of *Phaseolus vulgaris* cv. extralong autumn purple bean. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 2221-2229, 2010.

FRANCESCHINI, V., LAZZARI, M.; CIANI, F. Lectin cytochemical localization of glycoconjugates in the olfactory system of the lizards *Lacerta viridis* and *Podarcis sicula*. **Anatomy and Embryology**, v. 202, p. 49-54, 2000.

FASMAN, G.D. Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules. **Plenum Press**, New York, 738 p, 1996.

FELIPPI, M. Morfologia e silvicultura de espécies arbóreas da floresta estacional decidual. Universidade Federal De Santa Maria. Centro de Ciências Rurais. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal. Santa Maria-RS, Brasil, 2010.

FENTON-NAVARRO, B. *et al.* Purification and structural characterization of lectins from the cnidarian *Bunodeopsis antillensis*. **Toxicon**, v. 42, p. 525-532, 2003.

FERNÁNDEZ-ALONSO, J.L. *et al.* Lectin prospecting in Colombian Labiatae. A systematic-ecological approach. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, n. 6, p. 617-633, 2003.

FERNANDES, A., BEZERRA, P. Estudos fitogeográficos do Brasil. **Editora Stylos Comunicações**, Fortaleza, 1990.

FIGUEIREDO, J.G. *et al.* Antinociceptive activity and toxicology of the lectin from *Canavalia boliviana* seeds in mice. **Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology**, v. 380, p. 407-414, 2009.

GABIUS, H.J., ANDRÉ, S., KALTNER, H., SIEBERT, H.C. The sugar code: functional lectinomics. **Biochim Biophys Acta**, v. 1572, p. 165-177. 2002.

GABOR, F. *et al.* The lectin-cell interaction and its implications to intestinal lectin-mediated drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews** v. 56, n.4, p. 459-480, 2004.

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

GAMBLIN, S.J., HAIRE, L.F., RUSSELL, R.J., STEVENS, D.J., XIAO, B., HA, Y., VASISHT, N., STEINHAEUER, D.A., DANIELS, R.S., ELLIOT, A., WILEY, D.C., SKEHEL, J.J. The structure and receptor binding properties of the 1918 influenza hemagglutinin., **Science**, v. 303, n. 5665, p. 1838-1842, 2004.

GEMEINER, P. *et al.* Lectinomics: II. A highway to biomedical/clinical diagnostics. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 1-15, 2009.

GENTRY, A. H. Diversity and floristic composition of neotropical dry forests. Pp 146-193 in: H. Bullock, H. A. Mooney & E. Medina (eds.) Seasonally Dry Tropical Forests. **Cambridge University Press**, Cambridge, 1995.

GENTRY, A. H. Four neotropical rainforests. New Haven, **Yale University Press**, 1990.

GENTRY, A. H. Changes in plant community diversity and floristic composition on environmental gradients. **Annals of Missouri Botanical Garden**, v. 75, p. 1-34, 1988.

GIL, P.R. Wilderness ñ Earth's cast wild places. **CEMEX**, México, 2002.

GOLDSTEIN, J. I. Lectin structure-activity: The story is never over. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 6583-6585, 2002.

GOMES, F.S., PROCÓPIO, T.F., NAPOLEÃO, T.H., COELHO, L.C., PAIVA, P.M. Antimicrobial lectin from *Schinus terebinthifolius* leaf. **J. Appl. Microbiol.**, v. 114, n.3, p.672-679. 2013. doi: 10.1111/jam.12086. Epub 2012 Dec 28.

GÖRG, A.; WEISS, W.; DUNN, M.J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. **Proteomics**, v. 4, p. 3665-3685. 2004.

GRAHAM, K., KELLER, K., EZZELL, W.J., DOYLE, J.R. Enzyme-linked lectinosorbent assay (ELLA) for *Bacillus anthracis*. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, n. 3, p. 210-212, 1984.

HAN, J.W. *et al.* Purification and characterization of a D-mannose specific lectin from the green marine alga, *Bryopsis plumosa*. **Phycological Research**, v. 58, p. 143-150, 2010.

HAMES, B.D. Gel electrophoresis of proteins: A practical approach. Oxford: Oxford University Press, 3 ed., 1998

HARATA, K., SCHUBERT, W.D., MURAKI, M. Structure of *Urtica dioica* agglutinin isolectin I: dimer formation mediated by two zinc ions bound at the sugar binding site. **Acta Crystallogr, Sect.D.** v. 57, p.1513-1517, 2001.

HARATA, K., MURAKI, M. Crystal structures of *Urtica dioica* agglutinin and its complex with tri-N-acetylchitotriose. **J Mol Biol.**, v. 297, p. 673-681, 2000.

HERINGER, E.P., FERREIRA, M.B. Árvores úteis da Região Geo-Econômica do Distrito Federal. **Cerrado**, Brasília, v. 19, p. 20-24, 1973.

HONG, M., CASSELY, A., MECHREF, Y., NOVOTNY, M.V. Sugar-lectin interactions investigated through affinity capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography B. Biomed Sci Appl.** v. 752, p. 207-216, 2001.

HOGENKAMP, A. *et al.* Characterization and expression sites of newly identified chicken collectins. **Molecular Immunology**, v. 43, p. 1604-1616, 2006.

IBAMA/MMA. Monitoramento do desmatamento nos biomas brasileiros por satélite ã Monitoramento do Bioma caatinga 2002 a 2008. Centro de Sensoriamento Remoto ã CSR/IBAMA, 2010. Disponível em:
<http://siscom.ibama.gov.br/monitorabiomas/caatinga/relatrio_tcnico_caatinga_72.pdf>
. Acesso em: 08/05/2012.

IMBERT, A. *et al.* Structures of the lectins from *Pseudomonas aeruginosa*: insights into the molecular basis for host glycan recognition. **Microbes and Infection**, v. 6, p. 221-228, 2004.

IBGE. Mapa de biomas do Brasil. Escala 1:5.000.000, 2004. Disponível em:
<ftp://geoftp.ibge.gov.br/mapas_tematicos/mapas_murais/biomas.pdf>. Acesso em: 14/01/2013.

IBGE. Atlas nacional do Brasil: Região Nordeste. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**, Rio de Janeiro, 1985.

KELLA, N.K.D., ROBERTS, D.D., SHAFER, J.A., GOLDSTEIN, I.J. Fluorescence energy transfer studies on lima bean lectin. Distance between the subunit hydrophobic binding site and the thiol group essential for carbohydrate binding. **J. Biol. Chem.**, v. 259, p. 4777- 4781, 1984.

KELLY, S. M. JESS, T. J., PRICE, N. C. How to study proteins by circular dichroism. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1751, p. 119-139, 2005.

KENNEDY, J.F., PAIVA, P.M.G., CORREIA, M.T.S. CAVALCANTI, M.S.M., COELHO, L.C.B.B. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydrate Polymers**, n. 26, p. 219-230, 1995.

KHAN, F.; AHMAD, A.; KHAN, M. I. Purification and characterization of a lectin from endophytic fungus *Fusarium solani* having complex sugar specificity. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 457, p. 243-251, 2007.

KING, T.P., PUSZTAI, A., CLARKE, E.M. Kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) lectin-induced lesions in the small intestine: 1. Light microscope studies. **J Comp Pathol**. v. 4, p. 585-595, 1980.

KOLBERG, J. AND SLETTEN, K. Purification and properties of a mitogenic lectin from *Lathyrus sativus* seeds. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1, p. 26-30, 1982.

KONG, P.F. *et al.* A novel C-type lectin from bay scallop *Argopecten irradians* (AiCTL-7) agglutinating fungi with mannose specificity. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 30, p. 836-844, 2011.

KONOZY, E. H. E. *et al.* Isolation, purification, and physicochemical characterization of a D-galactose-binding lectin from seeds of *Erythrina speciosa*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 410, p. 222-229, 2003.

LAKOWICZ, J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy. **Springer**, 3 ed, 954 p, 2006.

LARSEN, K., THYGESEN, M. B., GUILLAUMIE, F., WILLATS, W. G. T., JENSEN, K. J. Solid-phase chemical tools for glycobiology. **Carbohydrate Research**, v. 341, n. 10, p. 1209-1234, 2006.

LEAL, I. R.; SILVA, J. M.; TABARELLI, M.; LACHER JR.; T. E. Mudando o curso da conservação da biodiversidade na Caatinga do Nordeste do Brasil. In: Conservação Internacional do Brasil (ed.). **Megadiversidade**. Belo Horizonte, v. 1, p. 139-146, 2005.

LEAL, I.R., TABARELLI, M., CARDOSO DA SILVA, J.M. Ecologia e conservação da caatinga. **Ed. Universitária da UFPE**: Recife, 822 p., 2003.

LEHR, C.M. Lectin-mediated drug delivery: the second generation of bioadhesives. **J Control Release**. v. 65, p. 19-29, 2000.

LEITE, Y .F. M. M. *et al.* Purification of a lectin from the marine red alga *Gracilaria ornata* and its effect on the development of the cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1724, p. 137-145, 2005.

LELES, P. S. dos S., CARNEIRO, J. G. de A., BARROSO, D. G. Comportamento de mudas de *Hymenaea courbaril* L. var. *stilbocarpa* (Hayne) e *Apuleia leiocarpa* (Vog.) Macbr. Produzidas sob três regimes de irrigação. **Revista Árvore**, v. 22, n. 1, p. 11-19, 1998.

LEONIDAS, D. D.; SWAMY, B.M.; HATZOPOULOS, G. N.; GONCHIGAR, S. J.; CHACHADI, V. B.; INAMDAR, S. R.; ZOGRAPHOS, S. E.; OIKONOMAKOS, N. G. Structural basis for the carbohydrate recognition of the *Sclerotium rolfsii* lectin. **Journal Mol Biol.**, v. 368, p. 1145-1161, 2007.

LEVISON, M. E. Pharmacodynamics of antimicrobial drugs. **Infect Dis Clin N Am**, v. 18, p. 451-465, 2004.

LEWIS, G., SCHRIRE, B., MACKINDER, B. et al. Legumes of the World. UK Kew: **Royal Botanic Gardens**, p. 577, 2005.

LI, Y. R., LIU, Q.H., WANG, H.X., NG, T.B. A novel lectin with potent antitumor, mitogenic and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from the edible mushroom *Pleurotus citrinopileatus*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1780, n. 1, p. 51-57, 2008.

LIMA, A.L.R. et al. Histochemical Evaluation of human prostatic tissues with *Cratylia mollis* seed lectin. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, 2010.

LIMA, V. L. M. et al. Immobilized *Cratylia mollis* lectin as potential matrix to isolate plasma glycoproteins including lecithin cholesterol acyltransferase. **Carbohydrate Polymers**, v. 33, n. 1, p. 27-32, 1997.

LIENER I. E. (Ed.). "Toxic constituents of Plants Foodstuffs". New York, **Academic Press**, 1969.

LIS H, SHARON N. Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition. **Chem Rev.**, v. 2, p. 637-674, 1998.

LIS, H., SHARON, N. Applications of lectins. In: Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine, Leiner, I.F., Sharon, N., Goldstein, I.J. (eds.), p. 294-357, Academic Press, New York. 1986.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil, 4 ed., v.1, Nova Odessa: **Plantarum**, 368p., 2002.

LUCCA, R. S., HANSEN, D., OLIVA, M. L. V. Estudos espectroscópicos de inibidores de serinoproteinases isolados de sementes de *Bauhinia bauhinioides*: estimativa de estrutura secundária e estudos de pH. **Varia Scientia**, v. 5, n. 10, p. 97-112, 2005.

MACEDO, M. L. R. et al. Insecticidal action of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotes subfasciatus* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Comparative Biochemistry and Physiology A**, v. 146, n. 4, p. 486-498, 2007.

MACFARLANE, D.E. Two-Dimensional Benzyltrimethyl-N-Hexadecylammonium Chloride-]Sodium Dodecyl-Sulfate Preparative Polyacrylamide-Gel Electrophoresis -a High-Capacity High-Resolution Technique for the Purification of Proteins from Complex-Mixtures. **Analytical Biochemistry**, v. 176, p. 457-463, 1989.

MACGILLIVRAY, A.J., RICKWOOD, D. The heterogeneity of mouse-chromatin nonhistone proteins as evidenced by two-dimensional polyacrylamide-gel electrophoresis and ion-exchange chromatography. **Eur J Biochem.**, v. 41, p. 181-190, 1974.

MACIEL, E.V.M. et al. Mitogenic activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes. **Biologicals**, v. 32, p. 57-60, 2004.

MÄKELÄ, O. Studies in Hemagglutinins of Leguminosae Seeds. **Annales medicinae experimentalis et biologiae Fenniae**, v. 35, 133 p. 1957.

MARCHIORI, J. N. C. Dendrologia das angiospermas: leguminosas. Santa Maria: Ed. UFSM, 200 p. 1997.

MATTOS, N.F., GUARANHA, J. Contribuição ao estudo da grábia (*Apuleia leiocarpa*). Boletim Técnico 12. Porto Alegre. **Instituto de Pesquisas de Recursos Naturais Renováveis** óAPô, 25 p., 1983.

MATSUI, T.; HAMAKO, J.; OZEKI, Y.; TITANI, K. Comparative study of blood group recognizing lectins toward ABO blood group antigens on neoglycoproteins, glycoproteins and complex-type oligosaccharides. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1525, p. 50-57, 2001.

MANAVALAN, P., JOHNSON JR, W. C. Sensitivity of circular dichroism to protein tertiary structure class. **Nature**, v. 305, p. 831 ñ 832, 1983.

MEAGHER, J.L., WINTER, H.C., EZELL, P., GOLDSTEIN, I.J., STUCKEY, J.A. Crystal structure of banana lectin reveals a novel second sugar binding site. **Glycobiology**, v. 15, p. 1033-1042, 2005.

MELO, C.M.L. *et al.* Immunomodulatory response of Cramoll 1,4 lectin on experimental lymphocytes. **Phytotherapy Research**, v. 24, p. 1631-1636, 2010.

MENTZ, L.A., LUTZEMBERGER, L.C., SCHENKEL, E.P. Da flora medicinal do Rio Grande do Sul: notas sobre a obra de DöÁvila (1910). **Caderno de Farmácia**, v. 13, n. 1, p. 25-48, 1997.

MILLER, I., CRAWFORD, J., GIANAZZA, E. Protein stains for proteomic applications: Which, when, why? **Proteomics**.n.6, p. 5385-5408. 2006.

MONZO, A.; BONN, G.K; GUTTMAN, A. Lectin-immobilization strategies for affinity purification and separation of glycoconjugates. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, p. 423-432, 2007.

MORAES, C. S., *et al.* Série em biologia celular e molecular - Métodos experimentais no estudo de proteínas. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, ed. 1, 84 p., 2013.

MOREIRA, R. A. *et al.* Isolation and partial characterization of a lectin from *Artocarpus incisa* L. seeds. **Phytochemistry**, v. 47, n. 7, p. 1183-1188, 1998.

MORENO, F. B. M. B. Estudos estruturais de uma lectina presente em sementes de *Lotus Tetragonolobus*. Tese (doutorado) ñ Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. São José do Rio Preto, 119 f., 2008.

MOURA, R.M. *et al.* CvL, a lectin from the marine sponge *Cliona varians*: Isolation, characterization and its effects on pathogenic bacteria and *Leishmania* promastigotes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A, Molecular & Integrative Physiology**, v. 145, p. 517-523, 2006.

NAEEM, A., AHMAD, E., ASHRAF, M.T., KHAN, R.H. Purification and characterization of mannose/glucose-specific lectin from seeds of *Trigonella foenumgraecum*. **Biochemistry (Moscow)**, v. 72, p. 44-48, 2007.

NAPOLEÃO, T. H, PONTUAL, E.V., LIMA, T. A., SANTOS, N. D. L., SÁ, R. A., COELHO, L. C. B. B., NAVARRO, D.M.A.F., PAIVA, P. M. G. Effect of *Myracrodruon urundeuva* leaf lectin on survival and digestive enzymes of *Aedes aegypti* larvae. **Parasitol Res**, n. 110, p. 609-616, 2012.

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.

NEUMANN, D. LEHR, C. M., LENHOF, H.P., KOHLBACHER, O. Computational modeling of the sugar-lectin interaction. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 4, p. 437-457, 2004.

NICOLOSO, F. N., FOGASA, M.A. F., ZANCHETTI, F. Nutrição mineral de mudas de grábia (*Apuleia leiocarpa*) em argissolo vermelho distrófico. 1- Efeito da adubação NPK. **Ciência Rural**, v. 31, n. 6, p. 1-8, 2001.

NICOLSON, G.L. The interactions of lectins with animal cell surfaces. **International Review of Cytology**, 39, 89-190. 1974.

NICOLOSO, F. T. *et al.* Exigências nutricionais da grábia (*Apuleia leiocarpa* Vog. Macbride) em solo Podzólico vermelho amarelo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.29, n.2, p.225-231, 1999.

NICOLOSO, F. N., GARLET, A., ZANCHETTI, F., SEBEM, E. Efeito de métodos de escarificação na superação de dormência de sementes e de substratos na germinação e no desenvolvimento de grábia (*Apuleia leiocarpa*). **Ciência Rural**, v. 27, n. 3, p. 419-424, 1997.

NIMER, E. Clima. In Geografia do Brasil. Região Nordeste. **Fundação do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**, Rio de Janeiro, p. 47-84, 1977.

NISHIMURA, C., DYSON, H.J., WRIGHT, P.E. Identification of native and non-native structure in kinetic folding intermediates of apomyoglobin. **J Mol Biol**, v. 355, p. 139-156, 2006.

NUNES, E.S. *et al.* Cytotoxic effect and apoptosis induction by *Bothrops leucurus* venom lectin on tumor cell lines. **Toxicon**, v. 59, p. 667-671, 2012.

NUNES, E. S. *et al.* Purification of a lectin with antibacterial activity from *Bothrops leucurus* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B, Biochemistry and Molecular Biology**, v. 159, p. 57-63, 2011.

O'FARRELL, P.H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **J Biol Chem**, v. 250, p. 4007-4021, 1975.

OLA, M.S. *et al.* Purification and some properties of galectin-1 derived from water buffalo (*Bubalus bubalis*) brain. **Cell Biology International**, v. 31, p. 578-85, 2007.

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

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

OLIVEIRA, J. T. A. *et al.* Purification and physicochemical characterization of a cotyledonary lectin from *Luetzelburgia auriculata*. **Phytochemistry** v. 61, p. 301-310, 2002.

OPITZ, L., SALAKLANG, J., BÜTTNER, H., REICHL, U., WOLFF, M.W. Lectin-affinity chromatography for downstream processing of MDCK cell culture derived human influenza A viruses. **Vaccine**, v. 25, p. 939-947, 2007.

ORDÓÑEZ, R. M. *et al.* Antimicrobial activity of glycosidase inhibitory protein isolated from *Cyphomandra betacea* Sendt. fruit. **Peptides**, v. 27, p.1187-1191, 2006.

OURTH, D.D.; NARRA, M.B.; CHUNG, K.T. Isolation of mannose-binding C-type lectin from *Heliothis virescens* pupae. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 335, p. 1085-1089, 2005.

PAIVA, P.M.G. *et al.* Plant compounds with *Aedes aegypti* larvicidal activity and other biological properties. In: LIONG, M.-T. (ed.). **Bioprocess Sciences and Technology**. New York: Nova Publishers Inc., pp. 271-296, 2011a.

PAIVA, P.M.G.; NAPOLEÃO, T.H.; SÁ, R.A.; COELHO, L.C.B.B. Insecticide activity of lectins and secondary metabolites. In: PERVEEN, F. (ed.). **Insecticides ñ Advances in Integrated Pest Management**. Rijeka: InTech, pp. 579-598, 2011b.

PAIVA, P. M. G., COELHO, L. C. B. B. Purification and partial characterization of two lectina isoforms for *Cratylia mollis* Mart (Camaratu bean). **Appl. Biochem. Biotechnol.** v. 36, p.113-118, 1992.

PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature*, London, v. 405, p. 837-845, 2000.

PEDINI, V. *et al.* Carbohydrate histochemistry of lamb duodenum. **Acta Histochemica**, v. 103, p. 315-323, 2001.

PERKINELMER. An Introduction to Fluorescence Spectroscopy. User Assistance. **PerkinElmer**, 2000.

PEREIRA, T. S. *et al.* Fenologia de espécies arbóreas em Floresta Atlântica da Reserva Biológica de Poço das Antas, Rio de Janeiro, Brasil. **Iheringia**, Serie Botânica, Porto Alegre, v. 63, n.2, p. 329-339, 2008.

PERALTA, A. J., OSUNA, T. *Diccionario Guaraní-Español y Español-Guaraní*. **Editorial Tupã**, Buenos Aires. 1952.

PESSOA JÚNIOR, A.; KILIKIAN, B. V. Purificação de produtos biotecnológicos. Barueri: **Manole**, 440 p, 2005.

PEUMANS, W. J.; ROUGÉ, P.; VAN DAMME, E. J. M. The tomato lectin consists of two homologous chitin-binding modules separated by an extensin-like linker. **Biochemical Journal**, v. 376, p. 717-724, 2003.

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.

PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E.J.M. Prevalence, biological activity and genetic manipulation of lectins in foods. **Trends in Food Sci. Tech.**, v.7, p. 132-138, 1996.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**, v. 109, n. 2, p. 347-352, 1995.

PONTES, C. A., LIMA E BORGES, E. E., BORGES, R. C.G., SOARES, C. P. B. Mobilização de reservas em sementes de *Apuleia leiocarpa* (vogel) J.f. Macbr. (garapa) durante a embebição. *Revista Árvore*, Viçosa-MG, v.26, n.5, p. 593-601, 2002.

POPINIGIS, F. Fisiologia da semente. Brasília: **AGIPLAN**, 289 p., 1977.

PRADO, D. E. As caatingas da América do Sul. In: I.R. Leal, M. Tabarelli & J.M.C. Silva (eds.). *Ecologia e conservação da Caatinga*. Editora Universitária, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil, p. 3-73, 2003.

RAMACHANDRAIAH, G., CHANDRA, N.R., SUROLIA, A., VIJAYAN, M. Re-refinement using reprocessed data to improve the quality of the structure: a case study involving garlic lectin. **Acta Crystallogr., Sect.D**. v. 58, p.414-420, 2002.

RAVISHANKAR, R., THOMAS, C.J., SUGUNA, K., SUROLIA, A., VIJAYAN, M. Crystal structures of the peanut lectin-lactose complex at acidic pH: retention of unusual quaternary structure, empty and carbohydrate bound combining sites, molecular mimicry and crystal packing directed by interactions at the combining site. **Proteins** v. 43, p. 260-270, 2001.

REEDER, N.J., AND EKSTEDT, D.R. Study of the interaction of Concanavalin A with staphylococcal teichoic acids. **Journal of Immunology**, n. 106, p. 334-340, 1971.

REYNOSO-CAMACHO, R., DE MEJÍA, G. E., LOARCA-PIÑA, G. Purification and acute toxicity of a lectin extracted from tepary bean (*Phaseolus acutifolius*). **Food and Chemical Toxicity**, v. 41, p 21-27, 2003.

REIS, A. C. S. Clima da caatinga. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 48, p. 325-335, 1976.

REITZ, R.; KLEIN, R. M.; REIS, A. Projeto Madeira do Rio Grande do Sul. Porto Alegre: **SUDESUL**, 525p., 1988.

RIBEIRO, L. S.; LEITÃO, G. G. Estudo fitoquímico de *Apuleia leiocarpa* (Vog.) Glaziov. In Congresso Nacional de Botânica, 47, Nova Friburgo. **Resumos**. Rio de Janeiro: Sociedade Botânica do Brasil, p. 298, 1996.

RIZZINI, C.T. Árvores e madeiras úteis do Brasil. Manual de dendrologia brasileira. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo, 294 p., 1971. 1971.

ROBERTS, D.D. ARJUNAN, P. TOWNSEND, L.B. GOLDSTEIN, I.J. **Phytochemistry**, v. 25, p. 589, 1986.

ROBERTS, D.D., GOLDSTEIN, I.J. Adenine binding sites of the lectin from Lima beans (*Phaseolus lunatus limensis*). **J. Biol. Chem**, v. 258, p. 13820-13824, 1983.

RODRIGUES, J. S. *et al.* Novel core (polyester)-shell(polysaccharide) nanoparticles: protein loading and surface modification with lectins. **Journal of Controlled Release**, v. 92, p. 103-112, 2003.

ROJO, M. A. *et al.* Isolation and characterization of a new D-galactose-binding lectin from *Sambucus racemosa* L. **Protein and Peptide Letters**, v. 10, n. 3, p. 287-293, 2003.

ROSENFELD, H., ANIULYTE, J., HELMHOLZ, H., LIESIENE, J., THIESEN, P., NIEMEYER, B., PRANGE, A. Comparison of modified supports on the base of glycoprotein interaction studies and of adsorption investigations. **Journal of Chromatography A**, v. 1092, p. 76-88, 2005.

ROUGÉ, P. PEUMANS, W.J., BARRE, A., VAN DAMME, E.J. A structural basis for the difference in specificity between the two jacalin-related lectins from mulberry (*Morus nigra*) bark. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 304, p. 91-97, 2003.

RÜDIGER, H., GABIUS, H.J. Plant lectins: occurrence, biochemistry, functions and applications. **Glycoconj J.**, v. 18, p. 589-613, 2001.

RÜDIGER, H., SIEBERT, H.C., SOLÍS, D., JIMÉNEZ-BARBERO, J., ROMERO, A., VON DER LIETH, C.W., DIAZ-MARIÑO, T., GABIUS, H.J. Medicinal chemistry based on the sugar code: fundamentals of lectinology and experimental strategies with lectins as targets. **Curr Med Chem.** v. 7, p. 389-416, 2000.

RUPPELT, B. M *et al.* Pharmacological screening of planta recommended by folk medicine as anti-snake venom. I. Analgesic and antiinflammatory activities. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 86, p. 203-205, 1991.

RUSCHEL, A. R., NODARI, E. S., GUERRA, M.P., NODARI, R.O. Evolução do uso e valorização das espécies madeiráveis da Floresta Estacional Decidual do Alto Uruguai, SC. **Ciência Florestal**, v. 13, n. 1, p. 153-166, 2003.

RUTENBER, E., ROBERTUS, J.D. Structure of ricin B-chain at 2.5 Å resolution. **Proteins**, v. 10, p.260-269, 1991.

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

SÁ, R.A. *et al.* Larvicidal activity of *Myracrodruon urundeuva* lectins on *Aedes aegypti*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C, Toxicology and Pharmacology*, v. 149, p. 300-306, 2009b.

SÁ, R.A., NAPOLEÃO, T. H.; SANTOS, N. D. L.; GOMES, F. S.; ALBUQUERQUE, A. C.; XAVIER, H. S.; COELHO, L. C. B. B.; BIEBER, L. W.; PAIVA, P. M. G. Induction of mortality on *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae) by *Myracrodruon urundeuva* heartwood lectin. *International Biodeterioration and Biodegradation*, v. 62, p. 460-464, 2008.

SAMPAIO, E. V. S. B. 1995. Overview of the Brazilian Caatinga. Pp 35-63 in: S. H. Bullock, H. A. Mooney & E. Medina (eds.) *Seasonally Dry Tropical Forests*. **Cambridge University Press**, Cambridge.

SANTANA, G.M.S. *et al.* Electrochemical potential of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin. *Bioelectrochemistry*, v. 85, p. 56-60, 2012.

SANTANA, G.M.S. *et al.* Isolation of lectin from *Opuntia ficus-indica* cladodes. *Acta Horticulturae*, v. 811, p. 281-286, 2009.

SANTI-GADELHA, T. *et al.* Purification and biological effects of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) seed lectin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 350, n. 4, p.1050-1055, 2006.

SANTOS, A.F.S. *et al.* Isolation of a seed coagulant *Moringa oleifera* lectin. *Process Biochemistry*, v. 44, p. 504-508, 2009.

SANTOS, A. F. S. *et al.* Detection of water soluble lectin and antioxidant component from *Moringa oleifera* seeds. *Water Research*, v. 39, p. 975-980, 2005.

SATO, Y. *et al.* High mannose-specific lectin (KAA-2) from the red alga *Kappaphycus alvarezii* potentially inhibits influenza virus infection in a strain-independent manner. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 405, p. 291-296, 2011

SAUL, F.A., ROVIRA, P., BOULOT, G., DAMME, E.J., PEUMANS, W.J., TRUFFA-BACHI, P., BENTLEY, G.A. Crystal structure of *Urtica dioica* agglutinin, a superantigen presented by MHC molecules of class I and class II. *Structure Fold.Des.*, v. 8, p. 593-603, 2000.

SCHÄGGER, H., VON JAGOW, G. Blue Native Electrophoresis for Isolation of Membrane-Protein Complexes in Enzymatically Active Form. *Analytical Biochemistry*. v. 199, p. 223-231, 1991.

SCHALLA, W.D., WHITTINGTON, L.W., RICE, J.R., LARSON, A.S. Epidemiological characterization of *Neisseria gonorrhoeae* by lectins. *Journal of Clinical Microbiology*, n. 22, p. 379-382, 1986.

SREERAMA, N.; WOODY, R.W. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with and expanded reference set. *Anal Biochem.*, v. 287, p. 252-260, 2000.

SHARON, N., LIS, H. How proteins bind carbohydrates: lessons from legume lectins. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 50, p. 6586-6591. 2002.

SHARON, N., LIS, H. The structural basis for carbohydrate recognition by lectins. In: Wu, ed. *The Molecular Immunology of Complex Carbohydrates-2*. Taiwan: **Kluwer Academic/Plenum Publishers**, p. 1-16, 2001.

SHARON, N., LIS, H. Lectins-proteins with a sweet tooth: Function in cell recognition. **Essays Biochemistry**, v. 30, p. 59-75, 1995.

SHARON, N., LIS, H. Carbohydrates in cell recognition. **Scientific American**, vol. 268, p. 82-88, 1993.

SHARON, N.; LIS, H. Legumes lectins ñ a large family of homologous proteins. **Faseb J**, v. 4, p. 3198-3208, 1990.

SILVA, M.D.C., SÁ, R.A.; NAPOLEÃO, T.H.; GOMES, F.S.; SANTOS, N.D.L.; ALBUQUERQUE, A.C.; XAVIER, H.S.; PAIVA, P.M.G.; CORREIA, M.T.S.; COELHO, L.C.B.B. Purified *Cladonia verticillaris* lichen lectin: Insecticidal activity on *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae). **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, p. 334-340, 2009.

SLIFKIN, M., GIL, G.M. Identification of group C streptococcal antigen extracts with lectin-bound polystyrene particles. **Journal of Clinical Microbiology**, n. 19, p. 83-84, 1984.

SPILATRO, S. R. *et al.* Characterization of a new lectin of soybean vegetative tissues. **Plant Physiology**, v. 110, p. 825-834, 1996.

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

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

SOUZA, C. D., FELFILI, J. M. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás. **Acta Bot. Bras.** v. 20, n. 1. Brasil, p. 135-145, 2006.

SOUZA, L. A. G., VARELA, V. P., BATALHA, L. F. P. Tratamentos pré-germinativos em sementes florestais da Amazônia: VI ñ Muirajuba (*Apuleia leiocarpa* (Vog.) Macb. var. *molaris* SPR. ex BENTH. (LEGUMINOSAE). **Acta Amazônica**, v. 24, n1/2, p.81-90. 1994.

SOL, F. G.; CAVADA, B.S., CALVETE, J. J. Crystal structures of *Cratylia floribunda* seed lectin at acidic and basic pHs. Insights into the structural basis of the pH-dependent dimer-tetramer transition. **Journal of Structural Biology**, v. 158, p. 1-9, 2007.

SRINIVAS, V.R.; REDDY, G.B.; AHMAD, N.; SWAMINATHAN, C. P.; MITRA, N.; SUROLIA, A. Legume lectin family, the natural mutants of the quaternary state provide insights into the relationship between protein stability and oligomerization. **Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects**, v. 1527, p. 102-111, 2001.

STRYER, L.; BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L. **Bioquímica**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1059 p., 2004.

SUMMER, J.B., HOWELL, S.F. The identification of the hemagglutinin of the Jack bean with Concanavalin A. **Journal of Bacteriology**, n. 32, p. 227-237. 1936.

SUN, J. *et al.* Purification and characterisation of a natural lectin from the serum of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 23, n. 2, p. 292-299, 2007.

SUSEELAN, K. N., MITRA, R., PANDEY, R., SAINIS, K.B., KRISHNA, T.G. Purification and characterization of a lectin from wild sunflower (*Helianthus tuberosus L.*) tubers. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 407, p. 241-247, 2002.

TAKAHASHI, K.G., KURODA, T., MUROGA, K. Purification and antibacterial characterization of a novel isoform of the Manila clam lectin (MCL-4) from the plasma of the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. **Comparative Biochemistry and Physiology B Biochem Mol Biol**. v. 150, p. 45-52, 2008.

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

TERADA, T. *et al.* Structural characterization of a rhamnose-binding glycoprotein (lectin) from Spanish mackerel (*Scomberomorus niphonius*) eggs. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1770, n. 4, p. 617-629, 2007.

TIMOSHENKO, A.V.; CHERENKEVICH, S.N.; GABIUS, H.J. *Viscum album* agglutinin-induced aggregation of blood cells and the lectin effects on neutrophil function. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 49, p. 153-158, 1995.

TRANSUE, T.R., SMITH, A.K., MO, H., GOLDSTEIN, I.J., SAPER, M.A. Structure of benzyl T-antigen disaccharide bound to *Amaranthus caudatus* agglutinin. **Nat. Struct. Biol.**, v. 4, p. 779-783, 1997.

TRINDADE, M.B., LOPES, J.L.S., SOARES-COSTA, A., MONTEIRO-MOREIRA, A.C., MOREIRA, R.A., OLIVA, M.L.V., BELTRAMINI, L.M. Structural characterization of novel chitin-binding lectins from the genus *Artocarpus* and their antifungal activity. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1764, p. 146-152, 2006.

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, n. 6, p. 575-592, 1998.

VAN DAMME, E. J. M. et al. The NeuAc(̢2,6)-GalNAc-binding lectin from elderberry (*Sambucus nigra*) bark type-2 ribosome-inactivating protein with an usual specificity and structure. **European Journal of Biochemistry**, v. 235, p. 128-137, 1996.

VAZ, A.F.M. et al. Biocontrol of *Fusarium* species by a novel lectin with low ecotoxicity isolated from *Sebastiania jacobinensis*. **Food Chemistry**, v. 119, p. 1507-1513, 2010.

VEGA, N., PÉREZ, G. Isolation and characterisation of a *Salvia bogotensis* seed lectin specific for the Tn antigen. *Phytochemistry*, v. 67, p. 347-355, 2006

WANG, H.X.; NG, T. B. Purification of Castamollin, a novel antifungal protein from Chinese chestnuts. **Protein Expression & Purification**, v. 32, p. 44-51, 2003.

WANG, H. X.; BUNKERS, G. J. Potent heterologous antifungal proteins from cheeseweed (*Malva parviflora*). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 279, p. 669-673, 2000.

WANG, H.X. et al. Hypotensive and vasorelaxing activities of a lectin from the edible mushroom *Tricholoma mongolicum*. **Pharmacology & Toxicology**, v. 79, n. 6, p. 318-323, 1996.

WEISS, W. & GÖRG, A. High-resolution two-dimensional electrophoresis. *Methods in Molecular Biology*, v. 564, p. 13-32. 2009.

WITITSUWANNAKUL, R.; WITITSUWANNAKUL, D.; SAKULBORIRUG, C. A lectin from the bark of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*). **Phytochemistry**, v. 47, n. 2, p. 183-187, 1998.

WITTIG, I., SCHÄGGER, H. Features and applications of blue-native and clear-native electrophoresis. **Proteomics**, n. 8, p. 3974-3990. 2008.

WOODY, R. W. Circular dichroism of peptides and proteins. In: NAKANISHI, K.; BEROVA, N.; WOODY, R. W. (Eds.). *Circular dichroism: principles and applications*. New York: **VCH Publishers**, p. 473-521, 1994.

WROBLEWSKI, S. et al. Potencial of lectin-N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide copolymerdrug conjugates for the treatment of pre-cancerous conditions. **Journal of Controlled Release**, v. 74, p. 283-293, 2001.

WU, J. H. et al. Carbohydrate recognition factors of the lectin domains present in the *Ricinus communis* toxic protein (ricin). **Biochimie**, v. 88, n. 2, p. 201-217, 2006.

XIE, M. et al. Lectin-modified trifunctional nanobiosensors for mapping cell surface glycoconjugates. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, p. 1311-1317, 2009.

XU, W.T. et al. A new C-type lectin (FcLec5) from the Chinese white shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. **Amino Acids**, v. 39, p. 1227-1239, 2010.

ZENTENO, E. *et al.* Specificity of the isolectins from the plant cactus *Machaerocereus eruca* for oligosaccharides from porcine stomach mucin. **Glycoconjugate Journal**, v. 12, p. 699ñ706, 1995.

APÊNDICE A - Artigo a ser submetido à revista International Journal of Biological Macromolecules

Purification, characterization and antibacterial potential of a thermo-resistant lectin from seeds of *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J. F. Macbride (Fabaceae)

Aline de Souza Carvalho^a, Márcia Vanusa da Silva^a, Francis Soares Gomes^a, Patrícia Maria Guedes Paiva^a, Carolina Barbosa Malafaia^a, Tulio Diego da Silva^a, Antônio Fernando de Melo Vaz^b, Alexandre Gomes da Silva^a, Isabel Renata de Souza Arruda^a, Thiago Henrique Napoleão^a, Maria das Graças Carneiro da Cunha^a, Maria Tereza dos Santos Correia^{a,*}

^a*Departamento de Bioquímica-CCB, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brazil.*

^b*Centro de Saúde e Tecnologia Rural ã CSTR, Universidade Federal de Campina Grande / Campus de Patos, Rod PB 110, Jatobá, 58700-970, Patos, Paraíba, Brazil.*

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

E-mail address: mtscorreia@gmail.com

ABSTRACT

Apuleia leiocarpa (Fabaceae) is a tree found in Caatinga with great value in the timber industry. Lectins are proteins that bind specifically and reversibly to carbohydrates and therefore possess several biotechnological applications. This work reports the isolation, characterization and antibacterial activity of ApulSL (*Apuleia leiocarpa* seed lectin). The lectin was isolated from crude extract (in 150 mM NaCl) by chromatography on chitin column. ApulSL adsorbed to the matrix and was eluted with 1.0 M acetic acid. Native ApulSL was characterized as a 55.8-kDa acidic protein. SDS-PAGE showed three polypeptide bands, whereas two-dimensional electrophoresis revealed four spots. Analysis of the spots by MALDI TOF/TOF detected several peptides but without sufficient homology (< 30%) with the database proteins. Circular dichroism spectroscopy suggested a disordered conformational structure and fluorescence spectrum showed the presence of tyrosine residues in the hydrophobic core. The hemagglutinating activity of ApulSL was resistant to heating at 100°C for 2 h, Mn^{2+} -dependent and inhibited by *N*-acetylglucosamine, D(-)-arabinose and azocasein. ApulSL demonstrated bacteriostatic and bactericide effects on Gram-positive and Gram-negative species being more effective against three varieties of *Xanthomonas campestris* (MIC ranging from 11.2 to 22.5 µg/mL and MBC of 22.5 µg/mL). This work reinforces the importance of biochemical prospecting of Caatinga by revealing the antibacterial potential of ApulSL.

Key-words: lectin; *Apuleia leiocarpa*; *Xanthomonas campestris*.

INTRODUCTION

The Caatinga is a vegetation formation exclusively Brazilian that has been recognized as one of the big natural regions of the world [1]. Although it is one of the most threatened biomes on the planet, it is small the number of ethnobotanical studies being conducted in Brazilian semi-arid region [2]. Ethnobotanical surveys are important to direct ethnopharmacological and biospropecting studies aiming to found herbal medicines and other biotechnologically relevant compounds [3].

Fabaceae (leguminous plants) is considered one of the families with the largest number of species in dry and damp forests at the neotropics [4, 5]. This family is best known because of the many species used for human consumption, such as soy, beans and peas. For this reason, leguminous that are not used in the diet have been poorly studied as bioactive sources of proteins with biotechnological potential (e.g. lectins and enzyme inhibitors) and other compounds [6].

Apuleia leiocarpa (Vogel) J. F. Macbride is a tree belonging to the sub-family Caesalpinioideae of Fabaceae [7] and is commonly known in Brazil as ógrápiaô and ójataiô, among other names. It has a wide distribution occurring from northeastern Brazil to Uruguay and Argentina, preferably dwelling the mountain slopes and well drained soils [8]. Its wood has multiple uses, serving the tanning industry [9], the timber industry [10] and construction [8, 10]. Also, it has also potential for use in agroforestry systems [11] as well as with ornamental and reforestation purposes [8].

Lectins are proteins from non-immune origin which bind specifically and reversibly (non-covalently) to free sugars or to the subterminal or terminal residues of glycoconjugates [12]. Lectins have been most studied in leguminous species because they are frequently high abundant in the seeds of these plants [13] coming to constitute up to 10% of total protein [14].

However, many lectins have been isolated and characterized from other plant tissues and families [15, 16, 17, 18, 19].

Because they have the ability to bind mono- and oligosaccharides, the lectins exhibit a variety of biological effects. These proteins have been used as tools in the field of biorecognition technology for investigations of structure and function of complex carbohydrates as well as in mapping of changes in cell surface during physiological and pathological processes [20]. They also have shown immunomodulatory [21], anti-inflammatory [22], antitumor [23], antifungal [24], antibacterial [25, 26], antiviral [27], hypotensive [28], antinociceptive [29] and insecticidal activities [25, 30, 31].

The antimicrobial activity of lectins may result from their ability to interact with carbohydrates exposed on the cell surface of microbes. The cell wall of bacteria precludes any interaction between the glycoconjugates on their membrane and carbohydrate-binding proteins and also prevents these proteins from penetrating the cytoplasm [32]. Thus it seems indispensable that antibacterial lectins firstly interact with cell wall carbohydrates or extracellular glycans before act at a membrane level. In this sense it has been demonstrated that antibacterial lectins usually are able to interact with cell wall components such as *N*-acetylglucosamine, *N*-acetylmuramic acid (MurNAc), tetrapeptides linked to MurNAc and lipopolysaccharides [33].

The *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* causes black rot in all development stages of plant and produces extracellular enzymes that promote plant cell wall degradation, contributing to its pathogenicity [34]. The *X. campestris* pv. *viticola* is the causal agent of bacterial canker of grapevine being considered a pest in the states of Bahia, Pernambuco and Piauí from Brazilian northeastern [35]. *X. campestris* pv. *viticola* can affect inflorescences causing necrotic spots, cankers in rachis and also cause dark and roughly rounded lesions, similar to cankers, on the berries [36]. The *X. campestris* pv. *malvacearum* attacks cotton

crops and has caused major problems to this culture. This pathogen causes angular lesions in the leaves, initially green and oily and, later, brown and necrotic. Control measures against these bacteria are hampered because contaminated seed lots may allow disease spreading through long distances [37].

Despite the biochemical potential of species found at Caatinga and the growing interest for the isolation and characterization of lectins, there are few studies in this sense being conducted at this region. This work describes the purification, characterization and antibacterial activity of a lectin extracted from the seeds of *A. leiocarpa*, constituting an effort to expand the knowledge about bioactive compounds found in Caatinga plants.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Apuleia leiocarpa seeds were collected in at the National Park of Catimbau (PARNA Catimbau), Pernambuco, Brazil, in the months of January to July 2011. The taxonomic identification was performed in the Herbarium Dárdano de Andrade Lima from the *Instituto Agrônomo de Pernambuco* (IPA) and the testimony material was archived in the same herbarium under the number of 84,886.

Preparation of extract

The seeds of *A. leiocarpa* were dried at 45 °C and processed by grinding. The seed flour was homogenized with 150 mM NaCl in a proportion of 10% (w/v) under agitation for 4

h at 28 °C. The homogenate was filtered through filter paper, centrifuged at 3600 rpm for 15 min and the supernatant corresponded to the crude extract (CE).

Hemagglutinating activity (HA)

The presence of lectins was determined by hemagglutinating activity (HA) assay performed in microtiter plates (Kartell SPA, Italy) according to Paiva and Coelho [38] using a suspension (2.5% v/v) of human (A, B or O-types) or rabbit erythrocytes treated with glutaraldehyde [39]. A hemagglutinating unit (titer^{-1}) was defined as the reciprocal of the highest dilution of sample which promoted full agglutination of erythrocytes [40]. The specific HA was defined as the ratio between the titer and protein concentration (mg.mL^{-1}).

Inhibition of ApulSL HA was evaluated using carbohydrates and glycoproteins. The lectin (50 μl) was incubated (45 min) with the inhibitor solution (50 μl) before adding the erythrocyte suspension (50 μl). The concentrations of inhibitor solutions were 100 and 200 mM for carbohydrates [D(-) arabinose, L(+)-arabinose, fructose, fucose, glucose, galactose, D-lactose, D(+)-maltose, mannose, methyl- α -D-mannopyranoside, N-acetyl-galactosamine, N-acetyl-glucosamine, raffinose, rhamnose, and D(-)-ribose] and 250 and 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for glycoproteins (azocasein, casein, fetuin, and thyroglobulin).

The effect of divalent ions (Ca^{2+} , Mg^{2+} e Mn^{2+}) on the ApulSL HA was evaluated. The lectin was previously dialyzed against 5 mM EDTA (16 h at 4 °C) and then against 150 mM NaCl (6 h at 4 °C) to remove the EDTA. The dialyzed ApulSL (50 μL) was incubated (45 min) with 10 mM Ca^{2+} , Mg^{2+} or Mn^{2+} and then HA was determined.

The effect of temperature on the ApulSL HA was evaluated by heating an aliquot of ApulSL (1.5 ml) at different temperatures (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 and 100 ° C for up to 2 h; 121°C in an autoclave for 30 min) prior to HA assay.

The ApulSL HA was also evaluated after it was boiled (5 min at 100 °C) mixed with SDS-PAGE sample buffer (1.0 M Tris-HCl pH 6.8; 0.2 g SDS; 1.0 ml glycerol; 2 mg bromophenol blue). Control assay was also performed incubating erythrocytes only with buffer.

Protein content

Protein concentration was determined according to Lowry et al. [41] using a standard curve of bovine serum albumin with values between 31.25 and 500 µg/ml. The estimation of protein concentration was also performed using the absorbance at 280nm.

Purification of ApulSL

The CE (1.0 mg of protein) was loaded onto a chitin (7.5 x 1.5 cm) column. The column was washed with 150 mM NaCl until absorbance at 280 nm was lower than 0.030. Elution was performed with 1.0 M acetic acid. Fractions of 2 ml were collected every 6 minutes and monitored for protein by absorbance at 280 nm. The fractions with absorbance ≤ 0.100 were pooled (ApulSL) and dialyzed in aqueous 150 mM NaCl to remove the acetic acid.

Gel filtration chromatography

A sample of ApulSL(500 µg) in 150 mM NaCl was loaded onto a Hiprep Sephacryl[®] 16/60 S100 HR column (GE Healthcare, Sweden) coupled to a ÄKTA prime system in order to determine the molecular mass of the native protein. The chromatography was performed a

flow rate of 0.5 mL/min in 150 mM NaCl; 3ml fractions were collected and the protein elution was monitored by absorbance at 280 nm. Molecular mass standards phosphorylase b (97kDa), albumin (66kDa), ovalbumin (45kDa), carbonic anhydrase (30kDa), trypsin inhibitor (20.1 k Da), and α -lactalbumin (14.4kDa) were similarly chromatographed.

Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)

PAGE for native acidic proteins [15% gel (w/v)] was carried out according to Davis [42] and for native basic proteins was performed according Reisfeld et al. [43]. Polypeptide bands were stained with 0.02% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 in 10% acetic acid (for acidic proteins) or 1% Amido Black in 10% acetic acid (for basic proteins).

Electrophoresis on 15% (w/v) polyacrylamide gel in presence of sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE) was performed according to Laemmli [44]. Polypeptide bands of ApulSL and standard molecular mass (bovine albumin, 66 kDa; ovalbumin, 45 kDa; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, 36 kDa, bovine carbonic anhydrase, 29 kDa; bovine trypsinogen, 24 kDa, trypsin inhibitor soybean, 20.1 kDa; α -lactalbumin, 14.4 kDa; all purchased from Sigma-Aldrich, USA) were stained with 0.02% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 in 10% acetic acid.

Two-dimensional electrophoresis

ApulSL (200 μ g) was mixed with 250 μ l of rehydration buffer containing 8 M urea, 2% (w/v) CHAPS, 20 mM dithiothreitol (DTT), 0.5% IPG buffer (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA), and 0.002% (w/v) bromophenol blue. The samples were loaded in IPG (immobilized pH gradient) strip (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) with 13 cm and a

linear pH range of 3.0 to 10.0. The isoelectric focusing was performed on Ettan IPGphor III system (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) following the manufacturer's protocol. Before running the second dimension electrophoresis, the strip was equilibrated for 15 min in fresh buffer (6 M urea, 30% (v/v) glycerol, 2% (w/v) SDS, 100 mM Tris-HCl pH 8.8) with the addition of 100 mM DTT and then for 15 minutes in buffer supplemented with 0.25 M iodoacetamide. The equilibrated IPG strip was transferred to 12.5% (w/v) SDS-PAGE gel. The proteins in the gel were visualized by staining with Coomassie Brilliant Blue R-250. Images of the stained gel were acquired with scanning resolution of 300 dpi and 16-bit pixel depth and then analyzed using the software Image Master 2D Platinum 6.0 (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA).

Mass Spectroscopy (MALDI-TOF/TOF)

The digestion of the proteins in the 2D-gel was performed as described by Shevchenko et al. [45] with minor modifications. Trypsin was used at a concentration of 25 ng/mL and the alkylation step and the reduction in-gel were omitted. The peptides obtained after digestion were dissolved in 10 ml of 0.1% trifluoroacetic acid (TFA). A saturated solution of the matrix α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (4 mg/mL) in 50% acetonitrile and 0.3% TFA was mixed with sample (1:1), placed on target plate Chip Anchor 800/384 (Bruker Daltonik GmbH) and dried under laminar airflow for recrystallization. For calibration of mass spectrometer, 0.5 μ l standard peptides (Bruker Daltonik GmbH) were placed on the target with 0.8 mL of matrix and also allowed to recrystallize. The samples were analyzed in a mass spectrometer MALDI-TOF/TOF (Ultraflex, Bruker Daltonics) in reflectron mode. Peptides with a signal to noise ratio above 100 MS/MS were analyzed using the LIFT technology that

is embedded in Ultraflex spectrometer. On average, 10 MS/MS spectra were measured for each protein digested.

Data analysis was performed using BioTools software 3.0 (Bruker Daltonik) and search engine MASCOT (Matrix Sciences, UK). Searches were performed using the following parameters: a mass tolerance of 0.7 Da was adjusted to fragmented ions. Trypsin was defined as the proteolytic enzyme with two missed cleavages permitted. Charge state 1+ was used. Carbamidomethylation of cysteine residues was used as a fixed modification, and oxidation of methionine residues was defined as a change in the variable. MSDB, Swissprot and NCBI nr databases were used to identify proteins or MASCOT search engine available online (Matrix Science, UK).

Circular dichroism (CD) spectroscopy

CD measurements were performed using a spectropolarimeter (JASCO J-810, Tokyo, Japan). The protein concentration was $300 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ in water and the assays were performed at 25 °C. The CD spectra were measured in the far UV range (190-250 nm) in quartz cuvette with 10 mm optical path. The baselines (only water) were subtracted from the protein spectra. Results were expressed as mean residue ellipticity $[\theta]$, defined as $[\theta] = \theta_{obs}/(10.C.l.n.)$, where θ_{obs} is the CD in millidegrees, C is the protein concentration (M), l is the path-length of the cuvette (cm), and n is the number of amino acid residues, assuming an average of 469 residues according to results from gel filtration chromatography.

Fluorescence spectroscopy

Intrinsic fluorescence assay was performed on a spectrofluorimeter (JASCO FP-6300, Tokyo, Japan). The intensity of fluorescence emission of hydrophobic residues from the protein in water was measured at 25°C in a rectangular quartz cuvette with a path length of 10 mm. For measurements of intrinsic fluorescence, excitation was at 280 nm and emission at 305-450 nm was recorded using filters of 10 nm. The contribution of the solvent (distilled water) was subtracted. The center of spectral mass (CM) was calculated according to the equation: $CM = \sum I_{\lambda} F_{\lambda} / \sum F_{\lambda}$, where F_{λ} stands for the fluorescence emission at wavelength I_{λ} and the summation was carried out over the range of appreciable values of F .

Antibacterial activity

Strains of the Gram-positive bacteria *Enterococcus faecalis* (ATCC 6057/ UFPEDA 138), *Streptococcus pyogenes* (UFPEDA 07), *Micrococcus luteus* (ATCC 2225/ UFPEDA 320), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633/ UFPEDA 86), *Bacillus cereus* (ATCC11778/ UFPEDA 213), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538/ UFPEDA 02), *Staphylococcus epidermidis* (UFPEDA 183) as well as the Gram-negative bacteria *Escherichia coli* (ATCC 25922/ UFPEDA 224), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853/ UFPEDA 416), *Klebsiella pneumonia* (ATCC 29665/ UFPEDA 396), *Salmonella enteritidis* (UFPEDA 415), and *Shigella sonnei* (UFPEDA 413) were provided by the Department of Antibiotics, Universidade Federal de Pernambuco, Brazil. The Gram-negative species *Acidovorax citrulli* (Ac 1.12), *Pectobacterium carotovorum* (Pcc 31), *Ralstonia solanacearum* (Rsol CM10R22), *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Xcv 137), *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* (Xcm 11.2.1) and *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc 53) were provided by the Collection of Phytopathogenic Bacteria belonging to the *Laboratório de*

Fitobacteriologia, Área de Fitossanidade from the Department of Agronomy of the *Universidade Federal Rural de Pernambuco*.

Stationary cultures were maintained on nutrient agar (NA) or Müller Hinton agar and stored at 4°C. To determine the antimicrobial activity, bacteria were grown on Müller Hinton Broth at 37 °C for 24h. The cultures were adjusted turbidimetrically to 0.5 in McFarland scale.

Aliquot (150 µl) of ApulSL (0.36 mg.ml⁻¹ in 150 mM NaCl) was diluted 1:2 into 150 µl of Nutrient Broth (NB) or Müller Hinton Broth and serially diluted to a final ratio of 1:2048. Next, all wells were inoculated with 20 µl of bacterial culture and incubated at 37 °C for 24 h. Negative control contained NB and microorganism. Controls containing NB + 150 mM NaCl + microorganism were also done. After incubation, the optical density at 490 nm (OD₄₉₀) was measured using a microplate reader. The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined as the lowest concentration of lectin in which there was a 50% reduction in optical density (growing bacterial) relative to OD₄₉₀ in negative control [46].

To determine the minimum bactericidal concentration (MBC) inoculations (10 µl) from wells treated with ApulSL that were found to inhibit bacterial growth were transferred to Müller Hinton Agar plates and incubated at 37 °C for 24 h. The lowest concentration which shows no bacterial growth was registered as MBC. The assay was performed in triplicate.

RESULTS

Purification and structural characterization of ApulSL

CE from *A. leiocarpa* seeds showed HA of 256, which was totally lost after heating at 100 °C for 1 h and partially inhibited by *N*-acetylglucosamine (100 mM). The CE was then

chromatographed on chitin column (Figure 1). The nonadsorbed fractions did not show HA and elution with 1.0 M acetic acid gave a single active protein peak; all the fractions containing HA were pooled and the preparation was named ApulSL. ApulSL showed specific HA higher than that of the CE as shown in Table 1.

Analysis of ApulSL by gel filtration chromatography evidenced a single peak corresponding to a native molecular mass of 55.8 kDa (Figure 2). In PAGE for native acidic proteins a single band was detected (Figure 2, inset 1) while no band was detected in native PAGE for basic proteins. SDS-PAGE of ApulSL revealed three polypeptide bands with molecular masses 22, 16 and 14 kDa (Figure 2, inset 2). ApulSL was then evaluated by two-dimensional electrophoresis and four spots could be visualized (Figure 3). The isoelectric point (pI) and molecular mass of each spot were: 5.4 and 21.0 kDa (spot 1); 5.6 and 16 kDa (spot2); 6.4 and 16 kDa (spot 3); 7.1 and 14 kDa (spot 4).

The four spots were then trypsinized and analyzed in MALDI TOF/TOF. The hydrolysis of spots 1, 2, 3 and 4 yielded 10, 9, 8 and 7 peptides, respectively and the average isotopic masses of the peptides are shown in Table 2. The peptides sequences showed a low level of homology (<30%) with sequences contained in the protein databases.

CD spectrum of ApulSL (Figure 4A) showed that this protein did not contain regions of α -sheet or β -helices in its structure being its profile similar to the spectrum of proteins with disordered structure. The intrinsic fluorescence spectrum of ApulSL showed one major peak at 332 nm (Figure 4B), indicating the presence of tyrosine in the highly hydrophobic core.

Characterization of ApulSL HA

The ApulSL presented HA with all erythrocytes tested, showing the following ascending order of preference: human erythrocytes types A and B (specific HA of 4876),

human erythrocytes type O (specific HA of 9752) and rabbit erythrocytes (specific HA of 19,504).

ApulSL had its HA partially inhibited by N-acetylglucosamine and D(-)-arabinose (100 and 200 mM) and totally inhibited by azocasein (250 and 500 mg.mL⁻¹). ApulSL proved to be a ion dependent lectin since the HA dropped from 512 to 16 after dialysis against chelating agent EDTA and was partially restored by 10 mM Mg²⁺, fully restored by 10 mM Ca²⁺ and stimulated by 10 mM Mn²⁺ (Table 3). Only the ion calcium did not stimulate HA of ApulSL non-treated with EDTA, being manganese the most stimulating ion (Table 3). The lectin showed to be thermo-stable since its HA was preserved after heating at 100 °C for 2 h. ApulSL showed a reduction in HA by half after had been autoclaved for 30 min.

Antimicrobial activity

ApulSL showed inhibitory activity against the Gram-positive bacteria *B. subtilis*, *B. cereus*, *E. faecalis*, *M. luteus*, *S. pyogenes*, and *S. aureus* (Table 4), with the smallest MIC (45.12 µg/ml) against *Bacillus* species. It was not detected bactericidal activity against Gram-positive bacteria.

The Gram-negative species inhibited by ApulSL were *X. campestris* pv. *campestris*, *X. campestris* pv. *viticola*, *X. campestris* pv. *malvacearum*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, and *S. enteritidis*, with the lowest MIC (11.2 µg/ml) against *X. campestris* pv. *campestris* (Table 4). ApulSL was bactericide (MBC of 22.5 µg/ml) only against the three varieties of *X. campestris*. The ratio MBC/MIC ranged between 1 and 2 indicating the effectiveness of ApulSL as a bactericide agent.

DISCUSSION

This study shows that seeds of *A. leiocarpa*, a legume with consecrated application in the timber industry, contain a lectin. The first evidence of lectin presence in the seeds was the fact that the HA of the crude extract was lost after heating suggesting that erythrocyte agglutination was promoted by a protein. The inhibition of HA by *N*-acetylglucosamine revealed that agglutination was linked to a carbohydrate-binding protein. ApulSL was well-extracted by using saline solution (150 mM NaCl) similar to many other proteins that are solubilised with aid of a low ionic strength, generally around 0.15 to 0.2 M [47].

The inhibition of HA from extract by *N*-acetylglucosamine (chitin monomer), stimulated the chosen of this matrix for lectin isolation. Lectin purification was evidenced by the highest specific HA of ApulSL obtained after chitin chromatography in comparison with extract. PAGE for native acidic proteins revealed the homogeneity of ApulSL.

The results obtained by gel filtration chromatography and SDS-PAGE suggested that ApulSL is trimeric protein with native molecular mass of 55.8 kDa composed by three distinct subunits. Two-dimensional electrophoresis revealed two molecular forms of the 16-kDa subunit (with isoelectric points of 5.6 and 6.4), which suggests that there are two lectin isoforms that have minor differences in amino acid composition of this subunit.

The mass spectrometry (MALDI TOF/TOF) gave us the averages of isotopic masses of the several peptides obtained after digestion of ApulSL spots. However, the lack of sufficient homology with protein sequences of databases did not allow elucidation of the primary sequence of this protein by peptide mass fingerprint. Thus the primary structure of ApulSL remains to be determined directly by other techniques in the future. Analysis by circular dichroism and fluorescence spectroscopy revealed that ApulSL is a protein with disordered structure and possess tyrosine residues at its hydrophobic core.

ApulSL showed good resistance to heating similarly to others lectins that were stable after being heated at 100°C such as *Ganoderma capense* mushroom lectin [48] and the lectin from the *Moringa oleifera* seeds, cMoL [49]. A disordered structure (which does not mean that there is no conformational stability) can be linked to the stability of ApulSL at different temperatures. According to Oxender and Fox [50], since less energy is required to maintain a disordered tertiary structure, the protein has high conformational entropy and, consequently, a greater stability.

ApulSL is an ion-dependent protein because its HA was significantly reduced after treatment with EDTA and partially or fully restored by cations. Another lectin with similar ion-dependent behavior is the lectin extracted from the *Kalanchoe crenata* leaves [51]. Several lectins contain metal ions, mainly Mn^{2+} and/or Ca^{2+} , and it has been demonstrated the requirement of the metal ions for lectin activity. These metal ions can be located close or inside the carbohydrate-binding site serving to maintain the integrity of the lectin subunits and/or to help the positioning of amino acid residues for carbohydrate binding [52]. The HA inhibition assays revealed that ApulSL has highest affinity for *N*-acetylglucosamine and D(-)-arabinose as well as the glycoprotein azocasein.

Despite presenting HA with all erythrocytes tested (A, B, O and rabbit), ApulSL showed preference for O-type blood. Among the sugars that comprise antigens glucose, galactose, fucose and *N*-acetylglucosamine are common in all four blood groups and constitute the main antigenic structures of O group [53].

The *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) is part of the composition of peptidoglycan or murein, present in the cytoplasmic membrane of almost all eubacteria [54]. The chains of these glycans are composed by alternating units of *N*-acetylglucosamine and *N*-acetylmuramic acid (MurNAc). The GlcNAc is present in both Gram-positive and Gram-negative bacteria but is more exposed in Gram-positive [55]. This amino sugar plays important roles in bacteria by

participating in cell signaling, colonization of human hosts (formation of fimbriae or pilus that mediate adherence to host cells), and as component of the Curli fibers that promote the biofilm formation [56, 57, 58,59].

Among the tested species *X. campestris* varieties were more susceptible to ApulSL. A previous report showed that the lectin extracted from the nitrogen-fixing soil bacterium *Paenibacillus polymyxa* was bactericide against *X. campestris* [60]. They suggested that antibacterial effect is a result of interaction of lectin with specific receptors at cell membrane, inducing conformational alterations and concurrent malfunction of the metabolism of bacterial cells. In other study it was found that GlcNAc passively diffuses through the cell wall of *X. campestris* pv. *campestris*, indicating a possible use of this monosaccharide as substrate for this bacteria and its metabolic importance [61]. In this sense it is possible that interaction of ApulSL with GlcNAc interferes on its use by bacterial cells.

Among the bacteria that ApulSL inhibited, the majority is not D(-)-arabinose fermenter (*E. faecalis*, *S. pyogenes*, *M. luteus*, *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli*, and *P. aeruginosa*). Thus it seems that the inhibitory effect of ApulSL was not a result of damage to capture of this monosaccharide from the medium. However, this may be a justification for the growth inhibition of the D(-)-arabinose fermenters *B. subtilis*, *K. pneumoniae* and *S. enteritidis* [62, 63,64, 65, 66].

In their studies about the lectin-microorganisms interaction, Gaidamashvili and Van [67] observed that plant lectins are able to promote agglutination when bind the carbohydrates exposed on the cell surface of microorganism. Therefore, it is possible that lectins exert inhibitory effect on microbial growth by agglutination.

Since the ApulSL showed bacteriostatic and bactericidal activities against three varieties of *X. campestris*, further studies are needed for better understand the mode-of-action of this molecule and propose strategies for possible application for the control of these

phytopathogens. In conclusion, this work reports the purification and characterization of a novel antibacterial lectin reinforcing the importance of biochemical prospecting of Caatinga plants.

Acknowledgments

The authors Express their gratitude to the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq), the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES), the *Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco* (FACEPE) and the Brazilian Ministry for Science, Technology and Innovation (MCTI) for research grants, fellowship and scholarships.

REFERENCES

- [1] P.R. Gil, Wilderness ã Earth's cast wild places. CEMEX, México.2002.
- [2] U.P. Albuquerque, L.H.C. Andrade, Conhecimento botânico tradicional e conservação em uma área de caatinga no Estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil, *Acta Botanica Brasilica*, 16 (2002) 273-285.
- [3] U. P. Albuquerque, N.Hanazaki, As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas, *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 16(2006) 678-689.
- [4] A. H. Gentry, Diversity and floristic composition of neotropical dry forests. *in*: H. Bullock, H. A. Mooney & E. Medina (eds.) *Seasonally Dry Tropical Forests*. Cambridge University Press, Cambridge. 1995, pp.146-193.
- [5] A. H. Gentry, *Fourneotropical rainforests*. New Haven, Yale University Press.1990.

- [6] I. E. Liener (ed.), Toxic constituents of Plants Foodstuffs. New York, Academic Press. 1969.
- [7] G. Lewis, Schrire, B., Mackinder, B. et al. (2005) Legumes of the World. UK Kew: Royal Botanic Gardens, 577.
- [8] J. N. C. Marchiori, Dendrologia das angiospermas: leguminosas. Santa Maria: Ed. UFSM. 1997.
- [9] P. E. R. Carvalho, Espécies arbóreas brasileiras. Colombo: EMBRAPA/CNPR, Brasília: EMBRAPA/SPI.2003.
- [10] R. Reitz, R. M. Klein, A.Reis, Projeto Madeira do Rio Grande do Sul. Porto Alegre: SUDESUL.1988.
- [11] P. E. R. Carvalho, Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária; Centro Nacional de Pesquisa de Florestas ã Colombo: EMBRAPA ã CNPF; Brasília: EMBRAPA ã SPI. 1994.
- [12] S.A. Brooks, A.J. Leathem, Expression of N-acetyl galactosaminylated and sialylatedglycans by metastases arising from primary breast cancer, Invasion Metastasis. 18(1998) 115-121.
- [13] F. G. Sol, B.S. Cavada, J. J. Calvete, Crystal structures of *Cratylia floribunda* seed lectin at acidic and basic pHs. Insights into the structural basis of the pH-dependent dimer-tetramer transition, Journal of Structural Biology. 158 (2007) 1-9.
- [14] S. R. Spilatro, G. R. Cochran, R. E. Walker, K. L. Cablish, C. C. Bittner, Characterization of a new lectin of soybean vegetative tissues, Plant Physiology. 110 (1996) 825-834.
- [15] E. Zenteno, L. Vázquez, R. Chávez, F. Córdoba, J.M. Wieruszeski, J. Montreuil, H. Debray, Specificity of the isolectins from the plant cactus *Machaerocereus eruca* for

- oligosaccharides from porcine stomach mucin, Glycoconjugate Journal. 12(1995) 699-706.
- [16] R. A. Moreira, C.C. Castelo-Branco, A.C. Monteiro, R.O. Tavares, L.M. Beltramini, Isolation and partial characterization of a lectin from *Artocarpus incisa* L. seeds, Phytochemistry. 47 (7) (1998) 1183-1188.
- [17] R. Wititsuwannakul, D. Wititsuwannakul, C. Sakulborirug, A lectin from the bark of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*), Phytochemistry. 47(2)(1998) 183-187.
- [18] J.L. Fernández-Alonso, N. Vega, J. J. Filgueira, G. Pe´rez, Lectin prospecting in Colombian Labiatae. A systematic-ecological approach, Biochemical Systematics and Ecology. 31 (6) (2003) 617-633.
- [19] W. J. Peumans, P. Roug , E. J. M. Van Damme, The tomato lectin consists of two homologous chitin-binding modules separated by an extensin-like linker. Biochemical Journal. 376 (2003) 717-724.
- [20] P. Gemeiner, D. Mislovicov , J. Tk c, J. Svitel, V. P toprst y, E. Hrab rov , G. Kogan, T. Koz r, Lectinomics: II. A highway to biomedical/clinical diagnostics, Biotechnology Advances, 27 (2009) 1-15.
- [21] E.V.M. Maciel, V.S. Ara jo-Filho, M. Nakazawa, Y.M. Gomes, L.C. Coelho, M.T. Correia, Mitogenic activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes, Biologicals. 32(2004) 57-60.
- [22] C.M.L. Melo, M.C. Castro, A.P. Oliveira, F.O. Gomes, V.R. Pereira, M.T. Correia, L.C. Coelho, P.M.G. Paiva. Immunomodulatory response of Cramoll 1,4lectin on experimental lymphocytes, Phytotherapy Research. 24 (2010) 1631-1636.
- [23] E.S. Nunes. M.A. Souza, A.F. Vaz, T.G. Silva, J.S. Aguiar, A.M. Batista, M.M. Guerra, M.C. Guarnieri, L.C. Coelho, M.T. Correia, Cytotoxic effect and apoptosis induction by *Bothrops leucurus* venom lectin on tumor cell lines, Toxicon. 59 (2012) 667-671.

- [24] J.D.Souza, M.B.R. Silva, A.C.C. Argolo, T.H. Napoleão, R.A. Sá, M.T.S. Correia, P.M.G. Paiva, M.D.C. Silva, L.C.B.B. Coelho, A new *Bauhinia monandra* galactose-specific lectin purified in milligram quantities from secondary roots with antifungal and termiticidal activities, *International Biodeterioration & Biodegradation*. 65 (2011) 696-702.
- [25] R.A. Sá, N.D. Santos, C.S. Silva, T.H. Napoleão, F.S. Gomes, B.S. Cavada, L.C. Coelho, D.M. Navarro, L.W. Bieber, P.M. Paiva, Larvicidal activity of *Myracrodruon urundeuva* lectins on *Aedes aegypti*, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C, Toxicology and Pharmacology*. 149 (2009) 300-306.
- [26] E. S. Nunes, M.A. Souza, A.F. Vaz, G.M. Santana, F.S. Gomes, L.C. Coelho, P.M. Paiva, R.M. Silva, R.A. Silva-Lucca, M.L. Oliva, M.C. Guarnieri, M.T. Correia. Purification of a lectin with antibacterial activity from *Bothrops leucurus* snake venom, *Comparative Biochemistry and Physiology Part B, Biochemistry and Molecular Biology*. 159 (2011) 57-63.
- [27] Y. Sato, K. Morimoto, M. Hirayama, K. Hori, High mannose-specific lectin (KAA-2) from the red alga *Kappaphycus alvarezii* potentially inhibits influenza virus infection in a strain-independent manner, *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 405 (2011) 291-296.
- [28] H.X. Wang, V.E. Ooi, T.B. Ng, K.W. Chiu, S.T. Chang, Hypotensive and vasorelaxing activities of a lectin from the edible mushroom *Tricholoma mongolicum*, *Pharmacology & Toxicology*. 79 (6) (1996) 318-323.
- [29] J.G. Figueiredo, F.S. Bitencourt, C.S. Teixeira, P.B. Luz, E.H. Bezerra, M.R. Mota, A.M. Assreuy, F. C. Queiroz, B.S. Cavada, N.M. Alencar, Antinociceptive activity and toxicology of the lectin from *Canavalia boliviana* seeds in mice, *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 380 (2009) 407-414.

- [30] C.F.R. Oliveira, L.A. Luz, P.M.G. Paiva, L.C.B.B. Coelho, S. Marangoni, M.L.R. Macedo, Evaluation of seed coagulant *Moringa oleifera* lectin (cMoL) as a bioinsecticidal tool with potential for the control of insects, *Process Biochemistry*. 46 (2011) 498-504.
- [31] P.M.G. Paiva, T.H. Napoleão, N.D.L. Santos, et al., Plant compounds with *Aedes aegypti* larvicidal activity and other biological properties. In: LIONG, M.-T. (ed.), *Bioprocess Sciences and Technology*, New York: Nova Publishers Inc. (2011) 271-296.
- [32] V. Bobbarala (ed), *Antimicrobial Agents*, InTech, 422 p. (2012) ISBN 978-953-51-0723-1. DOI: 10.5772/1867
- [33] F.S. Gomes, T.F. Procópio, T.H. Napoleão, L.C. Coelho, P.M. Paiva, Antimicrobial lectin from *Schinus terebinthifolius* leaf, *Journal of Applied Microbiology*. 114 (3) (2013) 672-679. doi: 10.1111/jam.12086
- [34] J. Rodrigues Neto, V.A. Malavolta Junior, Doenças causadas por bactérias em crucíferas, *Informe Agropecuário*. 17 (1995) 56-59.
- [35] BRASIL. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução normativa n. 233 de 7 de dez, 1998. Dá continuidade aos trabalhos de levantamento da praga *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* na Região do Submédio São Francisco e institui normas para sua erradicação. *Diário Oficial (da República Federativa do Brasil)*, Brasília, 1998, pp.89.
- [36] V.A. Malavolta Junior, I.M.G. Almeida, M.H. Sugimori, I.J.A. Ribeiro, Resistência de variedades de videira a *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, *Arquivos do Instituto Biológico*. 70(3)(2003)373-376.
- [37] L.M.A. Bacchi, P.E. Degrande, W.L. Gavassoni, Etiologia de podridões em maçãs e em algodoeiros no cerrado do Brasil, *Fitopatologia Brasileira*. 27 (2002) 180-181.
- [38] P. M. G. Paiva, L. C. B. B. Coelho, Purification and partial characterization of two lectin isoforms for *Cratylia mollis* Mart (Camaratu bean), *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 36(1992) 113-118.

- [39] D. H. Bing, J. G. M. Weyand, A. B. Stavitsky, Hemagglutination with aldehyde-fixed erythrocytes for assay of antigens and antibodies, *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 124(1967) 1166-1170
- [40] T. H. Napoleão, F. S. Gomes, T. A. Lima, N. D. L. Santos, R. A. Sá, A. C. Albuquerque, L. C. B. B. Coelho, P. M. G. Paiva, Termiticidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* against *Nasutitermes corniger* and its mechanisms, *International Biodeterioration & Biodegradation*. 65(2011) 52-59.
- [41] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *The Journal of Biological Chemistry*. 193(1951) 265-275.
- [42] B. J. Davis, Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins, *Annals of the New York Academy of Sciences*. 121 (1964) 404-427.
- [43] R. A. Reisfeld, U. J. Lewis, D. E. Williams, Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels, *Nature*. 195 (1962) 281-3.
- [44] U. K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*. 227 (1970) 680-685.
- [45] A. Shevchenko, H. Tomas, J. Havlis, J. V. Olsen, M. Mann, In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes, *Nature Protocols*. 1(2007) 2856-2860.
- [46] D. Amsterdam, Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media. In: *Antibiotics in Laboratory Medicine*, ed. V. Loman (1996) 52-111. Baltimore, MD: Williams and Wilkins.
- [47] A. Pessoa Júnior, B. V. Kilikian, *Purificação de produtos biotecnológicos*, Barueri, Manole, 2005.
- [48] P. H. K. Ngai, T. B. Ng, A mushroom (*Ganoderma capense*) lectin with spectacular thermostability, potent mitogenic activity on splenocytes, and antiproliferative activity

toward tumor cells, Journal Biochemical and Biophysical Research Communications. 314(4)(2004) 988-993.

- [49] A. F. S.Santos, L. A.Luz, A. C. C.Argolo, J. A.Teixeira, P. M. G. Paiva, L. C. B. B. Coelho, Isolation of a seed coagulant *Moringa oleifera* lectina, Process Biochemistry. 44 (2009) 504-508.
- [50] D.L. Oxender, C.F. Fox, Protein Engineering, New York: Alan R. Liss, 1987.
- [51] K.Adenike, O. B. Eretan, Purification and partial characterization of alectin from the fresh leaves of *Kalanchoecrenata*(Andr.) Haw, Journal of Biochemistry and Molecular Biology. 37(2004)229-233.
- [52] H.Lis, N. Sharon, Lectins in higher plants, Biochemistry of Plants. 6 (1989) 371-447.
- [53] S. T. Feizi, The major blood group ABO (H) determining genes are isolated, Trends in biochemical sciences. 15(9)(1990) 330-331.
- [54] K.H., Schleifer, O.Kandler, Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications, Bacteriological Reviews. 36 (1972) 407-477.
- [55] J. vanHeijenoort, Assembly of the monomer unit of bacterial peptidoglycan, Cellular and molecular life sciences: CMLS. 54 (1998) 300-304.
- [56] B. K.Sohanpal, S.El-Labany, M.Lahooti, J. A.Plumbridge, I. C. Blomfield, Integrated regulatory responses of fimB to N-acetylneuraminic (sialic) acid and GlcNAc in Escherichia coli K-12, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 101 (2004) 16322-16327.
- [57] H.Hirakawa, Y. Inazumi, Y.Senda, A. Kobayashi, T.Hirata, K.Nishino, A. Yamaguchi, N-acetyl-D-glucosamine induces the expression of multidrug exporter genes, mdtEF, via catabolite activation in Escherichia coli, Journal of Bacteriology. 188(2006) 5851-5858.

- [58] U. Gophna, M. Barlev, R. Seijffers, T. A. Oelschlager, J. Hacker, E. Z. Ron, Curli fibers mediate internalization of *Escherichia coli* by Eukaryotic cells, *Infection and immunity*. 69(2001) 2659-2665.
- [59] M. M. Barnhart, J. Lynem, M. R. Chapman, GlcNAc-6P levels modulate the expression of Curli fibers by *Escherichia coli*, *Journal of Bacteriology*. 188 (2006) 5212-5219.
- [60] L. V. Karpunina, U. Yu. Mel'nikova, Yu. V. Suslova, E. S. Mukhacheva, V. V. Ignatov, The bactericidal activity of lectins from nitrogen-fixing bacilli, *Mikrobiologiya*. v. 72 (3) (2003) 343-347.
- [61] A. Boulanger, G. Déjean, M. Lautier, M. Glories, C. Zischek, M. Arlat, E. Lauber, Identification and regulation of the N-acetylglucosamine utilization pathway of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Journal of Bacteriology*. 192(2010) 1487-1497.
- [62] M. Ford, J. D. Perry, F. K. Gould, Use of cephalexin-aztreonam-arabinose agar for selective isolation of *Enterococcus faecium*, *Journal of clinical microbiology*. 32 (1994) 2999-3001.
- [63] T. S. Khan, R. Rind, Isolation and characterization of bacterial species from surgical and non-surgical wounds located on body surface of buffaloes, cattle, sheep and goats, *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 4 (2001) 696-702.
- [64] B. M. Okanlawon, S. T. Ogunbanwo, A. O. Okunola, Growth of *Bacillus cereus* isolated from some traditional condiments under different regimens, *African Journal of Biotechnology*. 8(2010) 2129-2135.
- [65] R. B. Uma, N. Chandrakanth, P. S. Indu, N. R. Venkata, K. B. Usha, Isolation and characterization of faecal coliforms in street vended fruit juices and its safety evaluation: a case study of Bellary city, India, *Internet Journal of Food Safety*. 11(2009) 35-43.

- [66] M.H. Mirmomeni, S. Naderi, A. H. Colagar, S. Sisakhtnezhad, Isolation of *Salmonella enteritidis* using biochemical tests and diagnostic potential of sdfi amplified gene, Research Journal of Biological Sciences. 4 (2009) 656-661.
- [67] M.Gaidamashvili, J. Van Standen, Interaction of lectin-like proteins of South African medicinal plants with *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*, Journal of Ethnopharmacology. 80 (2002) 131-135.

Figure 1. Isolation of *Apuleia leiocarpa* seed lectin (ApulSL) by chromatography of crude extract on chitin column. Arrow indicates the addition of the eluent 1.0 M acetic acid. Fractions of 2.0 ml were collected. Each dot represents the average of three experiments.

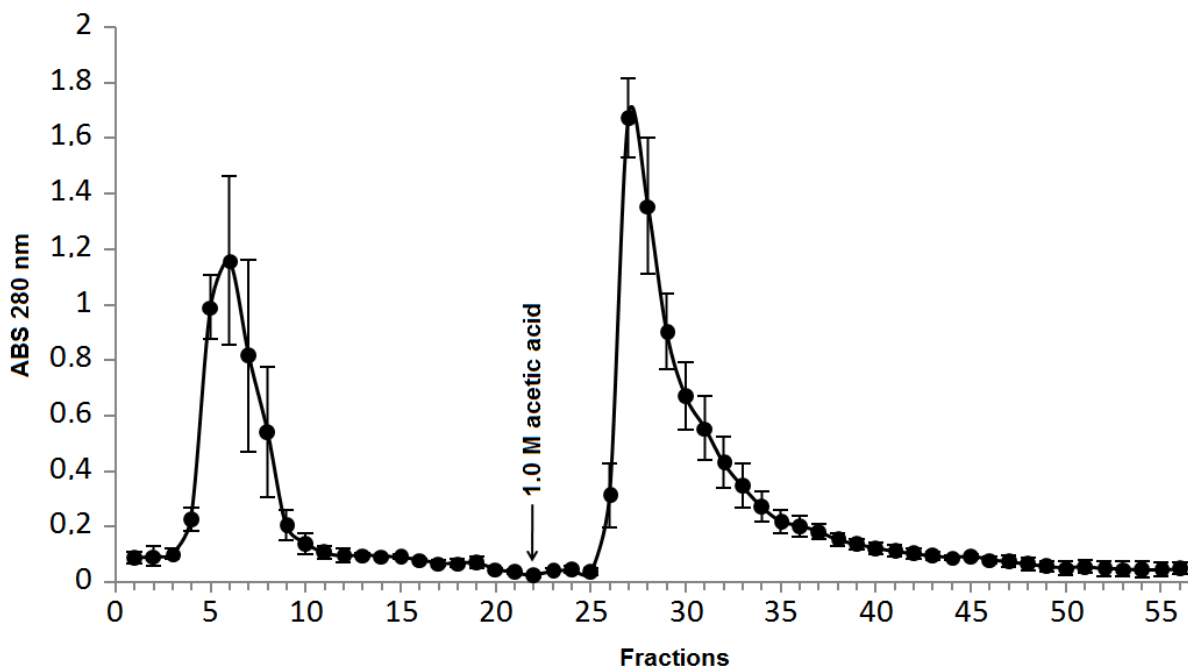


Figure 2. Profile of native ApulSL on gel filtration chromatography on a Hipep 16/60 Sephacryl S-100HR column coupled to ÄKTA prime system. Sample (500 µg) was injected

and eluted (2.0 mL fraction) with 0.15 M NaCl. The insets represent PAGE for native acidic proteins (1) and SDS-PAGE of ApulSL (2).

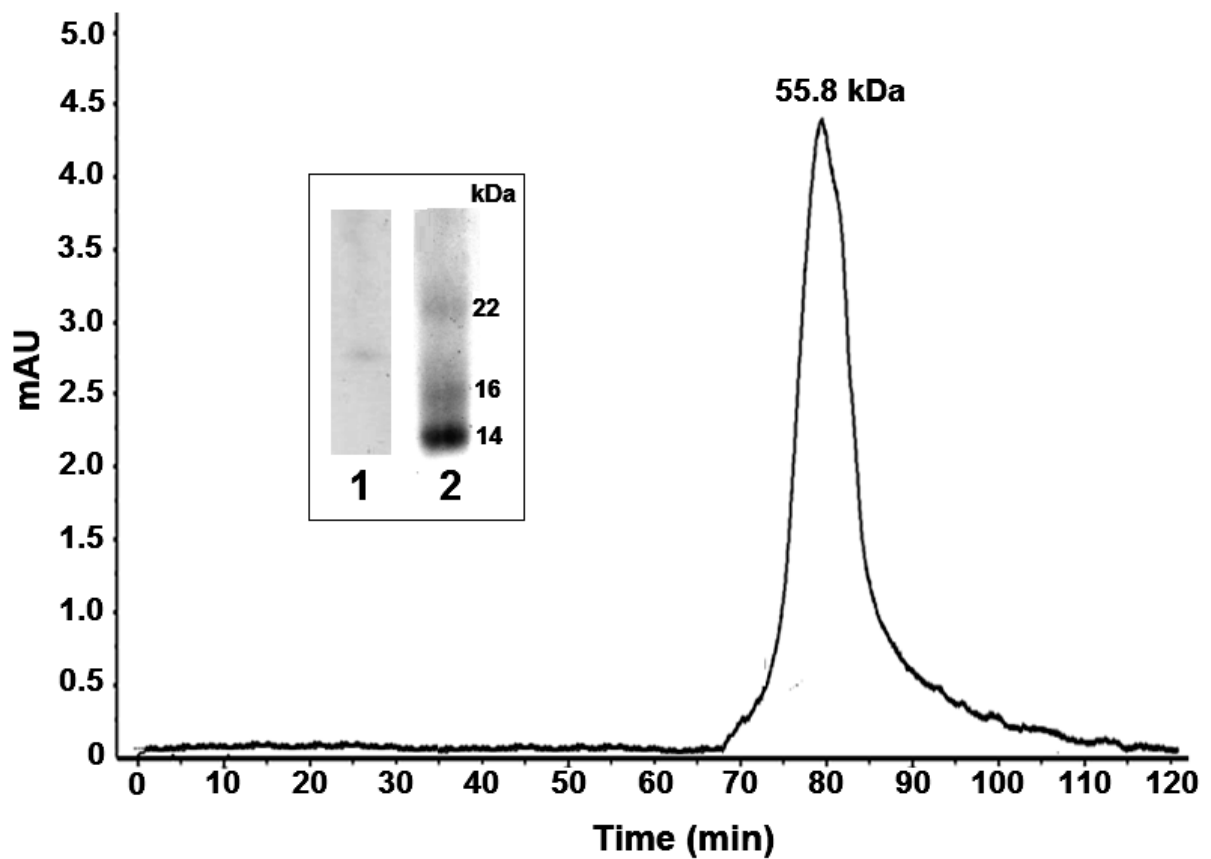


Figure 3. Two-dimensional electrophoresis of ApulSL. It can be seen four spots with the following molecular weights and isoelectric points: 21 kDa and 5.4 (A1); 16 kDa and 5.6

(A2); 16 kDa and 6.4 (A3); 14kDa and 7.1 (A4). The gel was stained with Coomassie Brilliant Blue.

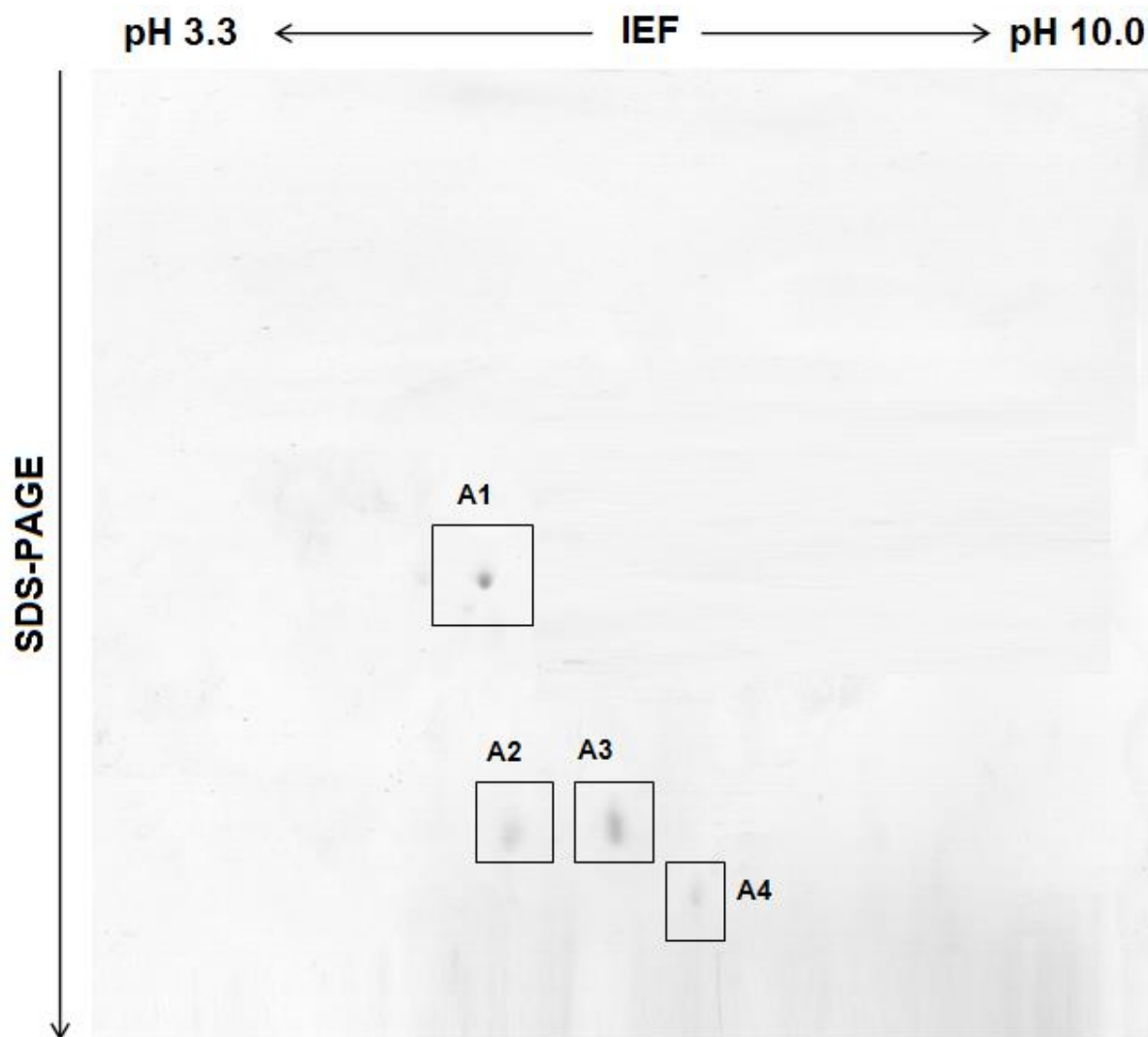


Figure 4. Structural characterization of ApulSL. (A) Circular dichroism spectrum of ApulSL showing a negative peak at 212 nm. Spectrum is similar to that of proteins with disordered

structure. (B) Intrinsic fluorescence spectrum of ApulSL showing a main peak at 332 nm, indicating the presence of tyrosine in the hydrophobic core.

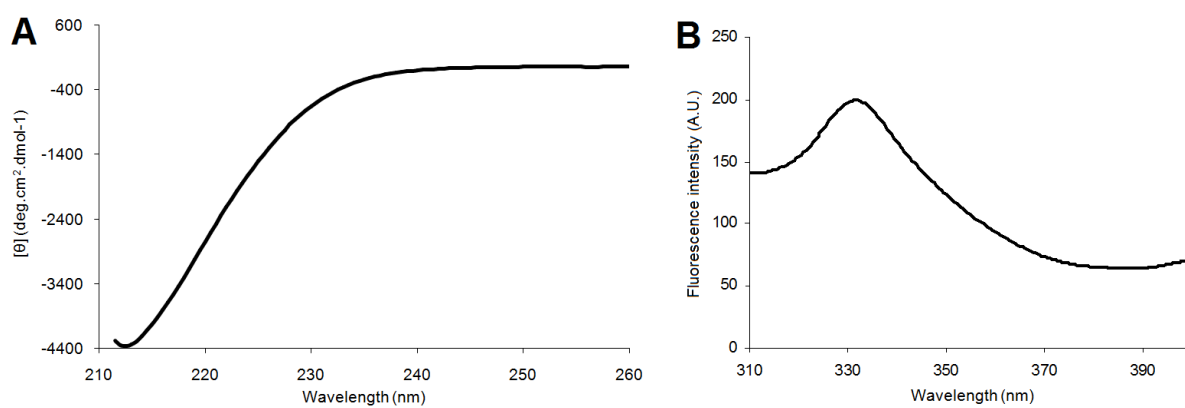


Table 1. Summary of purification of *Apuleia leiocarpa* seed lectin (ApulSL).

Sample	HA	Protein (mg/mL)	Specific HA	Purification (fold)
CE	256	3.87	66.15	1.0
ApulSL	512	0.062	8,258	124.8

CE: crude extract. HA: hemagglutinating activity

Table 2. Mass spectrometry analysis of peptides originated after digestion by trypsin of ApulSL spots (A1, A2, A3 and A4).

Average isotopic mass of peptides (Da)			
A1	A2	A3	A4
1206.532	905.820	905.810	893.360
1352.730	1107.947	951.825	951.812
1476.738	1490.364	1107.981	1107.940
1611.091	1666.573	1490.228	1494.255
1767.331	1742.283	1822.611	1822.570
1851.392	1822.643	2384.804	2384.741
1991.691	2384.789	2501.891	2502.013
2152.761	2502.138	2717.900	
2385.857	2706.487		
2719.185			

Table 3. Evaluation of the ion dependence of ApulSL hemagglutinating activity.

Assay condition	Hemagglutinating activity	
	Non-treated ApulSL	EDTA-treated ApulSL ^a
Without ion addition	512	16
With 10 mM Mg ²⁺	8.192	64
With 10 mM Ca ²⁺	256	256
With 10 mM Mn ²⁺	32.768	1.024

ApulSL concentration in all assays: 88 µg/mL.^aLectin was treated and treated with 5 mM EDTA.

Table 4. Antibacterial activity of the ApulSL against Gram-positive and Gram-negative species.

Species	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)	MBC/MIC
<i>Bacillus cereus</i> (+)	45.12	>180.5	ND
<i>Bacillus subtilis</i> (+)	45.12	>180.5	ND
<i>Enterococcus faecalis</i> (+)	90.25	>180.5	ND
<i>Escherichia coli</i> ()	180.5	>180.5	ND
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ()	45.12	>180.5	ND
<i>Micrococcus luteus</i> (+)	90.25	>180.5	ND
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ()	180.5	>180.5	ND
<i>Salmonella enteritidis</i> ()	180.5	>180.5	ND
<i>Staphylococcus aureus</i> (+)	180.5	>180.5	ND
<i>Streptococcus pyogenes</i> (+)	180.5	>180.5	ND
<i>Xanthomonas campestris</i> spv. <i>campestris</i> ()	11.2	22.5	2
<i>Xanthomonas campestris</i> spv. <i>malvacearum</i> ()	22.5	22.5	1
<i>Xanthomonas campestris</i> spv. <i>viticola</i> ()	22.5	22.5	1

ND: not determined. (+): Gram-positive. (): Gram-negative.

ANEXO Añ Guia para autores

International Journal of Biological Macromolecules

Author Guideness
(Effective on March 2014)



Introduction

International Journal of Biological Macromolecules is an established international journal of research into chemical and biological aspects of all natural macromolecules. It presents the latest findings of studies on the molecular structure of proteins, macromolecular carbohydrates, lignins, biological poly-acids, and nucleic acids. The scope further includes biological activities and interactions, molecular associations, chemical and biological modifications, and functional properties as well as development of related model systems, structural including conformational studies, new analytical techniques, and relevant theoretical developments. All papers are required to focus primarily on at least one named **biological macromolecule**. This naming should appear in the title, the abstract and the text of the paper

Introductory information

Please follow the Guide For Authors instructions carefully to ensure that the review and publication of your paper is as swift and efficient as possible. These notes may be copied freely.

All contributions are read by two or more referees to ensure both accuracy and relevance, and revisions to the script may thus be required. On acceptance, contributions are subject to editorial amendment to suit house style.

When a manuscript is returned for revision prior to final acceptance, the revised version must be submitted as soon as possible after the author's receipt of the referee's reports. Revised manuscripts returned after four months will be considered as new submissions subject to full re-review.

Types of paper

Contributions falling into the following categories will be considered for publication:

• Original high-quality research papers (preferably no more than 20 double-line-spaced manuscript pages, including tables and illustrations)

• Short communications, for rapid publication (no more than 10 double-line-spaced manuscript pages including tables and figures)

International Journal of Biological Macromolecules also publishes book reviews, conference reports and a calendar of forthcoming events.

Contact details for submission

Articles should be submitted to <http://ees.elsevier.com/ijbiomac/>. For queries, please refer to our support page at <http://epsupport.elsevier.com>.



Before You Begin

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Human and animal rights

If the work involves the use of animal or human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>; EU Directive 2010/63/EU for animal experiments http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm; Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals <http://www.icmje.org>. Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/p/7923.

Submission declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

Results submitted for publication should refer to their previous findings in the same way as they would refer to results from a different group. This applies not only to figures or tables, or parts of them, but has to be understood in a wider sense.

Contributors

Each author is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that all authors have approved the final article should be true and included in the disclosure.

Each author should have participated sufficiently in the work to justify authorship. This participation must include: (a) critically important intellectual contribution to the conception, design, and/or analysis and interpretation; (b) drafting the manuscript or critically reading it; and (c) thorough reading and final approval of the version to be published. Participation solely in the collection of data or provision of funds, space or equipment does not justify authorship. All authors take public responsibility for the paper as a whole, i.e., conception and design, data, analysis, and interpretation. The acknowledgement section should list (a) other contributors for whom authorship is not justified, e.g. technical help; (b) financial and material support.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

This journal offers authors a choice in publishing their research: Open Access and Subscription.

For Subscription articles

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <http://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

For Open Access articles

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights. For more information on author rights for: Subscription articles please see <http://www.elsevier.com/journal-authors/author-rights-and-responsibilities>. Open access articles please see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open Access

ÜArticles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse

ÜAn Open Access publication fee is payable by authors or their research funder

Subscription

ÜArticles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our access programs (<http://www.elsevier.com/access>)

ÜNo Open Access publication fee

All articles published Open Access will be immediately and permanently free for everyone to read and download. Permitted reuse is defined by your choice of one of the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution (CC BY): lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike (CC BY-NC-SA): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts and other revised versions, adaptations or

derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text and data mine the article, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation, and license their new adaptations or creations under identical terms (CC BY-NC-SA).

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

To provide Open Access, this journal has a publication fee which needs to be met by the authors or their research funders for each article published Open Access.

Your publication choice will have no effect on the peer review process or acceptance of submitted articles.

The publication fee for Open Access for this journal is **\$3,000**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information.

Informed consent and patient details

Studies on patients or volunteers require ethics committee approval and informed consent, which should be documented in the paper. Appropriate consents, permissions and releases must be obtained where an author wishes to include case details or other personal information or images of patients and any other individuals in an Elsevier publication. Written consents must be retained by the author and copies of the consents or evidence that such consents have been obtained must be provided to Elsevier on request. For more information, please review the *Elsevier Policy on the Use of Images or Personal Information of Patients or other Individuals*, <http://www.elsevier.com/patient-consent-policy>. Unless you have written permission from the patient (or, where applicable, the next of kin), the personal details of any patient included in any part of the article and in any supplementary materials (including all illustrations and videos) must be removed before submission.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

Referees

Authors are requested to submit a minimum of six suitable potential reviewers (please provide their name, email addresses, and institutional affiliation). When compiling this list of potential reviewers please consider the following important criteria: they must be knowledgeable about the manuscript subject area; must not be from your own institution; at least two of the suggested reviewers must be from another country than the authors'; and they should not have recent (less than four years) joint publications with any of the authors. However, the final choice of reviewers is at the editors' discretion.



Preparation

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and

replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article Structure

You should arrange your contribution in the following order:

1. The paper title should be short, specific and informative. All author's names and affiliations should be clearly indicated. Please also indicate which author will deal with correspondence and supply full postal address, telephone and fax numbers, and e-mail address.
2. Self contained abstract of approximately 200 words, outlining in a single paragraph the aims, scope and conclusions of the paper.
3. Three keywords, for indexing purposes;
4. *The text* suitably divided under headings.
5. *Acknowledgments* (if any).
6. *References* (double spaced, and following the journal style).
7. *Appendices* (if any).
8. *Tables* (each on a separate sheet).
9. *Captions* to illustrations (grouped on a separate sheet or sheets).
10. *Illustrations*, each on a separate sheet containing no text, and clearly labelled with the journal title, author's name and illustration number.

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Essential title page information

Ü**Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

Ü**Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

Ü**Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**

Ü**Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving their readers one-click access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Figures (to be uploaded as separate file(s), see below) and tables should be numbered in Arabic numerals. In the text they should be referred to as Fig. 1, Table 2, e.g. 3 etc. (not as fig. 1, figure 1; tab. 2, table 2). A calibration bar should be given on all micrographs.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the printed version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then

Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

Example: '..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result'

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, J. Sci. Commun. 163 (2010) 51–59.

Reference to a book:

[2] W. Strunk Jr., E.B. White, The Elements of Style, fourth ed., Longman, New York, 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), Introduction to the Electronic Age, E-Publishing Inc., New York, 2009, pp. 281–304.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with

a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

ÜE-mail address

ÜFull postal address

ÜPhone numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

ÜKeywords

ÜAll figure captions

ÜAll tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

ÜManuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'

ÜReferences are in the correct format for this journal

ÜAll references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa

ÜPermission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)

ÜColor figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print

ÜIf only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.



After Acceptance

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic

publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*):

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately - please upload all of your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail or, alternatively, 25 free paper offprints. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use. For an extra charge, more paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints/myarticleservices/booklets>).



Author Inquiries

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please visit this journal's homepage. For detailed instructions on the preparation of electronic artwork, please visit <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You can also check our Author FAQs at <http://www.elsevier.com/authorFAQ> and/or contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.