

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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

CINÉTICA DE COAGULAÇÃO DA LECTINA DE SEMENTES DE
***Moringa oleifera* (WSMoL) EM PRESENÇA DE CARBOIDRATOS E**
ÍONS

KÉZIA SANTANA DE MOURA

RECIFE
2013

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

KÉZIA SANTANA DE MOURA

**CINÉTICA DE COAGULAÇÃO DA LECTINA DE SEMENTES DE
Moringa oleifera (WSMoL) EM PRESENÇA DE CARBOIDRATOS E
ÍONS.**

ORIENTADORA: Prof^ª. Dra. PATRÍCIA MARIA GUEDES PAIVA

CO-ORIENTADORA: Prof^ª. Dra. MARIA DANIELLY LIMA DE OLIVEIRA

RECIFE

2013

Catálogo na Fonte:

Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

M929c Moura, Kézia Santana de

Cinética de coagulação da lectina de sementes de *Moringa oleífera* (WSMoL) em presença de carboidratos de carboidratos e íons / Kézia Santana de Moura. – Recife: O Autor, 2013.

65 f. : il.

Orientadora: Patrícia Maria Guedes Paiva

Coorientadora: Maria Danielly Lima de Oliveira

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia, 2013.

Inclui bibliografia

1. Lectinas 2. Hemaglutinina 3. *Moringa oleífera* I. Paiva, Patrícia Maria Guedes (orientadora) II. Oliveira, Maria Danielly de (coorientadora) III. Título.

572.6

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2013-166

KÉZIA SANTANA DE MOURA

**CINÉTICA DE COAGULAÇÃO DA LECTINA DE SEMENTES DE
Moringa oleifera (WSMoL) EM PRESENÇA DE CARBOIDRATOS E
ÍONS**

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

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva (orientadora)
(Departamento de Bioquímica - UFPE)

Prof^a. Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho (1º Titular Interno)
(Departamento de Bioquímica - UFPE)

Profa. Dra. Maria da Paz Carvalho da Silva (2º Titular Interno)
(Departamento de Bioquímica - UFPE)

Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão (Titular Externo)
(Departamento de Bioquímica - UFPE)

RECIFE

2013

*Dedico este trabalho
à minha irmã Michele, por todo o exemplo de superação, que há um ano, tem
me ensinado tanto a valorizar a vida e
às minhas amigas Thâmarah e Ana Patrícia pela amizade maravilhosa que torna
meus dias sempre tão divertidamente produtivos.*

AGRADECIMENTOS

A Deus pela sua infinita misericórdia, perfeição e amor. Por me permitir essa existência de estudo e trabalho para a edificação de um futuro de conhecimento e luz. Após todos esses anos de aprendizado, vejo o quanto minha fé cresceu graças à dádiva de observar sua elevada sabedoria em cada detalhe da vida.

Aos meus pais, Auri e Bel, e à minha irmã Michele por terem sido os maiores exemplos de honestidade e dedicação que já conheci na vida. Toda e qualquer conquista que eu realizo devo a esses seres humanos que me proporcionaram uma educação sadia, amor e confiança. Muito obrigada!

À minha orientadora, Prof^a Patrícia, pela confiança e ânimo com a qual nos recebe, nos estimulando a ir mais longe na pesquisa, na vida e nos sonhos a realizar. Muito obrigada por mais essa oportunidade, por estar ao meu lado em mais essa conquista e pelo sentimento materno com o qual nos orienta, sempre interessada em como estamos e não somente nos resultados dos experimentos. Obrigada por todas vezes em que me olhou nos olhos fazendo cada um dos seus conselhos ficarem guardados no meu coração, de um modo que só uma mãe pode fazer.

À minha co-orientadora, Maria Danielly, por ser um exemplo de mulher e de profissional, pela sua dedicação à pesquisa científica, pela seriedade com que trata nosso trabalho e por seu jeito amigo de conversar. Em nossas conversas há sempre um misto de orientação científica e troca de experiências que tornaram esse projeto cada vez mais prazeroso de ser executado e discutido. Muito obrigada pela confiança depositada em mim para execução desse trabalho. Ao fim deste mestrado obtive dados, números, tabelas e descrições, mas, sem dúvida alguma, a melhor e mais marcante foi a de um ser humano como você.

Aos companheiros, amigos de pesquisa e segunda família: Nataly, Lidiane, Luciana, Bernardo, Mychely, Afonso, Tati, Giselly, Francis, Fernanda, Raiana, Cláudio, Emmanuel, Maiara, Bárbara, Thamara, Polly Silva, Poliana Amorim, Evellyne, Livia, Belany, Aline, Mary Aranda, Felipe. Pessoas especiais que alegam meus dias, ouvem meus disparates, auxiliam-me sempre e são, sem dúvida alguma, um dos melhores motivos de pertencer a esse laboratório. Onde muitos conseguem ver apenas um ambiente de trabalhos, artigos e publicações, nós vemos também um ambiente de alegria e de muitos sorrisos todos os dias.

Ao Hugo Rafael, essa criatura tão especial, por seu apoio e sua presença. Hugo foi decisivo na execução desse projeto por todo auxílio e suporte que me deu. Aprendi muito mais do que ensinei e sei que alguém tão inteligente e dedicado assim terá um futuro maravilhoso pela frente. Obrigada, menino Hugo!

Ao grande amigo, e agora Professor Doutor, Thiago, o porto seguro deste laboratório. Thiago representa para todos nós conhecimento, segurança, humildade, alegria e ânimo. Suas atitudes e decisões nos impressionam pela sabedoria que carregam. A astronomia prevê que o Sol chegará ao último grau de sua evolução estelar e morrerá daqui há 7,59 bilhões de anos. O Espírito, porém, é eterno e por isso, saber que um espírito tão iluminado assim jamais morrerá é realmente divino. Que Deus te abençoe, Thiago, e obrigada por irradiar tanta luz a tantas vidas.

Às minhas amigas e irmãs Thâmarah, Ana Patrícia e Mariana por serem tão especiais, confidentes e divertidas. Essas coitadas já tiveram que ouvir cada coisa! Obrigada pelas histórias, piadas, mugangas, conselhos e pelos ouvidos. São essas pessoas que trazem ao meu dia a dia tanta alegria e companheirismo. Sem elas eu não seria tão feliz e nem seria como sou, porque guardo em mim um pedaço de cada uma de vocês. Obrigada minhas amigas! Há todo um futuro descortinando-se à nossa frente e nós seguiremos nossos caminhos. Na apresentação desta dissertação, Thâmarah e Ana Patrícia já estarão longe, mas todo o amor que vocês me deram durante todo esse tempo estará comigo onde quer que eu esteja. Que Deus nos abençoe na construção da nossa felicidade.

Aos amigos maravilhosos da minha turma de graduação. Nossa amizade continua firme e forte. Não poderia fazer parte de uma turma melhor! Muito obrigada pelas conversas, pelas risadas e por essa amizade camarada que irá durar pra sempre!

A todos os colegas e funcionários que fazem parte do Departamento de Bioquímica, pelo apoio e convivência sadia.

Aos grandes amigos Danielle Souza, André Nascimento, Louzi Ribeiro, Gabriel Nascimento, Mauricéia Nascimento, Danielle Silva, Luciana Cavalcanti e Ana Lúcia. Com vocês, mesmo nos momentos mais difíceis, eu sei que meu dia terminará bem graças ao amor e à amizade que nós temos. Obrigada por tudo que vocês fazem por mim.

Ao meu namorado Leonardo, pois nas vezes em que quis chorar ou desistir, estes braços me ajudaram a sustentar minhas inseguranças e seguir em frente. Obrigada pelo seu amor, por ser meu melhor amigo, colega de trabalho e ajudante exemplar nos feriados em que eu vinha para o laboratório! Obrigada, Léo, por ser meu pedacinho de céu, até mesmo quando me aperreia. Você é um presente. Desejo-te muita luz e sucesso no seu caminho.

Ao suporte financeiro do CNPq e FACEPE.

***“Falta de tempo é desculpa de quem não tem tempo
por falta de métodos.”
(Albert Einstein)***

RESUMO

Lectinas são proteínas ligadoras de carboidratos e com atividade hemaglutinante (AH). Sementes de *Moringa oleifera* são utilizadas no tratamento de água e contêm uma lectina solúvel em água (WSMoL) com atividade coagulante. O objetivo deste trabalho foi avaliar a cinética de coagulação promovida por WSMoL através de medidas de absorbância (densidade óptica) e variação de resistência elétrica na interface eletrodo-solução, na ausência e presença de carboidratos e íons. Extrato aquoso (10%, p/v) de sementes foi fracionado com sulfato de amônio (60% de saturação) e o precipitado foi aplicado em coluna de quitina equilibrada com NaCl 0,15 M. WSMoL foi eluída com ácido acético 1,0 M e caracterizada quanto à massa molecular nativa, perfil em SDS-PAGE e ponto isoelétrico (PI). A atividade coagulante foi determinada empregando-se modelo de água turva com caolin a 1% em água de torneira. A AH e atividade coagulante de WSMoL foram também avaliadas na presença de N-acetilglicosamina, glicose e frutose em diferentes concentrações (25, 50, 100, 200 mM) e soluções de sais de cálcio e magnésio (20 mM). WSMoL nativa apresentou massa molecular 59,4 kDa. Em SDS-PAGE, foram observados três peptídeos com aproximadamente 30, 20 e 10 kDa. O PI determinado para WSMoL nativa foi de 5,5. A AH de WSMoL foi inibida por todos os carboidratos nas concentrações testadas (exceto frutose a 25 mM) e estimulada pelos íons cálcio e magnésio. A atividade coagulante de WSMoL foi demonstrada por redução da absorbância da solução de caolin e redução da resistência elétrica do meio aquoso em presença da lectina. A incubação da lectina com carboidratos nas concentrações que inibiram a AH ou com íons cálcio e magnésio promoveu a redução da atividade coagulante de WSMoL, demonstrada pela baixa eficiência na redução da absorbância e resistência elétrica do meio aquoso. A incubação com carboidratos na concentração de 200 mM aboliu a atividade coagulante da lectina. Em conclusão: 1) WSMoL nativa é uma proteína aniônica oligomérica; 2) a redução de absorbância e resistência elétrica promovida por WSMoL provavelmente envolve desestabilização de partículas em suspensão, seguida da formação de complexos entre WSMoL e as partículas; 3) a presença no meio aquoso de carboidratos inibidores da AH de WSMoL resulta em diminuição da atividade coagulante; e 4) cátions Ca^{2+} e Mg^{2+} estimularam a AH mas prejudicaram a atividade coagulante de WSMoL.

Palavras-chaves: Atividade coagulante; caolin; lectina; *Moringa oleifera*; resistência elétrica.

ABSTRACT

Lectins are carbohydrate-binding proteins with hemagglutination activity (HA). *Moringa oleifera* seeds are used in water treatment and contain a water-soluble lectin (WSMoL) with coagulant activity. The aim of this study was to evaluate the kinetics of coagulation promoted by WSMoL through absorbance measurements and changes in electrical resistance at the electrode-solution interface, in absence and presence of carbohydrates and ions. Aqueous extract (10%, w/v) from seeds was fractionated with ammonium sulphate (60% saturation) and the precipitate was loaded onto a chitin column equilibrated with 0.15 M NaCl. WSMoL was eluted with acetic acid 1.0 M and characterized for native molecular mass, SDS-PAGE profile and isoelectric point (PI). The coagulant activity was determined using a model of turbid water with 1% kaolin in tap water. The HA and coagulant activity of WSMoL was also evaluated at presence of *N*-acetylglucosamine, glucose and fructose (25, 50, 100 and 200 mM) and salt solutions of calcium and magnesium (20 mM). Native WSMoL showed molecular mass 59.4 kDa. In SDS-PAGE, it was observed three peptides with approximately 30, 20 and 10 kDa. The determined PI for native WSMoL was 5.5. The HA of WSMoL was inhibited by all carbohydrates at the tested concentrations (except 25 mM fructose) and stimulated by calcium and magnesium ions. The WSMoL coagulant activity was demonstrated by reduction in absorbance of the kaolin solution and reduction of electrical resistance of the aqueous medium in the presence of lectin. The incubation of lectin with carbohydrate at concentrations that inhibit the HA or with calcium and magnesium caused a reduction of coagulant activity, as demonstrated by low efficiency in reducing absorbance and electrical resistance of the aqueous medium. Incubation with carbohydrates at 200 mM concentration abolished the coagulant activity of the lectin. In conclusion: 1) native WSMoL is an anionic oligomeric protein; 2) the reduction in absorbance and electrical resistance promoted by WSMoL probably involves destabilization of suspended particles, followed by formation of complexes between WSMoL and particles; 3) the presence in aqueous medium of carbohydrates that inhibit HA of WSMoL results in decrease of coagulant activity; and 4) Ca^{2+} and Mg^{2+} cations stimulated the HA but damaged WSMoL coagulant activity.

Keywords: Coagulant activity; electrical resistance; kaolin; lectin; *Moringa oleifera*.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Representação esquemática da Dupla Camada Elétrica (Castelan, 1998).	21
Figura 2. A espécie <i>Moringa. oleifera</i> . Aspecto geral (A), Flores (B), Folhas (C), Sementes (D).	28
ARTIGO	
Figure 1. Characterization of WSMoL. (A) Gel filtration chromatography of WSMoL on a Hiprep 16/60 Sephacryl S-300 column coupled to Äkta Prime system. Sample (0.4 mg) was injected and eluted (2.0 mL fraction) with 0.15 M NaCl. (B) SDS-PAGE of WSMoL stained with Coomassie Brilliant Blue.	52
Figure 2. Coagulant activity of SE, WSMoL and alum (positive control) on kaolin suspension model. The absorbance (optical density) at 500 nm (A) and electrical resistance (B) were evaluated. Negative control corresponded to the suspension of kaolin. The values are represented as the mean of three experiments $\pm$ standard deviation.	53
Figure 3. Coagulant activity of WSMoL in presence of <i>N</i> -acetylglucosamine at different concentrations using kaolin suspension model. The absorbance (optical density) at 500 nm (A) and electrical resistance (B) were evaluated. Negative control corresponded to the suspension of kaolin. The values are represented as the mean of three experiments $\pm$ standard deviation.	56
Figure 4. Coagulant activity of WSMoL in presence of glucose at different concentrations using kaolin suspension model. The absorbance (optical density) at 500 nm (A) and electrical resistance (B) were evaluated. Negative	56

control corresponded to the suspension of kaolin. The values are represented as the mean of three experiments $\pm$ standard deviation.

Figure 5. Coagulant activity of WSMoL in presence of fructose at different concentrations using kaolin suspension model. The absorbance (optical density) at 500 nm (A) and electrical resistance (B) were evaluated. Negative control corresponded to the suspension of kaolin. The values are represented as the mean of three experiments $\pm$ standard deviation 57

Figure 6. Coagulant activity of WSMoL as well as monossacarides *N*-acetylglucosamine (A), glucose (B) and fructose (C) at 200 mM in presence and absence of lectin. The absorbance (optical density) at 500 nm was evaluated. Negative control corresponded to the suspension of kaolin. The values are represented as the mean of three experiments $\pm$ standard deviation. 58

Figure 7. Coagulant activity of WSMoL in presence of calcium or magnesium chlorides at 20 mM using kaolin suspension model. The absorbance (optical density) at 500 nm (A) and electrical resistance (B) were evaluated. Negative control corresponded to the suspension of kaolin. The values are represented as the mean of three experiments $\pm$ standard deviation. 59

Figure 8. Coagulant activity of WSMoL as well as of calcium (A) and magnesium (B) chlorides at 20 mM in presence and absence of lectin. The absorbance (optical density) at 500 nm was evaluated. Negative control corresponded to the suspension of kaolin. The values are represented as the mean of three experiments $\pm$ standard deviation. 60

LISTA DE TABELAS

ARTIGO

	Página
Table 1. WSMoL specific haemagglutinating activity in the presence of N-acetylglucosamine, glucose and fructose in concentrations of 25, 50, 100 and 200 mM.	55

LISTA DE ABREVIATURAS

AH – Atividade hemaglutinante

AHE- Atividade hemaglutinante específica

cMoL – Lectina coagulante de *Moringa oleifera* (do inglês *coagulant M. oleifera lectin*)

WSMoL – Lectina solúvel em água de *M. oleifera* (do inglês *water-soluble M. oleifera lectin*)

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS	5
RESUMO	8
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	12
LISTA DE ABREVIATURAS	13
1. INTRODUÇÃO	15
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
2.1. Tratamento de Água	18
2.2 Coagulação	18
2.3 Ação de Coagulantes sobre a Dupla Camada Elétrica	20
2.4 Lectinas	23
2.5 A espécie <i>Moringa oleifera</i>	27
2.5.1 Lectinas de <i>M. oleifera</i>	30
3. OBJETIVOS	31
3.1. Objetivo Geral	31
3.2. Objetivos Específicos	31
4. REFERÊNCIAS	32
5. ARTIGO	43
Coagulant activity of water soluble <i>Moringa oleifera</i> lectin in presence of carbohydrates and ions	
6. CONCLUSÕES	65

1. INTRODUÇÃO

A qualidade da água é definida por sua composição química, física e bacteriológica e suas características desejáveis dependem dos fins para qual será utilizada. Para o consumo humano há necessidade de uma água pura e saudável, ou seja, livre de matéria suspensa visível, cor, gosto e odor de quaisquer organismos capazes de provocar enfermidades e de quaisquer substâncias orgânicas ou inorgânicas que possam produzir efeitos fisiológicos prejudiciais. (RICHTER, 1991). Graças ao ciclo hidrológico, a água é um recurso renovável. Quando reciclada por meio de sistemas naturais, é um recurso limpo e seguro. Entretanto, uma vez poluída, a água pode ser recuperada e reusada para fins benéficos diversos (BRAGA *et al.*, 2004). Assim, para se adequar ao consumo, a água necessita de tratamento e, para tanto, os métodos vão desde a simples fervura até sistemas completos que contemplem a coagulação, floculação, sedimentação, filtração e cloração (RAMOS, 2005).

A coagulação, em geral, é um processo em que o potencial repulsivo da dupla camada elétrica de colóides é reduzido de tal forma que micro-partículas podem ser produzidas. Estas partículas colidem entre si e formam estruturas maiores (BUDD *et al.*, 2004). Historicamente, tem sido utilizada a coagulação no tratamento de água para diminuir a turbidez, cor e eliminar agentes patogênicos (YU *et al.*, 2007). Coagulação química é conseguida por adição de coagulantes inorgânicos, tais como sais de alumínio e de ferro para proporcionar a remoção de contaminantes de massa a partir da fonte de água contendo matéria orgânica natural (DUAN *et al.*, 2006). No entanto, existe atualmente uma necessidade de um melhor tratamento das águas uma vez que os padrões de qualidade da água tornam-se cada vez mais difíceis de serem obtidos (JARVIS *et al.* 2006). Coagulantes alternativos conhecidos por polieletrólitos oferecem uma solução simples e de baixo custo (RIZZO *et al.*, 2008).

Um polímero é denominado como um polieletrólito quando a sua unidade monomérica contém grupos ionizáveis (por exemplo, carboxila, amino ou sulfônicos), portanto, pela carga

da cadeia polimérica (GAO *et al.* 2008). Conseqüentemente os polieletrólitos podem ser catiônicos, aniônicos ou anfotéricos, enquanto que os polímeros sem grupos ionizáveis são denominados não-iônicos (BOLTO *et al.* , 2007). No Brasil, em função das características das águas e sólidos suspensos são utilizados os aniônicos e não-iônicos (CARVALHO, 2008). Embora na água seja susceptível a presença de partículas negativamente carregadas, polieletrólitos catiônicos orgânicos são considerados muito tóxicos para organismos aquáticos, limitando, assim, a sua utilização em purificação de água (RIZZO *et al.*, 2008).

Os coagulantes e floculantes naturais têm demonstrado vantagens em relação aos coagulantes químicos, especificamente em relação à biodegradabilidade, baixa toxicidade e baixo índice de produção de lodos residuais (CARVALHO, 2008). Os polímeros sintéticos podem apresentar risco à saúde dos consumidores, pois não são biodegradáveis, podendo gerar subprodutos (monômeros) tóxicos (JARVIS *et al.*, 2006). Assim, os mesmos vêm sendo substituídos por polieletrólitos naturais, que apresentam menor custo, e não representam risco de danos à saúde humana quando utilizados em longo prazo, visto que muitos destes produtos naturais fazem parte da alimentação humana ou animal (BOLTO *et al.* , 2007).

A espécie *Moringa oleifera* (família Moringaceae), de origem indiana, é uma planta cultivada em território brasileiro por ser bastante viável, perene, resistente à seca, pouco exigente quanto ao solo, adubação e tolerante a pragas e doenças (MAKKAR & BECKER, 1997). Atualmente, o cultivo da moringa vem sendo difundido no Semi-Árido nordestino, devido à utilização das sementes no tratamento de água para uso doméstico. As sementes de *M. oleifera* contêm lectinas; cMoL (do inglês *coagulant M. oleifera lectin*) tem a propriedade de reduzir a turbidez da água (SANTOS *et al.*, 2009) e WSMoL (do inglês *water-soluble M. oleifera lectin*) promove efeitos deletérios na sobrevivência de larvas de *A. aegypti* no quarto estágio (COELHO *et al.*, 2009) e também apresenta a propriedade de reduzir a turbidez da

água (FERREIRA *et al.*, 2011). A atividade coagulante da lectina WSMoL estimulou a avaliação do seu efeito sobre a resistência elétrica do meio aquoso durante o processo de coagulação, bem como, o estudo sobre o efeito que carboidratos inibidores da atividade hemaglutinante (AH) de WSMoL e íons bivalentes promoveriam sobre a atividade coagulante da lectina. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de carboidratos e íons (cálcio e magnésio) na cinética de coagulação de WSMoL através de um comparativo entre medidas de absorbância e variação de resistência entre a interface eletrodo-solução.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Tratamento de Água

A disponibilidade de água doce é um dos grandes problemas que se enfrentam hoje no mundo e, em alguns aspectos, é o principal porque as dificuldades causadas afetam a vida de milhões de pessoas (OMM, 1997). Nos próximos 50 anos, os problemas relacionados com a falta de água ou a contaminação de mananciais afetarão praticamente todos os habitantes do planeta e as regiões do mundo que sofrem escassez de água estão crescendo em área e em quantidade (HESPANHOL, 2008).

A qualidade da água é definida por sua composição química, física e bacteriológica e suas características desejáveis dependem de sua utilização (BRAGA *et al.*, 2004). Para o consumo humano há necessidade de uma água pura e saudável, ou seja, livre de matéria suspensa visível, cor, gosto e odor de quaisquer organismos capazes de provocar enfermidades e de quaisquer substâncias orgânicas ou inorgânicas que possam produzir efeitos fisiológicos prejudiciais. (RICHTER, 1991). Assim, para se adequar ao consumo, a água necessita de tratamento e, para tanto, os métodos vão desde a simples fervura até sistemas completos que contemplem a coagulação, floculação, sedimentação, filtração e cloração (RAMOS, 2005).

2.2 Coagulação

A coagulação é um processo de desestabilização de partículas coloidais promovendo colisões entre essas partículas (METCALF & EDDY, 2003). As partículas coloidais não sedimentam e não podem ser removidas por processos de tratamento físicos convencionais (DUAN *et al.*, 2006). Este processo, objetiva transformar uma suspensão estável, que resiste à agregação, em um sistema instável aumentando a taxa ou a cinética de agregação de partículas e formação de flocos (AMIRTHARAJAH e O'MELIA, 1990). O papel do coagulante é

desestabilizar a suspensão coloidal reduzindo a barreira de energia e permitindo que as partículas se agreguem. Os colóides são apresentados por partículas que tem uma faixa de tamanho de 1 nm a 0,1 nm, e conferem cor e turbidez (DI BERNARDO, 2005).

Os coagulantes podem ser classificados como coagulantes metálicos ou polieletrólitos também conhecidos como auxiliares de coagulação (LEME, 1990). A diferença entre os coagulantes metálicos e os polieletrólitos está na sua reação hidrolítica na água. Nos polieletrólitos, as cadeias polimerizadas já estão formadas quando eles são adicionados no meio líquido. Nos coagulantes metálicos, a polimerização se inicia no contato com o meio líquido, vindo a seguir a etapa de adsorção dos colóides existentes no meio (PHILIPPI, 2001).

A coagulação metálica é conseguida por adição de coagulantes inorgânicos metálicos (NDABIGENGESERE & NARASIAH, 1998). Os sais de alumínio e ferro são os dois coagulantes mais amplamente utilizados para o tratamento de água para consumo humano (OKUDA *et al.*, 2001). Devido à boa eficiência e ao baixo custo, o sulfato de alumínio destaca-se como o coagulante químico mais utilizado no Brasil (BRAGA *et al.*, 2004). O alumínio, porém, não é biodegradável e gera um elevado volume de lodo além de formar subprodutos (monômeros) tóxicos (NDABIGENGESERE & NARASIAH, 1998; OKUDA *et al.*, 2001). Elevadas concentrações desse composto podem ocasionar problemas à saúde humana, inclusive o aceleração do processo degenerativo do Mal de Alzheimer (CLAYTON, 1989).

Desta forma, estudos visando a descoberta e desenvolvimento de coagulantes alternativos sintéticos ou naturais, conhecidos por polieletrólitos, estão sendo realizados a fim de substituir os coagulantes metálicos, por apresentarem menor custo e não representarem risco à saúde humana quando utilizados a longo prazo, visto que muitos destes produtos naturais fazem parte da alimentação humana ou animal. (AKHTAR *et al.*, 2007).

Um polímero é denominado como um polieletrólito, quando a sua unidade monomérica contém grupos ionizáveis (GAO *et al.* 2008). Conseqüentemente os polieletrólitos podem catiônicos, aniônicos ou anfotéricos, enquanto que os polímeros sem grupos ionizáveis são denominados não-iônico (BOLTO *et al.* , 2007). Santos *et al.* 2011 demonstraram que o extrato de sementes de *M. oleifera* pode remover conteúdo aromático, cor, matéria orgânica e ácidos húmicos da água. Muiybi & Evison (1995) descreveram a propriedade coagulante da suspensão obtida com as sementes de *M. oleifera* como sendo similar a um polieletrólito catiônico, composto basicamente por polipeptídeos. Santos *et al.* (2011) sugerem que mecanismo da ação coagulante das sementes de *M. oleifera* consiste em adsorção à superfície das partículas coloidais seguida pela neutralização de cargas, enquanto Mendes (1989) aponta o "entrelaçamento" das partículas pelos polímeros, em um mecanismo de coagulação conhecido como varredura.

Adicionalmente, a utilização do extrato de *M. oleifera* para o tratamento de água não afeta significativamente o pH e o lodo produzido apresenta ausência de toxicidade como também um volume 4,5 vezes menor do que o volume do lodo "químico" gerado com a coagulação com sulfato de alumínio (NDABIGENGESERE *et al.*, 1995).

2.3 Ação de coagulantes sobre a dupla camada elétrica

A coagulação, em geral, é um processo em que o potencial repulsivo da dupla camada elétrica de colóides é reduzido de tal forma que micropartículas podem ser produzidas. Estas partículas colidem entre si e formam estruturas maiores (BUDD *et al.*, 2004.)

A dupla camada elétrica é formada por duas superfícies de cargas elétricas opostas mantidas por forças eletrostáticas (NAPPER, 1983). A concentração das cargas contrárias diminui exponencialmente entre as fronteiras da camada compacta e da camada difusa até igualar a concentração de cargas da solução, intervalo esse em que o potencial elétrico

formado é conhecido como Potencial Zeta (AMIRTHARAJAH e O'MELIA, 1990). A dupla camada elétrica (Figura 1) exerce uma significativa importância, pois é responsável pela estabilidade do sistema coloidal (RICHTER e AZEVEDO NETTO, 1991).

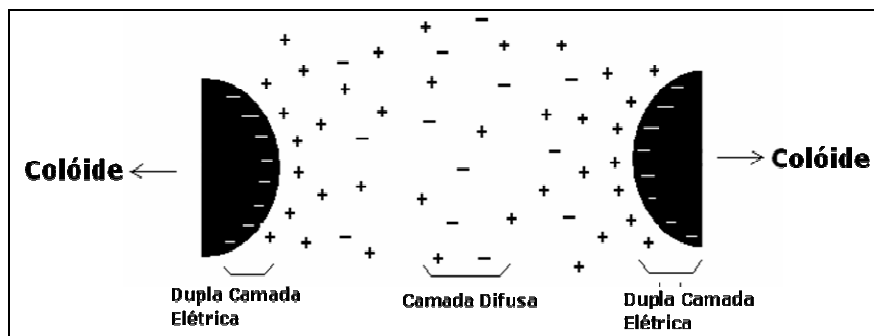


Figura 1. Representação esquemática da Dupla Camada Elétrica (Castelan, 1998).

A estabilidade de uma suspensão com respeito à coagulação é determinada pelas forças de atração e repulsão entre as partículas, ou seja, quando as forças repulsivas são suficientemente grandes para superar as forças de atração, dependendo de suas características físico-químicas e da interface partícula-solvente (SHAW, 1992). A força de atração está sempre presente, devido à tendência das partículas de estarem em contato umas com as outras através da força de Van der Waals, que é função basicamente das propriedades dielétricas das partículas e do solvente (HOTZA, 1997). A interação repulsiva é fundamentalmente produzida por dois mecanismos diferentes que são a estabilização eletrostática, resultado da formação de uma dupla camada elétrica em torno de cada partícula de pó disperso em um líquido polar, como a água (MIKESKA, & CANNON, 1984) e a estabilização estérica, na qual polímeros de cadeias longas adicionados ao meio são adsorvidos sobre a superfície da partícula e as camadas adsorvidas se interpenetram de modo a ordenar paralelamente as cadeias poliméricas e assim, as partículas permanecem isoladas (MORENO, 1992).

Segundo Azevedo Netto (1976), para o processo de coagulação-floculação é necessário redução do Potencial Zeta, fornecimento de energia para provocar agitação que acarrete maior número de choques e adição de produtos químicos que auxiliem na formação de aglomerados de partículas. O fenômeno da coagulação caracteriza-se pela alteração da força iônica do meio (MIKESKA, & CANNON, 1984). A literatura apresenta quatro principais formas de desestabilização de partículas coloidais: adsorção e neutralização, compressão da camada difusa, adsorção e formação de pontes e varredura (CUBAS, 1999, Di BERNARDO, 2005, FERREIRA, 1997, HASSEMER, 2000).

Na adsorção e neutralização de cargas, a desestabilização da dispersão coloidal consiste nas interações entre coagulante-colóide, coagulante-solvente e colóide-solvente. (DI BERNARDO, 2005). As interações coagulante-solvente são responsáveis pela adsorção do coagulante na interface colóide-água. No caso de espécies hidrolisadas de alumínio e ferro ou de polieletrólitos catiônicos é comum ocorrer a adsorção causada pela interação entre coagulante e colóide (FERREIRA, 1997).

Na Compressão da Camada Difusa, a introdução de íons no sistema coloidal causará um aumento na densidade de cargas na camada difusa que para manter-se eletricamente neutra, tem seu volume reduzido, de tal modo que em dado momento as forças de Van der Waals sejam dominantes, eliminando a estabilização eletrostática (CUBAS, 1999).

Na adsorção e formação de pontes, compostos orgânicos sintéticos e naturais caracterizados por grandes cadeias moleculares, que apresentam sítios ionizáveis ao longo da cadeia, adsorvem mais que uma partícula, mantendo-as unidas umas as outras (Di BERNARDO & DANTAS, 2005).

No processo conhecido por varredura as partículas coloidais são envolvidas pelos coagulantes e, como este mecanismo não depende da neutralização da carga dos colóides, a

condição ótima da coagulação pode não corresponder àquela em que é mínimo o potencial zeta (HASSEMER, 2000).

2.4 Lectinas

As lectinas compreendem uma classe de proteínas ou glicoproteínas que apresentam atividade hemaglutinante (AH), origem não imunológica e contêm pelo menos um domínio de ligação reversível a carboidratos, tais como monossacarídeos e oligossacarídeos (PEUMANS & VAN DAMME, 1995; VIJAYAN & CHANDRA, 1999; SHARON & LIS, 2004). Possuem a habilidade de precipitar células, polissacarídeos e glicoconjugados presentes em plantas, animais, bactérias vírus e fungos (SHARON & LIS, 1989).

A detecção de lectinas em material biológico inicia-se a partir de ensaios de aglutinação, na qual estas proteínas interagem com os carboidratos da superfície celular do eritrócito por meio dos seus sítios de ligação, formando ligações reversíveis entre células (SANTOS *et al.*, 2005). A presença de lectina na amostra, como agente aglutinante é confirmada através dos ensaios de inibição da AH com uma solução do carboidrato ligante ou glicoproteína (TRINDADE, 2006).

As lectinas apresentam ampla distribuição na natureza e centenas dessas moléculas têm sido isoladas de diferentes microorganismos (vírus, bactérias e fungos), de invertebrados e vertebrados incluindo os mamíferos (KILPATRICK, 2002; RATANAPO *et al.*, 2001; TRIGUEIROS, 2003). Em plantas, as lectinas têm sido isoladas de flores, raízes, cascas, cerne, folhas rizomas e sementes (ITO, 1986; WANG & NG, 2006; NASCIMENTO *et al.*, 2008; SÁ *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2009; YAO *et al.*, 2010; NAPOLEÃO *et al.*, 2011). São geralmente nomeadas de acordo com a planta da qual elas foram extraídas.

As lectinas diferem entre si pela composição e sequência de aminoácidos na cadeia polipeptídica, quanto ao número de subunidades na estrutura protéica, quanto à necessidade

de presença de metais para a AH, bem como especificidade do sítio de ligação a carboidratos (KENNEDY *et al.*, 1995).

A percepção de que as lectinas agem como mediadores do reconhecimento celular em um grande número de sistemas biológicos, como os de adesão de vírus, bactérias e protozoários às células hospedeiras, bem como de leucócitos às células endoteliais e a interação célula-matriz extracelular, multiplicou o interesse pelo estudo do papel biológico das lectinas. As lectinas, em geral, são consideradas protagonistas na ativação dos vários processos biológicos como, adesão célula-célula, adesão célula-tecido, migração celular, sinalização celular, dentre outros, por interagirem com os glicoconjugados presentes na superfície de diversos tipos celulares (LIS & SHARON, 1986).

Em insetos, as lectinas, atuam como determinantes da transmissão de patógenos por esses artrópodes, estando envolvidas nos mecanismos de interação inseto-parasita (PEREIRA *et al.*, 1981; INGRAM & MOLYNEUX, 1991; JACOBSON & DOYLE, 1996; GRUBHOFFER & HYPSE, 1997). O primeiro artigo a descrever a presença de lectinas em tecidos específicos de vetores foi publicado por Pereira *et al.* (1981) utilizando a espécie *Rhodnius prolixus*. Entretanto, muitos resultados de lectinas em vetores têm surgido de pesquisas com os mosquitos tsé-tsé e têm mostrado que essas proteínas, em tecidos específicos, podem atuar no papel crucial de controle da infecção de moscas tsé-tsé por tripanossomas africanos (MAUDLIN, 1991). Existem evidências indicando que a biossíntese de lectinas em insetos ocorre no corpo gorduroso, órgãos sexuais, hemócitos e em alguns casos estão associados com a membrana celular (AMIRANTE, 1976; MAUCHAMP, 1982; STILES, 1988; BRADLEY *et al.*, 1989).

Estudos demonstram que as lectinas de insetos atuam com uma variedade de funções, principalmente, no reconhecimento de células não próprias do organismo (INGRAM & MOLYNEUX, 1991), na fagocitose, encapsulamento, melanização e coagulação

(GRUBHOFFER & HYPISA, 1997). Assim, lectinas com distintas especificidades a açúcares estão envolvidas em diferentes papéis no reconhecimento e proteção do sistema imune contra protozoários e patógenos microbianos (LIS & SHARON, 1973; LIENER, 1981; BARREAU *et al.*, 1995).

Em humanos, as lectinas atuam como receptores de membrana e desempenham um papel no tráfego extracelular de glicoproteínas, adesão celular, interações celulares e imunidade inata (HSU & LIU, 2004; LEFFLER, 2004). Enquanto em microorganismos, as lectinas desempenham papéis de simbiose, responsáveis pela associação específica entre bactérias da flora intestinal e da mucosa humana (SULAGNA *et al.*, 2004).

Em plantas, sugere-se que as lectinas possuem diferentes papéis fisiológicos, incluindo transporte de carboidratos, estocagem e mobilização de proteínas de reserva e carboidratos, alongamento da parede celular, interação entre plantas e microorganismos e defesa contra o ataque de fungos, vírus e insetos (KENNEDY *et al.*, 1995; HIRSCH, 1999; ISIDRO *et al.*, 2001; CARLINI & GROSSI-DE-SÁ, 2002; PAES *et al.*, 2002; LIMPENS & BISSELING, 2003). É sugerido também a participação de lectinas nos processos de maturação e germinação das sementes (HOWARD *et al.*, 1972). As lectinas de entrecasca têm papel importante no metabolismo do nitrogênio de árvores da região temperada (VAN DAMME *et al.*, 1998) e tem sido sugerido sua participação nos mecanismos de defesa das plantas contra o ataque por microorganismos e insetos (LIENER, 1976; ROJO, 1997). A atividade inseticida contra *Nasutitermes corniger* de lectinas isoladas do cerne, da casca e de folhas de *Myracrodruon urundeuva* (aroeira do sertão) indica essas proteínas como alternativas para o controle dessa espécie de cupim, praga urbana que causa danos a móveis, pinturas e edifícios. (NAPOLEÃO *et al.*, 2011; SÁ *et al.*, 2008)

Na purificação de lectinas, estão envolvidas técnicas comuns a protocolos de isolamento de proteínas. A etapa inicial do isolamento consiste de preparação de extratos em

solução aquosa (SANTOS *et al.*, 2005), salina (NAPOLEÃO *et al.*, 2011) ou em tampões (OLIVEIRA, 2002). A purificação parcial de lectinas através de fracionamento salino, utilizando o sulfato de amônio tornou-se um dos procedimentos mais utilizados, pois as proteínas possuem muitos grupos carregados e por isso, a sua solubilidade depende da concentração dos sais dissolvidos (LEHNINGER, 2006). A solubilidade aumenta com o acréscimo de sais (*salting in*) e volta a decrescer à medida que mais sal é adicionado (*salting out*).

Após o fracionamento salino, as lectinas são submetidas a processos de diálise em membranas semipermeáveis para a eliminação de sal e em seguida submetidas a processos cromatográficos, tais como troca iônica (LAM & NG, 2009), gel filtração ou exclusão molecular (REGO *et al.*, 2002; JUNG *et al.*, 2007; POHLEVEN *et al.*, 2009) e de afinidade (TATENO *et al.*, 2003; SANTANA *et al.*, 2008).

Técnicas eletroforéticas, mono ou bidimensional, são eficientes para definir a natureza da carga líquida e o peso molecular das subunidades da lectina purificada, bem como são utilizadas para avaliar a pureza da preparação obtida (NASI *et al.*, 2009).

Como já mencionado, as lectinas possuem uma imensa variedade de atividades biológicas entre elas as atividades antimicrobiana, antitumoral, inseticida e reconhecimento de carboidratos ou glicoconjugados presentes na superfície das células. A específica interação das lectinas a glicoconjugados em solução ou na superfície celular fazem destas moléculas ferramentas valiosas em diferentes aplicações biotecnológicas (LORIS *et al.*, 1998).

Exemplos de aplicações das lectinas incluem o isolamento e purificação de glicoconjugados por cromatografia de afinidade em colunas contendo lectinas imobilizadas, análise de glicomas, modulação da proliferação e ativação celular, detecção de doenças relacionadas à síntese de glicanas, liberação controlada de drogas, diagnóstico e terapêutica em câncer e em doenças auto-imunes, estimulação mitogênica de linfócitos, investigação de

estruturas de carboidratos na superfície celular e de animais, bactérias e vírus, estudos das funções do sistema imune tais como produção e proliferação de interferons e citocinas, asma e inflamação e outros efeitos imunoestimulatórios (CARLINI & GROSSI-DE-SÁ, 2002; STAUDER & KREUSER, 2002; SHARON & LIS, 2004).

Além dessas utilidades, as lectinas de plantas têm sido escolhidas para estudos das bases moleculares nos eventos de reconhecimento dos processos de infecções virais, bacterianas, fúngicas e parasíticas; endereçamento de células e componentes solúveis; fertilização, metástases, crescimento e diferenciação celular (LORIS *et al.*, 1998; KEYAERTS *et al.*, 2007).

2.5 A espécie *Moringa oleifera*

A *M. oleifera*, popularmente conhecida como moringa, lírio branco ou quiabo da quina (Figura 2), é originária do nordeste indiano sendo amplamente distribuída na Burma, Ceilão, Egito, Filipinas, Índia, Jamaica, Malásia, Nigéria, Paquistão, Singapura e Tailândia (DUKE, 1987; MAKKAR & BECKER, 1997; PIO CÔRREA, 1984). Está inserida na família Moringaceae, pertencente à Ordem Brassicales, que possui um único gênero denominado *Moringa*, constituído por 14 espécies descritas.

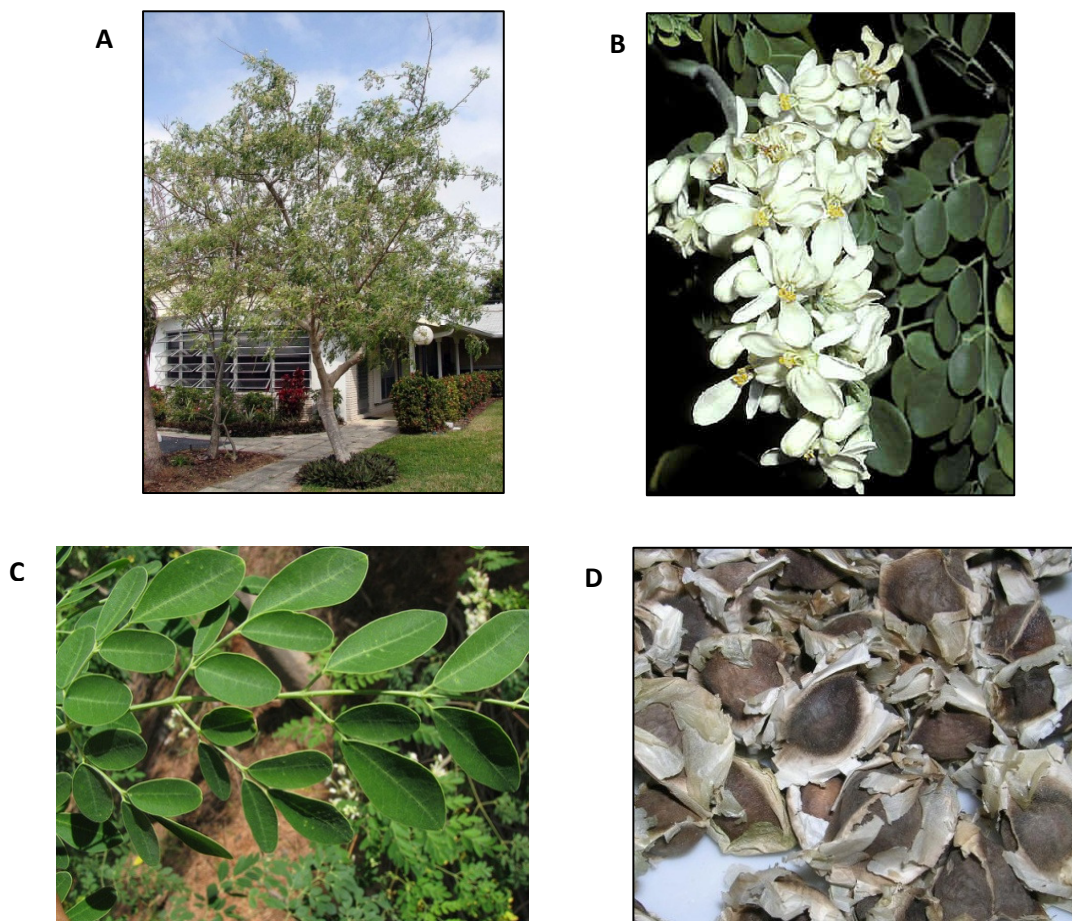


Figura 2. A espécie *Moringa. oleifera*. Aspecto geral (A), Flores (B), Folhas (C), Sementes (D). FONTE: <http://www.kqm.com.br>

É uma planta de porte arbóreo, entre 7 e 12 m de altura, uma hortaliça perene, com baixo custo de produção e é bastante cultivada devido a adaptação à regiões de secas prolongadas, sobrevivendo a grandes períodos em solos pobres e com baixo teor de umidade (MACCONNACHIE *et al.*, 1999). Trata-se de uma planta de múltiplo uso, pois muitas propriedades têm sido identificadas em seus diferentes tecidos. E também tem sido utilizada como cerca viva e quebra-vento em algumas regiões do Brasil (SILVA & KERR, 1999). As folhas, frutos verdes, flores e sementes são utilizadas na alimentação de humanos e de outros animais (PALADA, 1996; MAKKAR & BECKER, 1997). O extrato das folhas é uma fonte

potencial de antioxidantes (ARABSHAH *et al.*, 2007) e agentes hipocolesterolêmicos (CHUMARK *et al.*, 2009).

As sementes possuem importância industrial, já que produzem um óleo usado para lubrificar relógios e outras maquinarias delicadas e são também usadas no tratamento da água (DUKE, 1987; MORTON, 1991). As sementes promoveram ação descontaminante em águas contaminadas por arsênio podendo ser utilizadas em áreas domésticas como tecnologia segura e viável ao meio ambiente (KUMARI *et al.*, 2006).

As sementes de *M. oleifera* contém atividade hipotensiva (FAIZI *et al.*, 1995), forte atividade antioxidante e propriedade quelante contra toxicidade pelo arsênio (GUPTA *et al.*, 2005). As folhas, frutos, raízes e sementes também possuem propriedades medicinais, sendo tradicionalmente utilizadas para o tratamento de tumores abdominais, escorbuto, ataques paralíticos, problemas de bexiga e próstata, úlceras e infecções cutâneas (FUGLIE, 2001).

Nos países em desenvolvimento, as sementes de *M. oleifera* são amplamente utilizadas como coagulante natural para tratamento de água, principalmente em áreas rurais onde recursos hídricos adequados não estão disponíveis. As sementes contêm proteínas coagulantes que podem ser facilmente extratidas em água e promovem a precipitação de partículas em suspensão, levando à diminuição na turbidez de água (GASSENSCHMIDT *et al.*, 1995; GHEBREMICHAEL *et al.*, 2005; BHUPTAWAT *et al.*, 2007; SANTOS *et al.*, 2009; FERREIRA *et al.*, 2011).

Extrato aquoso de sementes de moringa apresentou atividades larvicida e ovicida contra *A. aegypti* (COELHO *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2012). Extrato metanólico das sementes promoveu mortalidade de larvas e pupas de *Anopheles stephensis*, vetor da malária (PRABHU *et al.*, 2011).

2.5.1 Lectinas de *M. oleifera*

As sementes de *M. oleifera* contêm as lectinas ligadoras de quitina cMoL (do inglês *coagulant M. oleifera lectin*) (SANTOS *et al.*, 2005) e WSMoL (do inglês *water-soluble M. oleifera lectin*) (COELHO *et al.*, 2009) que diferem entre si quanto à massa molecular, propriedades físico-químicas e padrão de reconhecimento a carboidratos. cMoL, foi agente inseticida contra a mariposa da farinha *Anagasta kuehniella* e WSMoL tem atividade ovicida e larvicida sobre *Aedes aegypti* (COELHO *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2012).

A atividade coagulante de cMoL e WSMoL foi determinada utilizando-se um modelo de água turva com caolim e portanto as lectinas podem ser incluídas no grupo das proteínas coagulantes das sementes de moringa (SANTOS *et al.*, 2009). FERREIRA *et al.* (2011) investigando o efeito de WSMoL sobre a turbidez e bactérias presentes em água de ambiente determinaram que a lectina por suas atividades coagulante e antibacteriana, é um dos agentes que promovem purificação e descontaminação da água.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a cinética de coagulação de WSMoL através de um comparativo entre medidas de absorvância (densidade óptica) e variação de resistência elétrica entre a interface eletrodo-solução.

3.2 Objetivos Específicos

- Extrair WSMoL de sementes de *M. oleifera* e purificá-la de acordo com procedimento previamente estabelecido.
- Determinar a massa molecular nativa de WSMoL por cromatografia de filtração em gel.
- Avaliar WSMoL por SDS-PAGE em condições não-redutoras.
- Determinar o ponto isoelétrico de WSMoL.
- Determinar o efeito de carboidratos e íons na atividade hemaglutinante de WSMoL.
- Avaliar a cinética de coagulação de WSMoL em modelo de água turva com caolin, através das medidas de absorvância (densidade óptica) e variação da resistência elétrica em resposta à aplicação de corrente elétrica.
- Avaliar o efeito de carboidratos e íons sobre a cinética de coagulação de WSMoL.
- Analisar estatisticamente os resultados através do teste *t* de Student ($p < 0,05$).

4. REFERÊNCIAS

AMIRANTE, G.A. Production of heteroagglutinins in haemocytes of *Leucophaea maderae* L. **Journal Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 32, p. 526-528, 1976.

AMIRTHARAJAH, A.; O'MELIA, C. R. Coagulation processes: Destabilization, mixing and flocculation. **Water quality and treatment**, v.1, p.220, 1990.

AKHTAR, M.; MOOSA, S. H.; BHANGER, M. I.; SHAHID, I. Sorption potential of *Moringa oleifera* pods for the removal of organic pollutants from aqueous solutions, **Journal Hazardous Materials**, v. 141, p. 546-556, 2007.

ARABSHAHI, D.S.; DEVI, D.V.; UROOJ, A. Evaluation of antioxidant activity of some plant extracts and their heat, pH and storage stability. **Food Chemistry**, v.100, p.1100–1105, 2007.

AZEVEDO NETTO, J. M. Técnicas de abastecimento e tratamento de água. Vol.2: CETESB, São Paulo, 1976.

BARREAU, C.; TOURAY, M.; PIMENTA, P. F.; MILLER, L. H.; VERNICK, K. D. *Plasmodium gallinaceum*; sporozoite invasion of *Aedes aegypti* salivary glands is inhibited by anti-gland antibodies and by lectins. **Experimental Parasitology**, v. 81, p. 332-343, 1995.

BOLTO, B.; GREGORY, J. Organic polyelectrolytes in water treatment. **Water Research**, v. 41, p. 2301-2324, 2007.

BORBA, L. R.. Viabilidade do uso da *Moringa oleifera* Lam no Tratamento Simplificado de Água para Pequenas Comunidades. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal da Paraíba, 2001.

BRADLEY, R.S.; STUART G.S.; STILES, B.; HAPNER K.D. **Journal of Insect Physiology**, v. 35, p. 353-361, 1989.

BRAGA, I.A.; LIMA, J.B.P.; SOARES, S.S.; VALLE, D. *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 199-203, 2004.

BHUPTAWAT, H.; FOLKARD, G.K.; CHAUDHARI, S. Innovative physico-chemical treatment of wastewater incorporating *Moringa oleifera* seed coagulant. **Journal of Hazardous Materials**, v. 142, p. 477-482, 2007.

BUDD, G.C.; HESS, A.F.; SHORNEY-DARBY, H.; NEEMANN, J.J.; SPENCER, C. M.; BELLAMY, J.D.; HARGETTE, P.H. Coagulation applications for new treatment Goals. **American Water Works Association** v. 92, p. 102-113, 2004.

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, Maria José Herkenhoff. Uso de coagulantes naturais no processo de obtenção de água potável. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Maringá, p. 23, 2008.

CASTELAN, G.; Fundamentos de Físico-Química, v.1, LTC, São Paulo, 1998.

CHUMARK, P.K.; PONGRAPEEPORN, Y.; SANVARINTA, S.; PHORNCHIRASILP, P.; KHUNAWAT, L.; PHIVTHONG-NGAM, U.P. Regulation of mRNA level of low density lipoprotein receptors in hep g2 cells treated with water extract of *Moringa oleifera* Lam. leaves. **Atherosclerosis Supplement**, v. 13 p.10, 2009.

CLAYTON, B, E. Report of the lower moor incident advisory group. **Journal Indian Medicine**. v. 40, p. 301-304, 1989.

COELHO, J.S.; SANTOS, N.D.L.; NAPOLEÃO, T.H.; GOMES, F.S.; FERREIRA, R.S.; ZINGALI, R.B.; COELHO, L.C.B.B.; LEITE, S.P.; NAVARRO, D.M.A.F.; PAIVA, P.M.G. Effect of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of *Aedes aegyti* larvae. **Chemosphere**, v.77, p. 934-938, 2009.

CUBAS, A. L. Y. Flocculação em meio granular expandido. Dissertação de Mestrado. Engenharia Ambiental –Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1999.

DI BERNARDO, L.; DANTAS, A.D.B. Métodos e técnicas de tratamento de água., Editora Rima, São Carlos, SP, vol.2, 2005.

DUAN, J.; GREGORY J. Coagulation by hydrolysing metal salts. **Advances in Colloid and Interface Science** v.100, p.102-475, 2006.

DUKE, J.A. Moringaceae: horseradish-tree, drumstick-tree, sohnja, moringa, murunga-kai, mulungay. In: BENGE, M. D. (Ed.) *Moringa a multipurpose tree that purifies water*. Boston, **Science and Technology for Environment and Natural Resources**, p. 19-28, 1987.

FAIZI, S.; SIDDIQUI, B.S.; SALEEM, R.; SIDDIQUI, S.; AFTAB, K.; GILANI, A.H. Isolation and structure elucidation of new nitrile and mustard iol glycosides from *Moringa oleifera* and their effect on blood pressure. **Jounal of Natural Products**, v.57, p.1256-1261, 1995.

FERREIRA, S. S. F. Comportamento químico do alumínio e do ferro em meio aquoso e implicações no tratamento de água. Sanare, p. 50-58, 1997.

FERREIRA, R.S.; NAPOLEÃO, T.H.; SANTOS, A.F.S.; SÁ, R.A. CARNEIRO-DA-CUNHA, M.G.; MORAIS, M.M.C.; SILVA-LUCCA, R.A.; OLIVA, M.L.V.; COELHO, L.C.C.B; PAIVA, P.M.G. "Coagulant and antibacterial activities of the water-soluble seed lectin from *Moringa oleifera*" **Letters in Applied Microbiology**, v. 53, pp. 186-192, 2011.

FUGLIE, L.J., The Miracle Tree: *Moringa oleifera*: Natural Nutrition for the **Tropics**, **Church World Service**, Dakar, v. 5, p. 68, 2001.

GAO, B.Y.; WANG Y.; YUE Q.Y.; WEI, J.C.; LI, Q The size and coagulation behavior of a novel composite inorganic-organic coagulant .**Separation and Purification Technology**. v. 62, p. 544-550, 2008.

GASSENSCHMIDT, U.; JANY, K.D.; TAUSCHER, B.; NIEBERGALL, H. Isolation and characterization of a flocculating protein from *Moringa oleifera* Lam. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1243, p. 477-481, 1995.

GHEBREMICHAEL, K.A.; GUNARATNA, K.R.; HENRIKSSON, H.; BRUMER, H.; DALHAMMAR, G. A simple purification and activity assay of the coagulant protein from *Moringa oleifera* seed. **Water Research**, v. 39, p. 2338-2344, 2005.

GRUBHOFFER, L.; HYPESA, V.V.P. Lectins (hemagglutinins) in the gut of the important disease vectors. **Parasite**, v. 4, p. 203-216, 1997.

GUPTA, R.; KANNAM, M.G.; SHARMA, M.; FLORA, S.J.S. Therapeutic effects of *Moringa oleifera* on arsenic-induced toxicity in rats. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 20, n.3, p.456-464, 2005.

HASSEMER, M. E. N. Tratamento de efluente têxtil –processo físico-químico com ozônio e floculação em meio granular. Dissertação de Mestrado. Engenharia Ambiental. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2000.

HELPANHOL, I. Um novo paradigma para gestão de recursos hídricos. **Estudos avançados**, v. 22, p. 131-158, 2008.

HIRSCH, A.M. Role of lectins (and rhizobial exopolysaccharides) in legume nodulation. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 2, p. 320-326, 1999.

HOTZA, D.; GREIL, P. Review: Aqueous Tape Casting of Ceramic Powders. **Materials Science and Engineering** v.11, p. 206-217, 1997.

HOWARD, I.; SAGE, H.J.; HORTON, C.B. Communication: studies on the appearance and location of hemagglutinins from a common lentil during the life cycle of the plant. **Archive of Biochemistry and Biophysics**, New York, v.149, p.323-326, 1972.

HSU, D.K.; LIU, F.T. Regulation of cellular homeostasis by galectins. **Glycoconjugate Journal**, v. 19, p. 507-515, 2004.

INGRAM, G.A.; MOLYNEUX, D.H. Insect lectins: role in parasite-vector interactions. **Lectin Reviews**, v. 1, p. 103-127, 1991.

ISIDRO, R.; SALES, F.J.M.; CAVADA, B.S.; GRANGEIRO, T.B.; MOREIRA, R.A. Ação de lectina de sementes de *Canavalia brasiliensis* Mart. sobre o comportamento da saúva do nordeste (*Atta opaciceps* Borgmeier, 1939). **Revista Faculdade de Agronomia** (Maracay) v. 27, p.77-86, 2001.

ITO, Y. Occurrence of lectins in leaves and flowers of *Sophora japonica* . **Plant Science**, v. 47, n. 2, p. 77-82, 1986.

JACOBSON, R.L.; DOYLE, R.J. Lectin-Parasite Interactions. **Parasitology Today**, v. 12, p. 55-61, 1996.

JARVIS, P.; MARTIN, J.; WINSPEA, T.; JEFFERSON, B. Ballasted flotation with glass microspheres for removal of natural organic matter. **Separation Science and Technology**, v. 46, p. 2489-2495, 2006.

JUNG, E.C.; KIM, K.D.; BAE, C.H.; KIM, J.C.; KIM, D.K.; KIM, H.H. A mushroom lectin from ascomycete *Cordyceps militaris*, **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1770, p. 833–838, 2007.

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

KEYAERTS, E.; VIJGEN, L.; PANNECOUQUE, C.; VAN DAMME, E.; PEUMANS, W.; EGBERINK, H.; BALZARINI, J.; RANST, M.V. Plant lectins are potent inhibitors of coronaviruses by interfering with two targets in the viral replication cycle. **Antiviral Research**, v. 75, p. 179–187, 2007.

KILPATRICK, D.C. Review Animal lectins: a historical introduction and overview. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1572, p. 187– 197, 2002.

KUMARI, P.; SHARMA, P.; SRIVASTAVA, S.; SRIVASTAVA, M.M. Biosorption studies on shelled *Moringa oleifera* Lamarck seed powder: removal and recovery of arsenic from aqueous system. **International Journal of Miner Process**, v.78, p.131–139, 2006.

LAN, S.; NG, T. A protein with antiproliferative, antifungal and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from caper (*Capparis spinosa*) seeds. **Phytomedicine**, v. 16, p. 444-450, 2009.

LEFFLER, A. L. **Princípios de Bioquímica**. São Paulo, ed. Sarvier, Cap. 5, p. 87-119, 2004.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. Sarvier, 4^a ed., São Paulo, p. 88-93, 2006.

LEME, F. P. Teorias e técnicas de tratamento de água. ABES, Rio de Janeiro, 1990.

LIENER, I.E. Phytohemagglutinins (phytolectins). **Annual Review Plant Physiology**, Palo Alto, v. 27, p. 291-319, 1976.

LIENER, I.E. The nutritional significance of the plant lectins. In: ORY, R.L. Antinutrients and natural toxicants in foods. **Westport: Food & Nutrition Press**, v. 38 p. 143-157; 1981.

LIMPENS, E.; BISSELING, T. Signaling in symbiosis. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, p. 343-350, 2003.

LIS, H.; SHARON, N. The biochemistry of plant lectins (phytohemagglutinins). **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 42, p. 541-574, 1973.

LIS, H.; SHARON, N. Lectins as molecules and as Tools. **Annual Review of Biochemistry**, v. 55, p. 35-67, 1986.

LORIS, R. Legume lectin structure. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1383, p. 9-36, 1998.

MACCONHACHIE, G.L.; FOLKARD, G.K.; MTAWALI, M.A.; SUTHERLAND, J.P. Fiels trials of appropriate hydraulic flocculation processes. **Water Research**, v. 33, p. 1425-1434, 1999.

MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. Nutrients and antiquality factors in different morphological parts of the *Moringa oleifera* tree. **Journal of Agricultural Science**, v. 2, p. 331-322, 1997.

MAUCHAMP, B. Purification of an N-acetyl-Dglucosamine specific lectin (P.B.A.) from epidermal cell membranes of *Pieris brassica*. **Biochimie**, v. 64, p.1001-1008, 1982.

MAUDLIN, I. Transmission of African trypanosomiasis: interactions among tsetse immune system, synbiont and parasites. **Advances in Disease Vector Research**, v. 31, p. 117-48, 1991.

MENDES, C.G.N. Estudo da coagulação e floculação de águas sintéticas e naturais com turbidez e cor variáveis. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo. 1989.

METCALF, J.; EDDY, P. Wastewater engineering: treatment, disposal and reuse. Nova Iorque, 2003.

MIKESKA K.; CANNON,W. R. Dispersants for Tape Casting Pure Barium Titanate.. **Advances in Ceramics**. v. 9, p. 164-183, 1984.

MORENO, R. The Role of Slip Additives in Tape Casting Technology. **American Ceramic Society Bulletin**. v.71, p. 1647-1657, 1992.

MORTON, J. The horseradish tree, *Moringa pterygosperma* (Moringaceae) – a boon to arid lands? **Economy Botany**, v. 3, p.318-333, 1991.

MUYIBI, S.A.; EVISON, L.M. Optimizing physical parameters a effecting coagulation of turbid water with *Moringa oleifera* seeds. **Water Research**, v. 29, p. 2689-2695, 1995.

NAPOLEÃO, T.H.; GOMES, F.S.; LIMA, T.A.; SANTOS, N.D.L.; SÁ, R.A.; ALBUQUERQUE, A.C.; COELHO, L.C.B.B.; PAIVA, P.M.G. Termiticidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* against *Nasutitermes corniger* and its mechanisms. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 65, p. 52-59, 2011.

NAPPER, D. H. Polymeric Stabilization of Colloidal Dispersions. Nova Iorque, 1983.

NASCIMENTO, C.O.; COSTA, R.M.P.B.; ARAÚJO, R.M.S.; CHAVES, M.E.C.; COELHO, L.C.B.B.; PAIVA, P.M.G.; TEIXEIRA, J.A.; CORREIA, M.T.S.; CARNEIRO-DA-CUNHA,

M.G. Optimized extraction of a lectin from *Crataeva tapia* bark using AOT in isooctane reversed micelles. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 779–782, 2008.

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

NDABIGENEGESERE, A.; NARASIAH, K.S. & TALBOT, B.G. Active agents and mechanism of coagulation of turbid waters using *Moringa oleifera*. **Water Research**, v.29, p. 703-710, 1995.

NDABIGENGESERE, A.; NARASIAH, S.K., Quality of water treated by coagulation using *Moringa oleifera* seeds, **Water Research**, v. 32, p 781-791, 1998.

OKUDA, T.; BAES, A. U.; NISHIJIMA, W.; OKADA, M. Improvement of extraction method of coagulation active components from *Moringa oleifera* seed, **Water Research**, v. 33, p. 3373-3378, 2001.

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

OLIVEIRA, C.F.R.; LUZ, L.A.; PAIVA, P.M.G.; COELHO, L.C.B.B.; MARAGONI, S.; MACEDO, M.L.R. 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, 2010.

ORGANIZAÇÃO METEREOLÓGICA MUNDIAL/ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A EDUCAÇÃO, A CIÊNCIA E A CULTURA. Hay suficiente água en el mundo? 1997.

PAES, J.B.; MORAIS, V.M.; LIMA, C.R. Resistência das madeiras de aroeira (*Myracrodruon urundeuva*), cássia (*Senna siamea*) e ipê (*Tabebuia impetiginosa*) a fungos e cupins xilófagos, em condições de laboratório. **Floresta e Ambiente**, v. 9, p.135-144, 2002.

PALADA, M.C. *Moringa* (*Moringa oleifera* Lam.): a versatile tree crop with horticultural potential in the Subtropical United States. **Horticulture Science**, v. 31, p. 233-234, 1996.
PEREIRA, M.E.; ANDRADE, A.F.B.; RIBEIRO, J.M.C. Lectins of distinct specificity in *Rhodnius prolixus* interact selectively with *Trypanosoma cruzi*. **Science**, v. 211, p. 597-99, 1981.

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

PHILLIPI, A. J. Desenvolvimento de um equipamento para testes de floculação através de floculação em meio granular expandido. Dissertação de Mestrado. Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina. 2001.

PIO CORRÉA, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro. IBDF, v. 5, p. 276-283, 1984.

POHLEVEN, J.; OBERMAJER, N.; SABOTIČ, J.; ANŽLOVAR, S.; SEPČIČ, K.; KOS, J.; KRALJ, B.; ŠTRUKELJ, B.; BRZIN, J. Purification, characterization and cloning of a ricin B-like lectin from mushroom *Clitocybe nebularis* with antiproliferative activity against human leukemic T cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 23, p. 158- 162, 2009.

PRABHU, K; MURUGAN, K; NARESHKUMAR, A; RAMASUBRAMANIANB, N.; S BRAGADEESWARANA, S. Larvicidal and repellent potential of *Moringa oleifera* against malarial vector, *Anopheles stephensi* Liston (Insecta: Diptera: Culicidae). **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 1, p. 124-129, 2011.

RAMOS, R. O. Clarificação de água com turbidez baixa e cor moderada utilizando sementes de *Moringa oleifera* Lam, Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, 2005.

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

REGO, E.J.L.; CARVALHO, D.D.; MAGANRONI, S.; OLIVEIRA, B.; NOVELLO, J.C. Lectins from seeds of *Crotalaria pallida* (Smooth rattlebox). **Phytochemistry**, v. 60, p. 441-447, 2002.

RICHTER, C.A.; AZEVEDO NETTO, J. Tratamento de água. Tecnologia atualizada. São Paulo, 1991

RIZZO, L., Di GENNARO, A., GALLO, M., BELGIORNO, V. Coagulation/chlorination of surface water : A comparison between chitosan and metal salts. **Separation and Purification Technology** , v. 62, p. 79-85, 2008.

ROJO, M.A. Isolation, cDNA cloning, biological properties, and carbohydrate binding specificity of sieboldin-b, a type II ribosome-inactivating protein from the bark of japanese elderberry (*Sambucus sieboldiana*). **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 340, p. 185-194, 1997.

SÁ, R.A.; SANTOS, N. D. L.; SILVA, C. S. B.; NAPOLEÃO, T. H.; GOMES, F. S.; CAVADA, B.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.

SÁ, R. A.; SANTOS, N. D. L.; SILVA, C. S. B.; NAPOLEÃO, T. H.; GOMES, F. S.; CAVADA, B.S.; COELHO, L. C. B. B.; NAVARRO, D. M. A. F.; BIEBER, L.W.; PAIVA, P. M. G. Larvicidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* on *Aedes aegypti*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C, Toxicology & Pharmacology**, v.149, p.300 - 306, 2009.

SANTANA, M.A.; SANTOS, A.M.C.; OLIVEIRA, M.E.; OLIVEIRA, J.S.; BABA, E.H.; SANTORO, M.M.; ANDRADE, M.H.G. A novel and efficient and low-cost methodology for purification of *Macrotyloma axillare* (Leguminosae) seed lectin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 43, p. 352–358, 2008.

SANTOS, A.F.S.; ARGOLO, A.C.C.; COELHO, L.C.B.B.; PAIVA, P.M.G. Detection of water soluble lectin and antioxidant component from *Moringa oleifera* seeds. **Water Research** 39, 975–980, 2005.

SANTOS, A.F.S.; LUZ, L.A.; ARGOLO, A.C.C.; TEIXEIRA, J.A.; PAIVA, P.M.G.; COELHO, L.C.B.B. Isolation of a seed coagulant *Moringa oleifera* lectin. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 504-508, 2009.

SANTOS, A.F.S.; PAIVA, P.M.G.; TEIXEIRA, J.A.; BRITO, A.G.; COELHO, L.C.B.B.; NOGUEIRA, R.B. Coagulant properties of *Moringa oleifera* protein preparations: application to humic acids removal. **Environmental Technology**, v.33, p. 69-75, 2011.

SANTOS, N.D.L.; MOURA, K.S.; NAPOLEÃO, T.H.; SANTOS, G.K.N.; COELHO, L.C.B.B.; NAVARRO, D.M.A.F.; PAIVA, P. M. G. Oviposition-stimulant and ovicidal activities of *Moringa oleifera* lectin on *Aedes aegypti*, PLoS ONE, v. 7, e44840, pp. 1-8. T53-T58, 2012.

SHARON, N.; LIS, H. Lectins as cell recognition molecules. **Science**, v.246, p. 227–234, 1989.

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

SHARON, N. Lectins: Carbohydrate-specific Reagents and Biological Recognition Molecules. **Journal of biological chemistry**, v. 282, p. 2753-2764, 2007.

SHAW, D. J. Introduction to Colloid and Surface Chemistry. 4ª edição. Londres, 1992.

SILVA, A.R.; KERR, E.W. **Moringa uma nova alternativa para o Brasil**. Fortaleza: UFC DIRIU, p.95, 1999.

STAUDER, H.; KREUSER, E.D. Mistletoe extracts standardised in terms of mistletoe lectins (MLI) in oncology: **Current State of Clinical Research**. *Onkologie*, v. 25, p. 374–380, 2002.

STILES, B. Site of synthesis of the haemolymph agglutinin of *Melanoplus differentialis* (Acrididae: Orthoptera). **Journal of Insect Physiology**, v. 34, p.1077-85, 1988.

SULAGNA, B.A.S.; GHOSH, S.; GANGULY, N.K.; MAJUMDAR, S. A biologically active lectin of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Biochimie**, v. 86, p. 657-666, 2004.

TATENO H. Purification, characterization molecular and expression of novel members of jacalin-related lectins from rhizomes of the true fern *Plebidium aureum* (L.) J. Smith (Polypodiaceae). **Journal Biology Chemistry**, v. 278, p.10891-10899, 2003.

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

TRINDADE, M.B. Structural characterization of novel chitin-binding lectins from the genus *Artocarpus* and their antifungal activity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1764, p. 146-152, 2006.

VAN DAMME, E.; PEUMANS, W.; PUSZTAI, A.; BARDOCZ, S. **Handbook of plant lectins: properties and biomedical applications**. Ed. John Wiley & Sons, p.452, 1998.

VIJAYAN, M.; CHANDRA, N. Lectins. **Current Opinion in Structural Biology**. v. 9, p.707–714, 1999.

WANG, H.X.; NG, T.B. Concurrent isolation of a Kunitz-type trypsin inhibitor with antifungal activity and a novel lectin from *Pseudostellaria heterophylla* roots. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 342, p. 349-353, 2006.

YAO, Q.; WU, C.; LUO, P.; XIANG, X.; LIU, J.; MOU, L.; BAO, J. A new chitin-binding lectin from rhizome of *Setcreasea purpurea* with antifungal, antiviral and apoptosis – inducing activities. **Process Biochemistry**, v.45, p. 1477-1485, 2010.

YU, J.F.; WANG, D.S., YAN, M.Q., YE, C., YANG, M., Ge, X. Optimized Coagulation of High Alkalinity, Low Temperature and Particle Water: pH Adjustment and Polyelectrolytes as Coagulant Aids. **Environmental Monitoring and Assessment** v.131, p.377–386, 2007.

5. ARTIGO

Coagulant activity of water soluble *Moringa oleifera* lectin in presence of carbohydrates and ions

A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO “Water Research”



Fator de Impacto: 4.865

Coagulant activity of water soluble *Moringa oleifera* lectin in presence of carbohydrates and ions

Kézia S. de Moura, Hugo R. C. da Silva, Leonardo P. Dornelles, Thiago H. Napoleão, Luana C. B. B. Coelho, Maria Danielly L. de Oliveira, Patrícia M. G. Paiva*

Departamento de Bioquímica-CCB, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universtária, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brazil.

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

E-mail: ppaivaufpe@yahoo.com.br

Abstract

Moringa oleifera seeds are used in water treatment and contain a water-soluble lectin (WSMoL) with coagulant activity. The aim of this study was to evaluate the kinetics of coagulation promoted by absorbance measurements WSMoL through and changes in resistance at the electrode-solution interface. In addition WSMoL was characterized for native molecular mass, SDS-PAGE profile and Isoelectric point (PI). The coagulant activity was determined using the model of turbid water with 1% kaolin in tap water. The hemagglutinating (HA) and activities of coagulant were WSMoL also evaluated at presence of N-acetylglucosamine, glucose, fructose and salt solutions of calcium and magnesium. Native WSMoL showed molecular mass 59.4 kDa. In SDS-PAGE, it was observed three peptides with approximately 30, 20 and 10 kDa. The PI is determined native WSMoL was 5.5. The WSMoL coagulant activity was demonstrated by reduction in absorbance of the solution and kaolin reduction of electrical resistance of the aqueous medium. The incubation of lectin with carbohydrate at concentrations that inhibit its HA and with calcium or magnesium ions caused a reduction of coagulant activity. The reduction in absorbance and electrical resistance promoted by WSMoL probably involves destabilization of suspended particles, followed by formation of complexes between WSMoL and particles.

Keywords: Coagulant activity; electrical resistance; kaolin; lectin; *Moringa oleifera*.

1. Introduction

Water quality is defined by its chemical, physical and microbial composition and the quality level to be achieved depends on the desired use. For human consumption there is a need for pure and healthy water i.e. free of visible suspended material, color, taste, flavor, any organism that may cause illnesses and organic or inorganic substances that may produce damaging physiological effects (Duan et al., 2006). The methods for water treatment range from simple boil to complex systems that include the steps of coagulation, flocculation, sedimentation, filtration and chlorination (Ramos, 2005).

Coagulation has been employed in water treatment aiming to decrease turbidity and color as well as to eliminate pathogenic agents (Yu et al., 2007). In general the coagulation is a process where the repulsive potential of the colloidal electric double-layer is reduced such that micro particles are produced; these micro particles collide and form larger structures called clusters (Budd et al., 2004). Coagulant agents destabilize colloidal particles by adsorption and neutralization, compression of the diffuse layer, adsorption and bridge formation or scanning (Cubas, 1999, Di Bernardo, 2005, Ferreira, 1997, Hassemer, 2000; Mikeska, & Cannon, 1984).

Chemical coagulation is achieved by adding inorganic coagulants, such as aluminum and iron salts (Duan et al., 2006). However there is currently a need for a better water treatment in order to reach the required standards for water quality (Jarvis et al., 2006). Polyelectrolytes, cationic, anionic or ampholytic molecules whose monomer unit can be an ionizable group such as amino, carboxyl or sulfonic groups, constitute simple and cheap alternatives of coagulants (Bolto et al., 2007). Natural coagulants and flocculants have demonstrated advantages in comparison with synthetic coagulants specifically regarding the biodegradability, low toxicity and low production level of residual sludge (Carvalho, 2008).

Moringa oleifera (Moringaceae) is a plant originated from India and broadly cultivated along the tropics, including Brazil, due to be perennial, resistant to drought, low demanding regarding soil and fertilization, and resistant to pests and diseases (Makkar and Becker, 1997). The seeds of *M. oleifera* are used by people to treat water for human consumption due to coagulant activity of some constituents (Gassenschmidt et al., 1995; Ndabigenegesere et al., 1995, Okuda et al., 2001; Ghebremichael et al., 2005). *M. oleifera* seeds contain the lectins cMoL (coagulant *M. oleifera* lectin) and WSMoL (water-soluble *M. oleifera* lectin), which are also coagulant agents (Santos et al., 2009; Ferreira et al., 2011).

This work reports the effect of WSMoL on reduction of turbidity and electric resistance of water medium during the coagulation process and effects of carbohydrates and ions on coagulant activity. Also, native molecular mass and isoelectric point of WSMoL are described.

2. Materials and Methods

2.1 Botanical material

Seeds of *M. oleifera* (Family Moringaceae), popularly known as moringa, drumstick, horsehardish tree, white lily or tree well were collected at the Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Brazil. The voucher specimen (No. 73345) is archived at the herbarium Dárdano de Andrade Lima (Instituto Agronômico de Pernambuco), Recife, Brazil.

2.2 Protein content

Protein content was estimated according to Lowry (1951) using standard curve of bovine serum albumin (31.25 - 500 µg / mL).

2.3 Hemagglutinating activity

The hemagglutination activity (HA) was performed in microtiter plates according to Paiva and Coelho (1992) using a rabbit erythrocyte suspension treated with glutaraldehyde. The title was defined as the reciprocal of the highest dilution of sample which promoted the hemagglutination. The specific HA was defined as the ratio between the title and the protein concentration in mg/mL. The HA inhibition assay was performed incubating (30 min) the lectin sample with a solution of monosaccharides N-acetyl glucosamine, glucose or fructose (25, 50, 100 and 200 mM) before adding the cell suspension.

2.4 Extraction of proteins and precipitation by ammonium sulphate

For the preparation of the extract, the *M. oleifera* seed meal (10 g) was submitted to extraction in distilled water (100 mL) for 16 h at 4 °C under constant agitation. After filtration through gauze and centrifugation (15 min, 9000 g, 4 °C) the supernatant (seed extract, SE) was collected. SE proteins were precipitated according to Green and Hughes (1955) using ammonium sulphate (60% saturation) and gentle agitation for 4 h at 28 °C. Following, centrifugation (15 min, 9000 g, 4 °C) was performed and the collected precipitate was resuspended in 0.15 M NaCl and dialyzed in semipermeable membrane against distilled water (4 h) and 0.15 M NaCl (2 h). SE and the dialyzed protein fraction (F0-60) were evaluated for protein concentration and HA.

2.5 Purification of WSMoL

WSMoL was isolated according to the procedure described by Coelho et al. (2009). F0-60 was loaded (80 mg protein) onto chitin column (18 x 1.5 cm) equilibrated with 0.15 M NaCl (0.3 mL/min). After washing with the equilibration solution, WSMoL was eluted with

1.0 M acetic acid and subsequently dialyzed against distilled water (4 h) and 0.15 M NaCl (4 h) at 4 °C for elimination of the eluent.

2.6 Gel filtration chromatography

WSMoL was chromatographed on a Hicap 16/60 Sephacryl S-100 column (16 mm x 60 cm)/Äkta Prime system (GE Healthcare, Sweden) pre-equilibrated at 24 °C with 0.15 M NaCl. Sample (2.0 mL containing 0.4 mg of protein) was injected and eluted (2.0 mL fraction) with 0.15 M NaCl at a flow rate of 0.5 mL/min. The polypeptides and molecular mass Phosphorylase b (97000 Da), albumin (66000 Da), ovalbumin (45000 Da), carbonic anhydrase (30000Da), trypsin inhibitor (20100 Da), and α -lactalbumin (14400 Da) were similarly chromatographed.

2.7 Polyacrylamide gel electrophoresis and isoelectric focusing of WSMoL

Electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulphate (SDS-PAGE) was performed on 12% (w/v) gel according to Laemmli (1970). Polypeptides and molecular mass markers (Phosphorylase b, 97000 Da, albumin, 66000 Da, ovalbumin, 45000 Da, carbonic anhydrase, 30000Da, trypsin inhibitor, 20100 Da, α -lactalbumin, 14,400 Da, from GE Healthcare, Sweden) were stained with 0.02% Coomassie Brilliant Blue in 10% acetic acid.

For isoelectric focusing, WSMoL (150 μ g) was solubilized in rehydration solution (8 M urea, 2% CHAPS, 1% IPG buffer pH 3-10 gradient; 0.002% bromophenol blue) for 30 min at 28 °C. The rehydrated sample was then loaded in gel strips (7 cm) and immobilized for 12 h. The isoelectric focusing was performed at 25 °C and 68.00 Vh using the IPG-Phor III system (GE Healthcare, Sweden). Next the strip was stained with with 0.02% Coomassie Brilliant Blue in 10% acetic acid.

2.8 Evaluation of coagulant activity by measurement of absorbance (optical density)

Coagulant activity was determined using a model of turbid water with kaolin (Ghebremichael et al., 2005). Kaolin suspension at 1% in tap water was maintained under constant agitation for 30 min and allowed to stand for 24 h to provide complete hydration. In a test tube, 3 mL of the suspension were incubated with 30 μ L of sample (SE at 0.015 and 1.6 mg/mL of protein, WSMoL at 0.2 mg/mL or alum at 0.015 mg/mL) and stirred in vortex. The optical density reading at 500 nm was carried out in quartz cuvette at time zero and every 10 min during 90 min. The negative control contained the suspension of kaolin and distilled water. The SE concentration of 0.015 mg/mL was used to compare the results with alum (positive control) and the 1.6 mg/mL is the concentration of extract directly obtained using the protocol described in section 2.4, without any dilution.

To determine the effect of carbohydrates and ions on WSMoL coagulant activity, the lectin (0.2 mg/mL) was preincubated for 15 min with carbohydrate (N-acetylglucosamine or glucose at concentrations of 25, 50, 100 and 200 mM and fructose at concentrations of 50, 100 and 200 mM) or ions (calcium chloride or magnesium chloride at 20 mM) prior to incubation with the kaolin suspension. Control experiments were performed by incubating kaolin suspension with 200 mM carbohydrate or 20 mM ion solutions.

2.9 Evaluation of coagulant activity by measurement of electrical resistance

A coagulant assay on kaolin model was prepared as described in section 2.8 and the electrical resistance was determined at time zero and every 10 min during 90 min. The analyzes were performed using electric means of a Keithley Model 2400 multimeter associated with a platinum electrode parallel plate immersed in deionized water and subjected to a potential range of 0 to 10 V. To perform electrical measurements, the residual particles of parallel plate electrodes were removed by chloroform (CHCl_3) solution. For the analysis the

electrode was immersed in the coagulant systems SE (0.015 mg/mL)-kaolin, SE (1.6 mg/mL)-kaolin, WSMoL (0.2 mg/mL)-kaolin and alum (0.015 mg/mL)-kaolin. The electrical resistance was also evaluated in systems containing WSMoL and carbohydrates or ions.

2.10 Statistical analysis

Standard deviations (SD) were calculated using GraphPad Prism version 4.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, California, USA), and data were expressed as a mean of replicates $\pm$ SD. Significant differences between treatment groups were analysed by the Student's t-test (significance at $p < 0.05$) using the Origin 6.0 program.

3. Results and discussion

WSMoL was isolated from *M. oleifera* seed extract by ammonium sulphate precipitation followed by chitin chromatography, according to the procedure described by Coelho et al. (2009). Native molecular mass of WSMoL determined by gel filtration was 59.4 kDa (Figure 1A) and SDS-PAGE revealed the presence of three polypeptide bands with molecular masses 30, 20 and 10 kDa (Figure 1B). Coelho et al. (2009) detected a single polypeptide band of 5 kDa for WSMoL on SDS-PAGE under reducing conditions and thus the molecular mass of 59.4 kDa reveals that native WSMoL is a molecular arrangement of 5 kDa subunits. Probably the three peptides detected on SDS-PAGE under non-reducing conditions correspond to partial unfolding of 59.4 kDa oligomer since SDS disrupts non-covalent interactions in protein structure unfolding it in constituent subunits (Paiva et al., 2011).

Isoelectric focusing revealed a single protein band with pI 5.5. This datum is in agreement with the anionic nature of WSMoL reported by Paiva et al. (2011) using native PAGE.

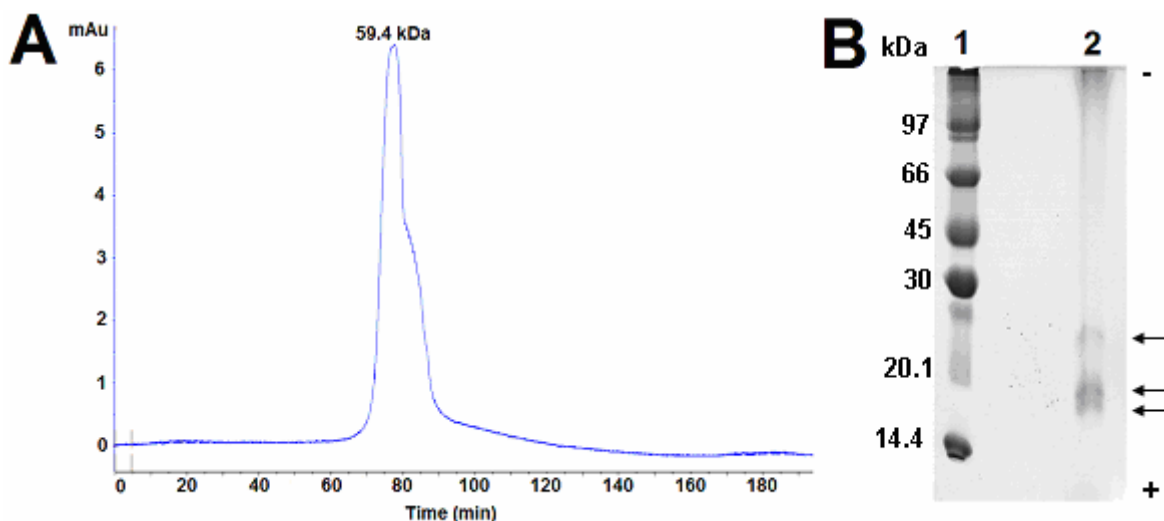


Figure 1. Characterization of WSMoL. (A) Gel filtration chromatography of WSMoL on a Hipep 16/60 Sephacryl S-300 column coupled to Äkta Prime system. Sample (0.4 mg) was injected and eluted (2.0 mL fraction) with 0.15 M NaCl. (B) SDS-PAGE of WSMoL stained with Coomassie Brilliant Blue.

The coagulant activities of SE (protein concentration of 0.015 and 1.6 mg/mL), WSMoL (0.2 mg/mL) and the positive control alum (0.015 mg/mL) were evaluated by determining the kinetic of decrease in optical density (Figure 2A) and electric resistance (Figure 2B) of kaolin suspension during 90 min. The data show that only SE at 1.6 mg/mL did not promote significant reduction ($p > 0.05$) of optical density and electric resistance in regard to negative control. This result was probably linked to a high intrinsic turbidity of the extract at this concentration as well as a high protein concentration increasing electric resistance. Precipitates were formed during the coagulation analysis of all the analyzed systems.

After 90-min incubation, WSMoL reduced the optical density from 2.5 ± 0.0 to 0.260 ± 0.03 (Figure 2A) and the electric resistance from $10.45 \pm 0.0 \Omega$ for $3.15 \pm 0.03 \Omega$ (Figure 2B). The comparison of kinetic curves of coagulant activity of the lectin and SE at 0.015

mg/mL indicates no significantly difference ($p < 0.05$) evidencing the best efficiency of extract since it showed the same effect even at a concentration about 13-times lower than that of WSMoL. This result may be linked to the presence in SE of others coagulant proteins and organic polyelectrolytes present in *M. oleifera* seeds (Santos et al., 2009; Ferreira et al., 2011) at concentrations enough to exert coagulant effect without increase electric resistance.

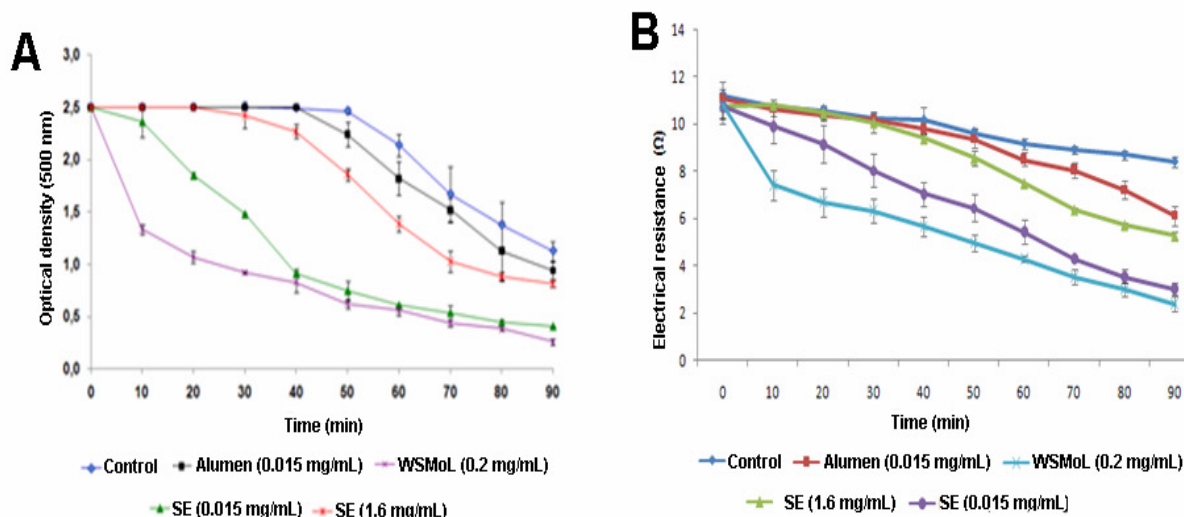


Figure 2. Coagulant activity of SE, WSMoL and alum (positive control) on kaolin suspension model. The absorbance (optical density) at 500 nm (A) and electrical resistance (B) were evaluated. Negative control corresponded to the suspension of kaolin. The values are represented as the mean of three experiments $\pm$ standard deviation.

The results found here are in accordance with those reported by Ferreira et al. (2011) which detected coagulant activity for WSMoL using kaolin suspension as a model for turbid water. However the mechanism of coagulation by WSMoL was not defined. Coagulation mechanisms dominate the performance of subsequent attachment of the coagulant agent on microparticle suspensions. Since both optical density (absorbance) and electric resistance measurements were sensitive to coagulation phenomenon by WSMoL, it is worthy to note that this process may involve a first destabilization of the particles suspension and is probably controlled by chemical interactions between the coagulant protein and contaminant molecules. The second step is correlated to the WSMoL-particles complex formation.

Studies on coagulation mechanisms have shown that interaction with divalent cations, charge neutralization as well as reduction of the repulsive forces between the particles may be involved in the reduction of turbidity by preparations of *M. oleifera* seeds (Okuda et al., 2001; Santos et al., 2009).

Further investigations were performed in order to provide a better understanding of the action mechanism regarding WSMoL coagulant activity. Since the lectin-carbohydrate interaction is a common phenomenon in biological systems, the involvement of the carbohydrate-binding sites of the lectin on coagulant activity was studied. For this the sugar effect on the coagulation efficiency of WSMoL was investigated at constant sugar molar concentrations for *N*-acetyl glucosamine, glucose and fructose, which are monosaccharides previously reported by Paiva et al. (2011) and Rolim et al. (2011) to be able of inhibiting hemagglutinating activity of WSMoL. To select carbohydrate concentrations that have effect on carbohydrate-binding ability, a screening was performed by determining the effects of these monosaccharides at 25, 50, 100 and 200 mM on WSMoL hemagglutinating activity. The results are summarized in Table 1 and showed that only 25 mM fructose did not inhibit agglutination of erythrocytes by WSMoL. Thus only this fructose concentration was not used in the coagulant activity assay.

Table 1. WSMoL specific haemagglutinating activity in the presence of N-acetylglucosamine, glucose and fructose in concentrations of 25, 50, 100 and 200 mM.

Monosaccharide	SHA
N-acetylglucosamine	
25 mM	20.480
50 mM	20.480
100 mM	10.240
200 mM	10.240
Glucose	
25 mM	20.480
50 mM	20.480
100 mM	10.240
200 mM	5.120
Fructose	
25 mM	40.960
50 mM	20.480
100 mM	10.240
200 mM	10.240
SHA de WSMoL in NaCl 0,15 M: 40.960	

The coagulant activity of WSMoL in presence of the tested carbohydrates resulted in significant ($p < 0.05$) reduction of coagulant activity (Figures 3, 4 and 5). The optical densities and the electric resistances determined in suspension from coagulant assay using WSMoL previously incubated with the monosaccharides at 200 mM were not significant different ($p > 0.05$) than negative control revealing that the coagulant activity was neutralized. WSMoL-*N*-acetylglucosamine system demonstrated the highest coagulation inhibition effect as compared with others sugars (glucose and fructose).

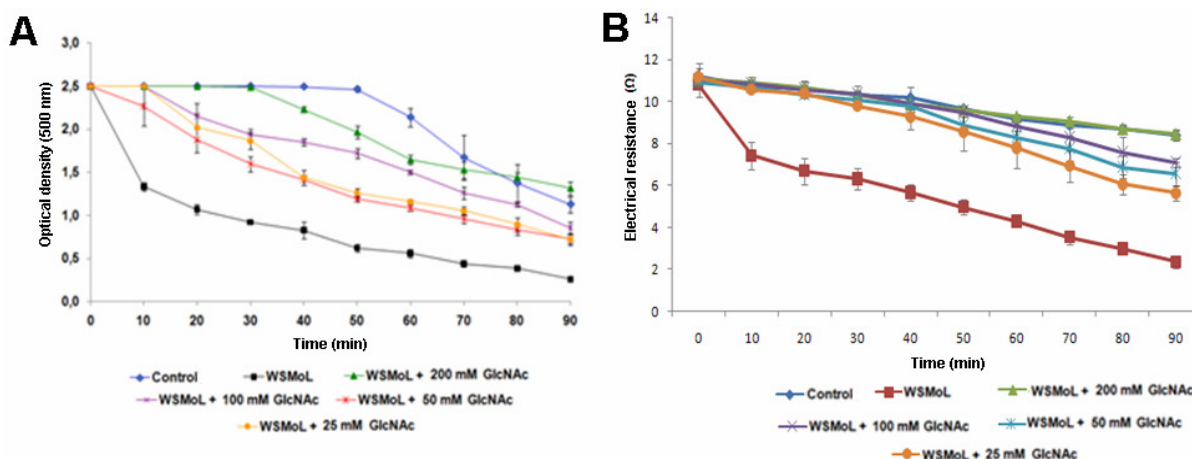


Figure 3. Coagulant activity of WSMoL in presence of *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) at different concentrations using kaolin suspension model. The absorbance (optical density) at 500 nm (A) and electrical resistance (B) were evaluated. Negative control corresponded to the suspension of kaolin. The values are represented as the mean of three experiments $\pm$ standard deviation.

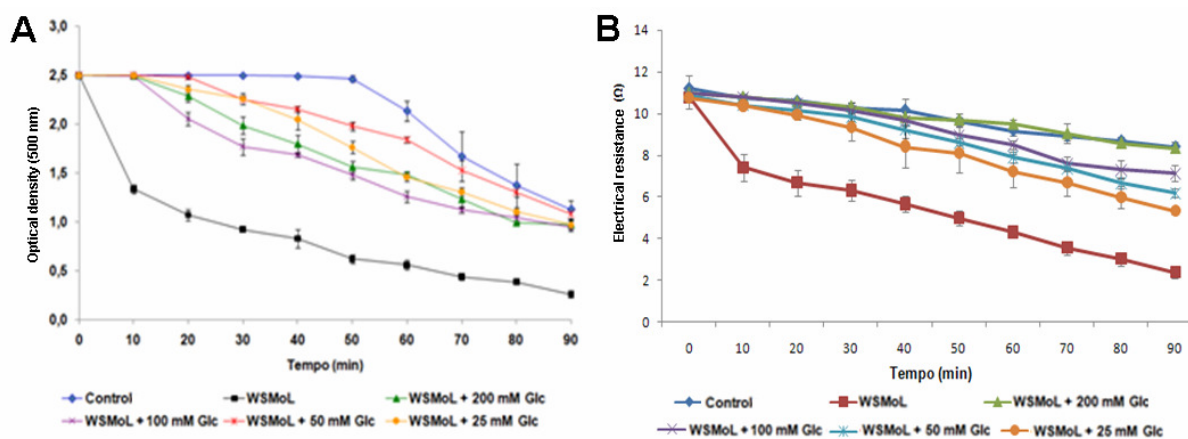


Figure 4. Coagulant activity of WSMoL in presence of glucose (Glc) at different concentrations using kaolin suspension model. The absorbance (optical density) at 500 nm (A) and electrical resistance (B) were evaluated. Negative control corresponded to the suspension of kaolin. The values are represented as the mean of three experiments $\pm$ standard deviation.

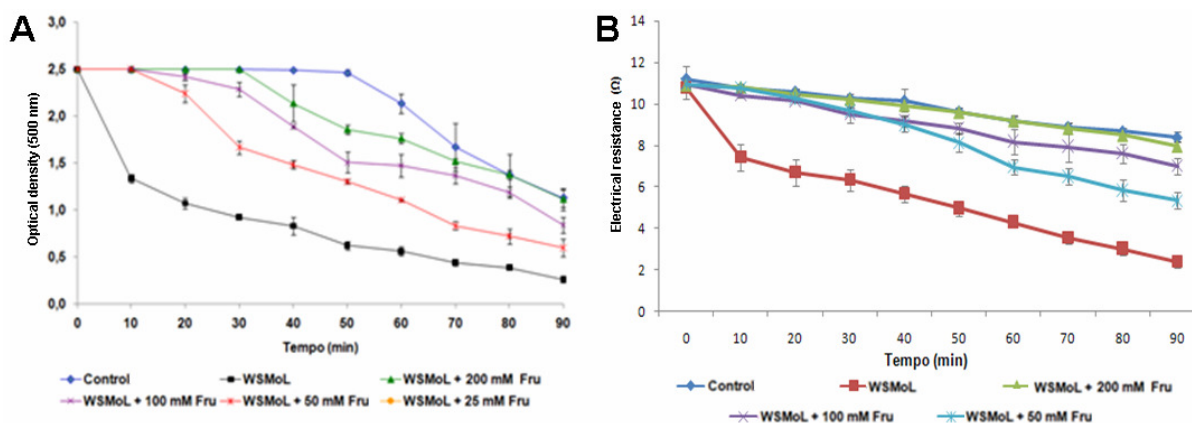


Figure 5. Coagulant activity of WSMoL in presence of fructose (Fru) at different concentrations using kaolin suspension model. The absorbance (optical density) at 500 nm (A) and electrical resistance (B) were evaluated. Negative control corresponded to the suspension of kaolin. The values are represented as the mean of three experiments $\pm$ standard deviation.

Aiming to investigate whether the decrease in turbidity of kaolin suspension was due to interference of monosaccharides on WSMoL coagulant activity or only due to increase of turbidity due to carbohydrate presence, controls were performed by monitoring the optical density after addition of solutions containing only the monosaccharides fructose, glucose and *N*-acetylglucosamine to kaolin suspension. Interestingly the monosaccharides promote reduction of the absorbance at 500 nm (Figure 6) indicating that they exerted a coagulant effect on kaolin model. This result indicates that the lower decrease of optical density observed when WSMoL-monosaccharide systems were evaluated was probably due to lectin-carbohydrate interaction reducing the coagulant effects of both lectin and monosaccharide.

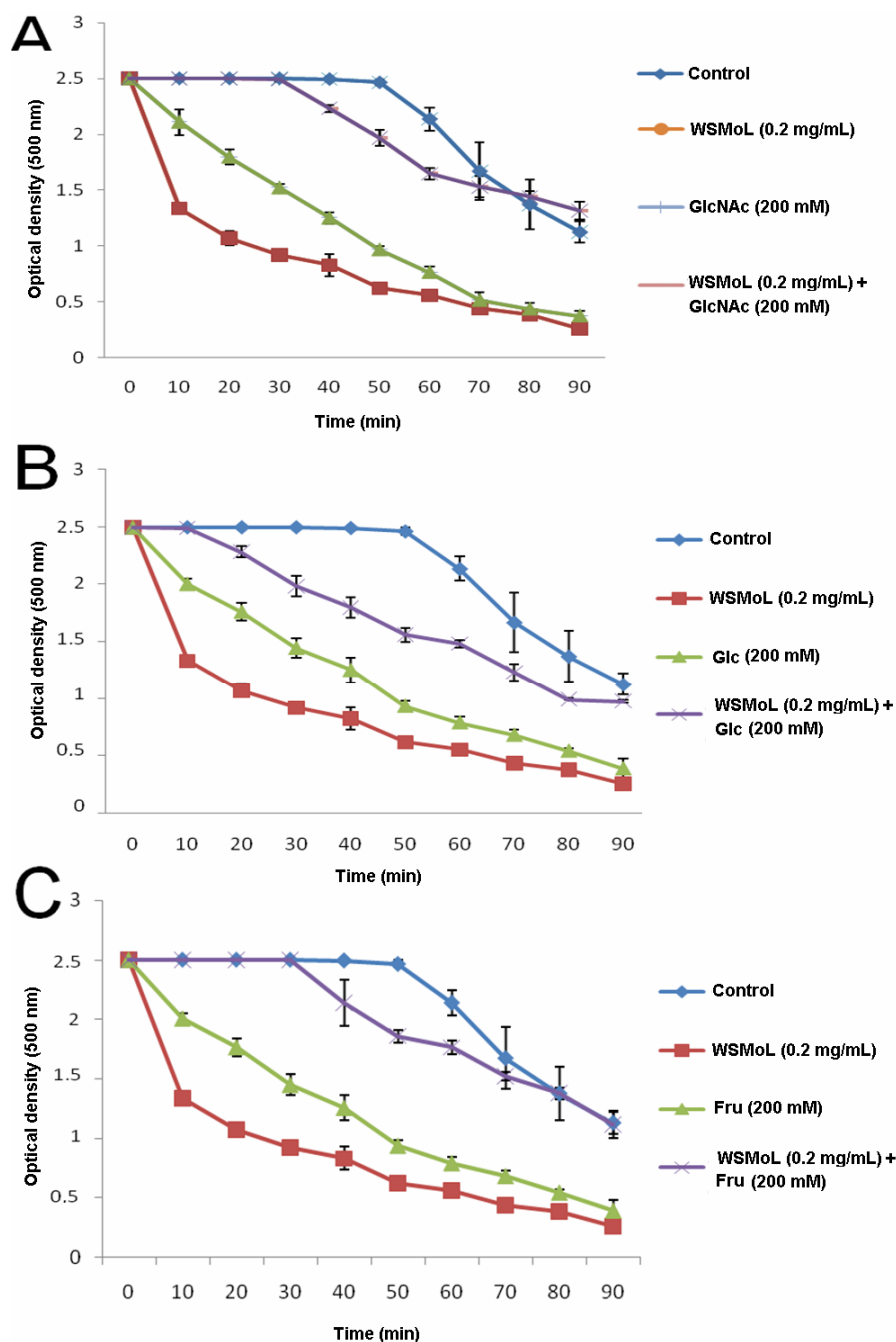


Figure 6. Coagulant activity of WSMoL as well as monosaccharides *N*-acetylglucosamine (A), glucose (B) and fructose (C) at 200 mM in presence and absence of lectin. The absorbance (optical density) at 500 nm was evaluated. Negative control corresponded to the suspension of kaolin. The values are represented as the mean of three experiments $\pm$ standard deviation.

Divalent cations such as Ca^{2+} and Mg^{2+} may be required inside carbohydrate-binding sites of lectin and/or may alter protein conformation and consequently its activity (Hosoy et al., 1998; Ambrosi et al., 2005). Because of this and the fact that Ferreira *et al.* (2011)

reported increase of WSMoL hemagglutinating activity after incubation with Mg^{2+} at 20 and 30 nM, it was investigated whether Ca^{2+} and Mg^{2+} ions would affect the coagulant ability of WSMoL.

First hemagglutinating activity in presence of calcium chloride or magnesium chloride (20 mM) was performed. The specific hemagglutinating activity of WSMoL in presence of Ca^{2+} and Mg^{2+} increased from 40,960 to 163,840 and 81,920, respectively. Control assays showed that the ion solutions tested did not promote any agglutination or dispersion of erythrocytes assuring that there was a stimulant effect of WSMoL hemagglutinating activity.

In coagulant assay the reduction of optical density by WSMoL in presence of calcium chloride or magnesium chloride at 20 mM was significantly ($p < 0.05$) lower than that promoted by lectin without addition of ions (Figure 7A). In addition it was observed significant effect ($p > 0.05$) on the electric resistance of the medium (Figure 7B). Controls using solution containing only the ions have effect on optical density (Figure 8). The results show that the presence of bivalent ions was damaging for coagulant ability of WSMoL.

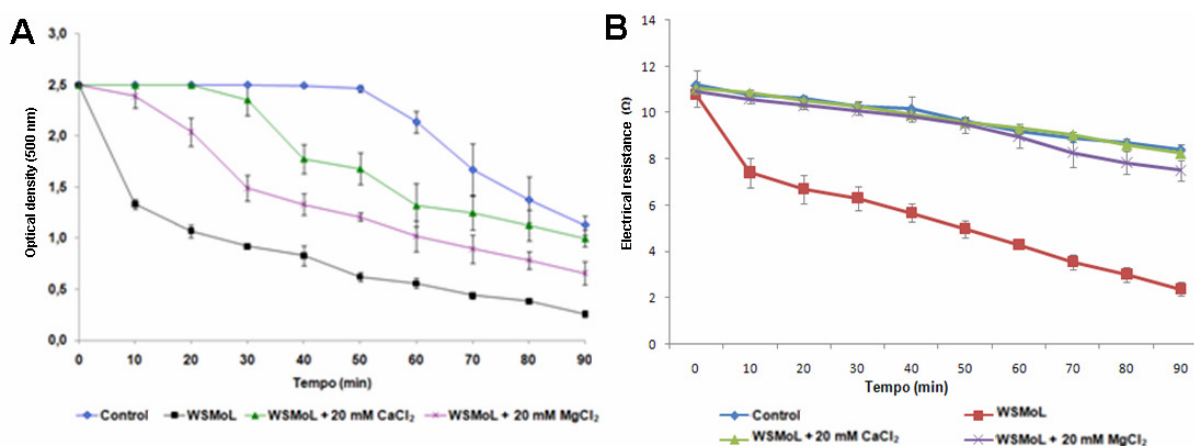


Figure 7. Coagulant activity of WSMoL in presence of calcium or magnesium chlorides at 20 mM using kaolin suspension model. The absorbance (optical density) at 500 nm (A) and electrical resistance (B) were evaluated. Negative control corresponded to the suspension of kaolin. The values are represented as the mean of three experiments $\pm$ standard deviation.

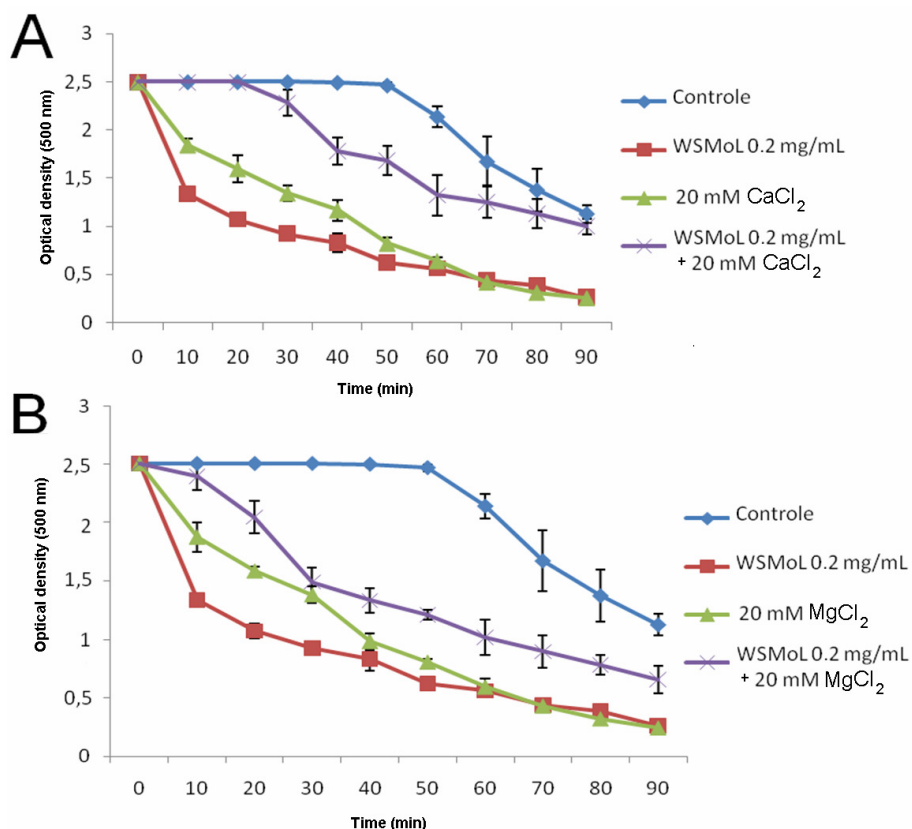


Figure 8. Coagulant activity of WSMoL as well as of calcium (A) and magnesium (B) chlorides at 20 mM in presence and absence of lectin. The absorbance (optical density) at 500 nm was evaluated. Negative control corresponded to the suspension of kaolin. The values are represented as the mean of three experiments $\pm$ standard deviation.

Since the hemagglutinating activity of WSMoL was stimulated by ions while coagulant activity was reduced it is possible that the cations induced conformational changes in WSMoL that favored the binding to carbohydrates from erythrocyte surface but impaired interaction with suspended kaolin particles.

Santos et al. (2011) suggested that coagulant activity of a *M. oleifera* seed extract was due to adsorption and neutralization of charges. It is plausible that the addition of divalent cations to the medium leads to a change on surface charge of WSMoL interfering with its interaction with the suspended particles. It should be highlighted that WSMoL is an anionic protein, differently from other coagulant proteins from *M. oleifera*, which are cationic. In this sense the positive charge of divalent cations may be interacting with the predominant negative

charges on WSMoL surface impairing its ideal conformation or liquid charge that allows the coagulant action. Interestingly, the effects of divalent cations on coagulant activity cationic components of *M. oleifera* seeds were distinct from that of WSMoL since the coagulant activity of a salt-extracted coagulant was linked to interaction with divalent cations while ions Ca^{+2} and Mg^{+2} did not improve the coagulant efficiency of cMoL (a cationic lectin) but also not reduced it (Okuda et al., 2001; Santos et al., 2009).

4. Conclusions

Native WSMoL is an anionic protein whose structure is molecular arrangement formed by 5 kDa subunits. The remarkable reduction in absorbance and electrical resistance of kaolin suspension when treated with WSMoL can be connected to destabilization of suspended particles followed by chemical interactions between the particles and lectin and thus the formation of complexes WSMoL-particles. Despite favoring WSMoL binding to carbohydrates on erythrocytes surface the ions Ca^{2+} and Mg^{2+} damaged its coagulant activity.

Acknowledgments

The authors express their gratitude to the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq) for research grants and fellowships (L.C.B.B. Coelho and P.M.G. Paiva), *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES), and *Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco* (FACEPE) for research grants. K.S. Moura would like to thank CNPq for graduate scholarship.

References

- Ambrosi, A., Antiochia, R., Campanella, L., Dragone, R., Lavagnini, I. 2005. Electrochemical determination of pharmaceuticals in spiked water samples *Journal of Hazardous Materials* 122, 219-225.
- Bolto, B., Gregory, J. 2007. Organic polyelectrolytes in water treatment. *Water Research* 41, 2301-2324.
- Budd, G.C., Hess, A.F., Shorney-darby, H., Neemann, J.J., Spencer, C. M., Bellamy, J.D., Hargette, P.H. 2004. Coagulation applications for new treatment Goals. *American Water Works Association* 92, 102-113.
- Carvalho, Maria José Herkenhoff. 2008. Use of the natural clotting process of obtaining drinking water. Dissertation. University of Maringá, p. 23.
- Coelho, J.S., Santos, N.D.L., Napoleão, T.H., Gomes, F.S., Ferreira, R.S., Zingali, R.B., Coelho, L.C.B.B., Leite, S.P., Navarro, D.M.A.F., Paiva, P.M.G. 2009. Effect of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of *Aedes aegypti* larvae. *Chemosphere* 77, 934-938.
- Cubas, A. L. Y. 1999. Flocculation in expanded granular media. Dissertation. Environmental Engineering, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis.
- Di Bernado, L., Dantas, A.D.B. 2005 *Methods and techniques of water treatment.*, Rima Publisher, São Carlos, SP, 2.
- Duan, J., Gregory, J. 2006. Coagulation by hydrolysing metal salts. *Advances in Colloid and Interface Science* 100, 102-475.
- Ferreira, S. S. F. 1997. Chemical behavior of aluminum and iron in the aqueous medium and implications for the treatment of water. Sanare, SP, 2.
- Ferreira, R.S., Napoleão, T.H., Santos, A.F.S., Sá, R.A., Carneiro-da-Cunha, M.G., Morais, M.M.C., Silva-Lucca, R.A., Oliva, M.L.V., Coelho, L.C.C.B., Paiva, P.M.G. 2011.

- Coagulant and antibacterial activities of the water-soluble seed lectin from *Moringa oleifera*, Letters in Applied Microbiology 53, 186-192.
- Gassenschmidt, U., Jany, K.D., Tauscher, B., Niebergall, H. 1995. Isolation and characterization of a flocculating protein from *Moringa oleifera* Lam. Biochimica et Biophysica Acta 1243, 477-481, 1995.
- Ghebremichael, K.A., Gunaratna, K.R., Henriksson, H., Brumer, H., Dalhammar, G. 2005. A simple purification and activity assay of the coagulant protein from *Moringa oleifera* seed. Water Research 39, 2338-2344.
- Green, A.A., Hughes, W.L. 1955 Protein solubility on the basis of solubility in aqueous solutions of salts and organic solvents. Methods in Enzymology 1, 67-90.
- Hassemer, M. E. N. 2000. Treatment of textile effluent physicochemical process with ozone and flocculation in granular media. Dissertation. Environmental Engineering. Federal University of Santa Catarina. Florianópolis .
- Hosoi H., Imaizumi S., Sakaguchi T., Tonoike, M., Murata, K. 1998. Activation of the auditory cortex by ultrasound. The Lancet 51, 496–497.
- Jarvis, P., Martin, J., Winspea, T., Jefferson, B. 2006. Ballasted flotation with glass microspheres for removal of natural organic matter. Separation Science and Technology 46, 2489-2495.
- LaemmliA, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680–685.
- Makkar, H.P.S., Becker, K. 1997. Nutrients and antiquality factors in different morphological parts of the *Moringa oleifera* tree. Journal of Agricultural Science 2, 331-322.
- Mikeska, K., Cannon,W. R. 1984. Dispersants for Tape Casting Pure Barium Titanate.. Advances in Ceramics 9, 164-183.

- Ndabigenegesere, A., Narasiah, K.S., Talbot, B.G. 1995. Active agents and mechanism of coagulation of turbid waters using *Moringa oleifera*. Water Research 29, 703-710.
- Okuda, T., Baes, A.U., Nishijima, W., Okada, M. 2001. Isolation and characterization of coagulant extracted from *Moringa oleifera* seed by salt solution. Water Research 35, 405-410.
- Paiva, P.M.G., Coelho, L.C.B.B. 1992. Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (camaratu bean). Applied Biochemistry and Biotechnology 36, 113-118.
- Paiva, P.M.G., Santana, G.M.S., Souza, I.F.A.C., Albuquerque, L.P., Agra-Neto, A.C., Albuquerque, A.C., Luz, L.A., Napoleão, T.H., Coelho, L.C.B.B. 2011. Effect of lectins from *Opuntia ficus indica* cladodes and *Moringa oleifera* seeds on survival of *Nasutitermes corniger*. International Biodeterioration & Biodegradation 65, 982-989.
- Ramos, R. O. 2005. Clarification of water with low turbidity and color using moderate seeds of *Moringa oleifera* Lam, Master Thesis. State University of Campinas, São Paulo.
- Rolim, L.A.D.M.M., Macedo, M.F.S., Sisenando, H.A., Napoleão, T.H., Felzenszwalb, I., Aiub, C.A.F., Coelho, L.C.B.B., Medeiros, S.R.B., Paiva, P.M.G. 2011. Genotoxicity evaluation of *Moringa oleifera* seed extract and lectin. Journal of Food Science 76, T53-T58.
- Santos, A.F.S., Luz, L.A., Argolo, A.C.C., Teixeira, J.A., Paiva, P.M.G., Coelho, L.C.B.B. 2009. Isolation of a seed coagulant *Moringa oleifera* lectin. Process Biochemistry 44, 504-508.
- Yu, J.F., Wang, D.S., Yan, M.Q., Ye, C., Yang, M., Ge, X. 2007. Optimized Coagulation of High Alkalinity, Low Temperature and Particle Water: pH Adjustment and Polyelectrolytes as Coagulant Aids. Environmental Monitoring and Assessment 131, 377-386.

6. CONCLUSÕES

- O extrato de sementes de *M. oleifera*, por conter uma mistura de agentes coagulantes, revelou ser mais eficiente na remoção de partículas coloidais do que WSMoL isolada.

- WSMol nativa é uma proteína aniônica cuja estrutura é um arranjo molecular formado por subunidades de 5 kDa.

- O mecanismo da ação coagulante de WSMoL provavelmente está ligado a um processo de desestabilização da suspensão de partículas, seguido de interações químicas entre a proteína e as partículas e consequente formação de complexos, resultando em redução da turbidez e resistência elétrica do meio aquoso.

- A presença de carboidratos inibidores da AH de WSMoL no meio aquoso resulta em diminuição da atividade coagulante tanto dos açúcares quanto da lectina.

- Apesar de favorecerem a ligação de WSMoL aos carboidratos presentes na superfície dos eritrócitos, cátions Ca^{2+} e Mg^{2+} prejudicaram sua atividade coagulante em modelo de água turva com caolin.