

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

**PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE
ATIVIDADE COAGULANTE DA LECTINA DE SEMENTES DE *Moringa*
*oleifera***

Luciana de Andrade Luz

Orientadora: Profa. Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho
Co-orientadora: Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva

Recife, 2009

Luciana de Andrade Luz

**PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE
ATIVIDADE COAGULANTE DA LECTINA DE SEMENTES DE
*Moringa oleifera***

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Bioquímica e
Fisiologia da Universidade Federal de
Pernambuco para o cumprimento
parcial das exigências na obtenção do
título de Mestre.

Recife, agosto de 2009

Luz, Luciana de Andrade

Purificação, caracterização e determinação de atividade coagulante da lectina de sementes de *Moringa oleifera* / Luciana de Andrade Luz. – Recife: O Autor, 2009.

vi, 37 folhas : il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Bioquímica e Fisiologia, 2009.

Inclui bibliografia.

1. Proteínas 2. Lectinas 3. *Moringa oleifera* 4. Atividade hemaglutinante 4. Atividade coagulante I Título.

572.6 CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2009-162

LUCIANA DE ANDRADE LUZ

“Purificação, caracterização e determinação de atividade coagulante da lectina de sementes de *Moringa oleifera*”

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

Aprovado por: 
Adriana Paula Cavalcante Malta Aguiar
Therese Correia
Vera Lucia M. Lima

Data: 24 / 08 / 2009

*Ultrapassa-te a ti mesmo a cada dia, a cada
instante ... Não por vaidade, mas para
corresponderes à obrigação sagrada de
contribuir sempre mais e sempre melhor, para
a construção do Mundo...*

Dom Helder Câmara

INDICE

AGRADECIMENTOS	I
LISTA DE FIGURAS	II
LISTA DE TABELAS	III
LISTA DE ABREVIATURAS	IV
RESUMO	V
ABSTRACT	VI
1. INTRODUÇÃO	7
1.1 Lectinas	7
1.1.1 Breve histórico	8
1.1.2 Detecção e especificidade	8
1.1.3 Purificação e caracterização de lectinas	9
1.1.4 Aplicações biotecnológicas das lectinas	12
2. <i>Moringa oleifera</i>	13
2.1 Coagulantes de <i>Moringa oleifera</i>	14
2.2 Compostos coagulantes na água	16
2.3 Tratamento de água	17
3. OBJETIVOS	
3.1 Objetivo geral	19
3.2 Objetivos específicos	19
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20
5. ARTIGO PUBLICADO: Isolation of a seed coagulant <i>Moringa oleifera</i> lectin	31
6. CONCLUSÕES	37

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser a fonte de vida, esperança, alegria e coragem para realização de todas as obras em minha vida e por ter me dado tantas oportunidades e bênçãos.

Aos meus amados pais, Manoel e Bernadete, ao meu irmão, Rafael, e ao meu namorado Rodrigo pelo incentivo, confiança, amor e carinho dados durante toda minha vida. Por acreditar nos meus propósitos e me apoiar sempre em tudo. Sem eles minha vida não teria sentido. Obrigada por tudo! Deus abençoe a nossa família!

A Profa. Dra. Luana Cassandra B. B. Coelho pela orientação científica, oportunidades, apoio, confiança e sinceridade estabelecida durante este período de convivência.

A Dra. Andréa de Fátima Silva Santos pela maravilhosa colaboração, pelo carinho, amizade, dedicação, conselhos e experiências trocadas. Você é um grande exemplo de determinação e simplicidade que vou levar para sempre. Deus me deu um presente maravilhoso!

A Dra. Adriana Argolo pelo carinho, ajuda e ensinamentos dados durante a realização deste trabalho.

A todos os funcionários e professores do Departamento de Bioquímica da UFPE, Neide, Miron, Djalma, e em especial a Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva, pela amizade, carinho e profissionalismo dentro e fora da Universidade. Obrigada pela preciosa co-orientação!

Aos funcionários e colegas do Departamento de Bioquímica da UFPE: Maria Reis e João Virgínio pela ajuda e carinho.

A todos que fazem parte do Laboratório de Glicoproteínas do Departamento de Bioquímica: Sandro, Carlinhos, Lidiane, Gisele, Emanuel, Tati, Francis, Nataly, Tâmarah, Thamara, Cinarha, Mércia pelo companheirismo e agradável convivência durante este período. Obrigada por tornar nossos dias mais leves!

Aos amigos Fernando, Felipe e Thiago pela ajuda incondicional de sempre. Obrigada por me socorrer nas horas mais difíceis! Obrigada pela doação de conhecimento e informação sem medo!

As amigas Andréa e Cecília que desde a graduação fazem parte de minha vida e compartilham comigo o meu dia-a-dia longe ou perto.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para esta conquista.

LISTA DE FIGURAS

Dissertação

Figura 1. Representação esquemática da aglutinação de eritrócitos por lectina	8
Figura 2. Inibição da aglutinação de eritrócitos por lectinas em presença de carboidratos.	9
Figura 3. Aspectos de vagem, sementes, flores e folhas de <i>M. oleifera</i> .	14
Figura 4. Esquema do sistema de tratamento de água.	17

Artigo publicado

Figure 1. (A) cMoL purification on a guar gel affinity column. (B) cMoL native molecular weight determination by gel filtration chromatography on a Sephacryl S-300 column. (C) Coagulation activities of cMoL and lectin preparations with kaolin clay (10 g/L).	34
Figure 2. SDS-PAGE of lectin (100 mg) treated and untreated with b-mercapthoethanol and PAGE showing purified native and basic cMoL.	35

LISTA DE TABELAS

Artigo publicado

Table 1. Protein concentrations and specific hemagglutinating activities of tissue extracts from <i>Moringa oleifera</i> .	33
Table 2. Summary of cMoL purification.	34
Table 3. Inhibition hemagglutinating activity of tissue extracts and cMoL by carbohydrates and glycoproteins.	34

LISTA DE ABREVIATURAS

AH: Atividade Hemaglutinante

AHE: Atividade Hemaglutinante Específica

CM-Cellulose: Carboximetil-celulose

DEAE-Cellulose: Dietilaminoetil-celulose

ETA: Estação de Tratamento de Água

pI: Ponto isoelétrico

pH: Potencial hidrogeniônico

cMoL: Lectina coagulante de *Moringa oleifera*

SDS: Sulfato sódico de dodecila

SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS

NTU: Unidade Nefelométrica de Turbidez

RESUMO

Moringa oleifera é uma planta tropical com grande importância econômica e de usos industriais e medicinais. Diferentes partes da planta são aplicadas e o extrato de sementes é comumente usado na purificação de água para consumo humano. Lectinas são proteínas ou glicoproteínas de origem não-imune que se ligam bioespecificamente a carboidratos, com capacidade de aglutinar células de forma reversível; extração e purificação dessas biomoléculas permite sua aplicação no âmbito biotecnológico. O objetivo deste trabalho foi investigar a atividade hemaglutinante (AH) em extratos de diferentes tecidos de *M. oleifera*, purificar e caracterizar uma lectina de sementes com propriedades coagulantes (cMoL). AH foi detectada em extratos salinos (NaCl 0,15 M) de flores e raques da inflorescência (5 %, p/v), sementes, folhas e tecido fundamental do tronco e casca do tronco (10 %, p/v). cMoL isolada após extração salina e cromatografia em gel de guar foi ativa na faixa de pH de 4 a 9, termoestável a 100 °C durante 7 h e aglutinou eritrócitos de coelho e humanos. AH dos extratos dos tecidos e de cMoL foi inibida por carboidratos; azocaseína e asialofetúina aboliram a AH de cMoL. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições redutoras revelou uma banda polipeptídica principal de 26.5 kDa; cMoL nativa é uma proteína básica e foi purificada como uma única banda. A verificação da propriedade coagulante foi realizada utilizando-se uma suspensão de caolin em água (10 g/L) e leitura espectrofotométrica de absorbância a 500 nm. Preparações de sementes e cMoL apresentaram atividade coagulante similar ao sulfato de alumínio, o coagulante sintético mais utilizado no tratamento da água em todo o mundo; após o aquecimento de cMoL não foram observadas diferenças significativas na coagulação. Em conclusão, lectinas estão presentes em diferentes tecidos de *M. oleifera*; preparações lectínicas de sementes e cMoL podem ser aplicadas no tratamento de água para consumo humano.

Palavras-chaves: *Moringa oleifera*, atividade hemaglutinante, lectina, atividade coagulante.

ABSTRACT

Moringa oleifera is a tropical plant of great economic importance with several industrial and medicinal applications. Many parts of the plant are used and the seed extract is commonly employed for water purification to human consumption. Lectins are proteins or glycoproteins of nonimmune origin, which bind carbohydrates bioespecifically with agglutinant cell capacity of a reversible way; extraction and purification of biomolecules allow its application within biotechnology. The aim of this work was to investigate hemagglutinating activity (HA) in distinct *M. oleifera* tissue extracts, to purify and characterize a new seed lectin with coagulant properties (cMoL). HA was detected in 0.15 M NaCl extracts from flowers and rachis inflorescence (5%, w/v), seeds, leaves, fundamental tissue of stem and steam bark (10%, w/v). cMoL isolated after saline extraction and guar gel column chromatography was active at pH range 4.0–9.0, thermostable at 100 °C during 7 h and agglutinated erythrocytes from rabbit and human blood types. Extracts of tissues and cMoL activities were carbohydrate inhibited; azocasein and asialofetuin abolished cMoL HA. Polyacrylamide gel electrophoresis under reduced conditions revealed a main polypeptide band of 26.5 kDa; native basic cMoL was purified as a unique band. The evaluation of coagulant property was performed through a kaolin suspension in water (10 g/L) and absorbance was measured at 500 nm using a spectrophotometer. Seed lectin preparations and cMoL showed coagulant activity similar to aluminium sulphate, the most common synthetic coagulant used in water treatment all over the world; after heating cMoL showed no significant differences in coagulation. In conclusion, lectins are present in different tissues of *M. oleifera*; preparation of seed lectins and cMoL can be applied in water treatment for human consumption.

Palavras-chaves: *Moringa oleifera*, hemagglutinating activity, lectin, coagulant activity.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Lectinas

1.1.1 Breve histórico

O primeiro relato sobre lectinas foi descrito por Peter Herman Stillmark em 1888, a partir de uma preparação protéica parcialmente purificada, obtida de *Ricinus communis* (mamona), a qual denominou ricina; a preparação continha uma proteína tóxica que aglutinava eritrócitos (Peumans e Van damme, 1998). O exato delineamento do que vem a ser lectinas tem sido tema de longa controvérsia, uma vez que numerosas proteínas com diferentes formas moleculares e especificidades foram classificadas juntas, ao longo dos anos, com base em um só parâmetro, a aglutinação de células.

Dessa maneira, em 1954, Boyd e Shapleigh propuseram o termo lectina (do latim *lectus*, que significa selecionado, escolhido) para designar o grupo de proteínas que apresenta a característica comum de seletividade na interação com carboidratos. Hoje a definição mais utilizada para lectinas, baseada em suas estruturas, é a de que são proteínas ou glicoproteínas de origem não imune possuidoras de pelo menos um domínio não-catalítico que se liga reversivelmente a monossacarídeos ou oligossacarídeos específicos (Peumans e Van damme, 1995), aglutinam células vegetais ou animais, precipitam polissacarídeos, glicoproteínas ou glicolipídeos (Goldstein *et al.*, 1980). Embora tenham sido descritas por volta do século XIX, somente em 1960 elas tornaram-se objetos de intensas pesquisas ao redor do mundo (Liener *et al.*, 1986).

Tais proteínas foram chamadas de hemaglutininas ou fitoaglutininas, porque eram originalmente encontradas em extratos de plantas. Hoje já se sabe que possuem ampla distribuição na natureza podendo ser encontradas em todos os reinos desde animais (Takahashi *et al.*, 2008), tendo como principal função agir no reconhecimento de moléculas dentro do sistema imune (Kilpatrick, 2002), até plantas (Tian *et al.*, 2008), bactérias (Imberty *et al.*, 2004), vírus (Song *et al.*, 2005) e fungos (Wimmerova *et al.*, 2003). O reino vegetal tem demonstrado ser grande fonte de lectinas, servindo como material principal para a purificação dessas macromoléculas, podendo ser obtidas a partir de diferentes tecidos vegetais tais como frutos (Coutiño-Rodríguez *et al.*, 2001), raízes (Naeem *et al.*, 2001), flores (Liu *et al.*, 2002), caule e folhas (Rameshwaram e Nadimpalli *et al.*, 2008) e sementes (Vega e Pérez, 2006), a qual representa uma das principais fontes. Em geral, os outros tecidos da planta apresentam menor quantidade de

lectinas que não necessariamente são idênticas em estrutura e especificidade a lectinas de sementes (Correia *et al.*, 2008).

1.1.2 Detecção e especificidade

Lectinas possuem a habilidade de induzir o fenômeno de aglutinação celular e a presença dessas proteínas é detectada através de um ensaio de hemaglutinação (Figura 1) utilizando extratos em solução salina ou tampões (Correia e Coelho, 1995; Kennedy *et al.*, 1995; Sharon e Lis, 2001). Landstein e Raubischek (1908) foram os primeiros a discutir a especificidade das lectinas, e observaram que vários extratos de sementes de legumes possuíam distintas propriedades de hemaglutinação quando o ensaio era feito com eritrócitos de diferentes animais.

Os eritrócitos podem ou não ser submetidos a tratamentos com enzimas ou com soluções químicas (glutaraldeído ou formaldeído) para que haja um aumento na sensibilidade de aglutinação por lectinas devido à estabilização das células, promovendo uma preparação padrão de eritrócitos, além de aumentar o tempo de armazenamento (Ozeki *et al.*, 1991; Coelho e Silva, 2000). A atividade das lectinas é usualmente medida pela técnica de diluições sucessivas (Guimarães-Gomes *et al.*, 2004).

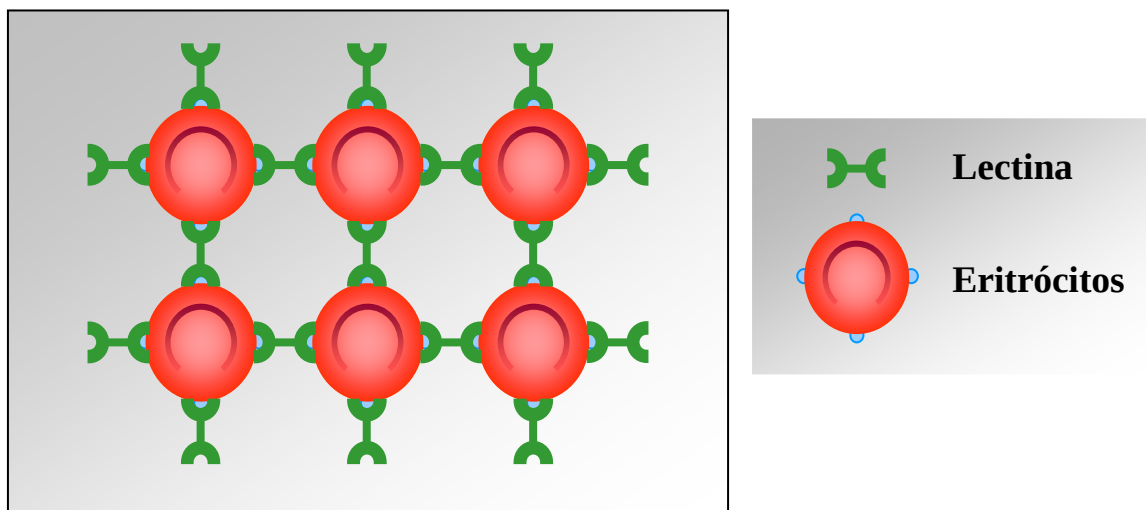


Figura 1. Representação esquemática da aglutinação de eritrócitos por lectina.

(Fonte: Fernandes *et al.*, 2006)

Somente a aglutinação de eritrócitos não é capaz de comprovar a presença de lectinas, visto que há alguns agentes como taninos, lipídeos ou cátions bivalentes que, em altas concentrações, causam aglutinação dessas células (Rüdiger, 1998). Por

possuírem a propriedade de ligação a mono, oligossacarídeos ou glicoproteínas reversível e com alta especificidade; soluções desses compostos podem ser adicionadas ao teste de atividade hemaglutinante e inibirem a ligação da lectina a carboidratos presentes na superfície das células (Figura 2) e assim induzir sua precipitação (Sharon e Lis, 1990; Boi *et al.*, 2006). Essa propriedade de ligação a açúcares confere a estas proteínas a capacidade de serem isoladas por cromatografia de afinidade em matrizes que contenham o açúcar ligante (Luck *et al.*, 1992).

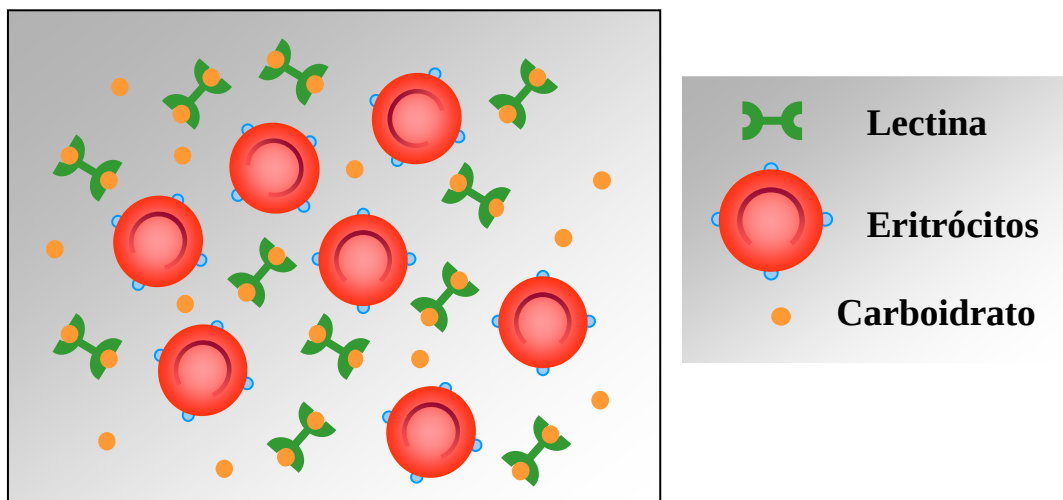


Figura 2. Inibição da aglutinação de eritrócitos por lectinas em presença de carboidratos.
(Fonte: Fernandes *et al.*, 2006)

Conforme Sharon e Lis (1990) algumas lectinas apresentam interações mais fortes com oligossacarídeos em comparação com monossacarídeos, outras são quase exclusivas para oligossacarídeos. De acordo com essas propriedades de ligação a carboidratos, as lectinas podem ser classificadas como específicas quando apresentam interação com um monossacarídeo ou não específicas quando interagem com oligossacarídeos (Goldstein e Porets, 1986). Reconhecimento de carboidratos por lectinas geralmente requer uma configuração anomérica e um resíduo de açúcar específico adjacente (Monzo *et al.*, 2007). Outro aspecto a considerar na afinidade de lectinas é interação metal-carboidrato que confere um importante papel durante o processo de ligação enquanto que outras interações com sacarídeos ocorrem na ausência de íon (Zheng *et al.*, 1997).

1.1.3 Purificação e caracterização de lectinas

O desenvolvimento de métodos para a separação e purificação de proteínas vem sendo um importante pré-requisito para muitos avanços na indústria biotecnológica. As

lectinas têm sido purificadas devido às suas diversas aplicações. A estratégia para o isolamento de lectinas depende da natureza do material biológico (sementes, líquidos corporais, homogenatos de tecidos, etc.), assim como, das propriedades exibidas pelas mesmas, como carga elétrica, tamanho, solubilidade e afinidade específica de ligação, as quais variam de uma proteína para outra. São diversas as técnicas utilizadas para eliminar moléculas que não sejam de interesse (contaminantes).

Condições de extração são definidas e envolvem a seleção do extrator, temperatura e tempo. Soluções aquosas são solventes apropriados para a extração de lectinas de sementes, uma vez que a maioria delas são solúveis em água e em solução salina (Oshikawa *et al.*, 2000; Moure *et al.*, 2001). A preparação obtida, extrato bruto, é então avaliada quanto à concentração protéica e utilizada como material inicial para o isolamento da proteína.

A partir do extrato bruto, as proteínas podem ser fracionadas por métodos tais como a precipitação seletiva de proteínas com sais (Paiva e Coelho, 1992) ou elevadas temperaturas (Bezerra *et al.*, 2001). O sulfato de amônio é o sal mais comumente utilizado (Coelho e Silva, 2000) devido à sua elevada solubilidade.

O fracionamento salino é um processo que se baseia no princípio de que a solubilidade da maioria das proteínas é diminuída em altas concentrações de sais. Esse efeito é chamado *salting-out*. Em geral as lectinas podem ser parcialmente purificadas por este processo, uma vez que o sal retira a camada de solvatação das proteínas fazendo com que as mesmas precipitem. A precipitação com sulfato de amônio pode estabilizar a atividade hemaglutinante da proteína mesmo após longos períodos de armazenamento (Kennedy *et al.*, 1995; Coelho e Silva, 2000).

A diálise separa as lectinas de moléculas pequenas através da utilização de uma membrana (celulose) semipermeável (Kabir *et al.*, 1998). As moléculas com dimensões maiores são retidas dentro do saco de diálise e as menores e os íons atravessam os poros e permanecem na solução.

Os procedimentos de purificação de lectinas geralmente envolvem técnicas cromatográficas, onde as moléculas a serem separadas distribuem-se em duas fases. A mistura protéica é dissolvida em um líquido (fase móvel) e ele é passado através de uma coluna contendo uma matriz sólida e porosa (fase estacionária). À medida que as proteínas fluem através da coluna, interagem com a fase estacionária e a eluição é retardada, dependendo das suas características estruturais. As técnicas cromatográficas utilizadas incluem cromatografia de troca iônica (Yan *et al.*, 2005), filtração em gel

(Rego *et al.*, 2002) e cromatografia de afinidade (Wong & Ng, 2006). Contudo, devido à propriedade de ligação a carboidratos, cromatografia de afinidade em colunas contendo suportes polissacarídicos (Cavada *et al.*, 1998; Machuka *et al.*, 1999) ou glicoproteínas (Nomura *et al.*, 1998; Kawagishi *et al.*, 2001) tem sido a técnica mais comumente utilizada. A cromatografia de afinidade tem como princípio de separação a habilidade das lectinas se ligarem seletiva e especificamente a suportes polissacarídicos através de ligações não covalentes. A proteína desejada é obtida com alto grau de pureza (Ye e Ng, 2002) alterando-se as condições de pH (Datta *et al.*, 2001), força iônica (Freire *et al.*, 2002) ou pela eluição com uma solução contendo um competidor pelo sítio de ligação (Paiva e Coelho, 1992). Gel de guar é um suporte muito utilizado na cromatografia de afinidade e consiste em um polissacarídeo com cadeias manose substituídas por resíduos de galactose α 1-6; é uma matriz versátil para isolamento de lectinas ligantes de D-galactopiranosil e N-acetil-galactosaminil (Coelho e Silva, 2000).

A cromatografia de troca iônica pode ser usada para separar as proteínas com cargas elétricas diferentes, uma vez que as proteínas são adsorvidas a matriz por meio das interações iônicas com o adsorvente. A quebra das interações pode acontecer por modificação do pH ou por agentes que competem pelos grupos carregados da matriz adsorvente que leva ao desprendimento de proteínas em frações distintas, dependendo da força de ligação de cada componente da amostra a matriz (Kennedy *et al.*, 1995). Como exemplos de matrizes de troca iônica podemos citar DEAE-Celulose (dietilaminoetilcelulose) e CM-Celulose (carboximetilcelulose).

A cromatografia de exclusão por tamanho, também chamada de filtração em gel, separa as proteínas de acordo com o tamanho molecular. A amostra é aplicada no topo de uma coluna constituída de grãos porosos de um polímero insolúvel, muito hidratado. As proteínas maiores migram mais rapidamente que as menores; as proteínas grandes não penetram nos poros das esferas e, assim, tomam um caminho mais direto através da coluna. Sephadex, Sepharose e Bio-gel são preparações comerciais comumente usadas neste tipo de cromatografia (Stryer, 2004).

Métodos eletroforéticos são utilizados para a caracterização estrutural de lectinas e se baseiam no princípio que uma molécula com carga elétrica líquida mover-se-á em um campo elétrico. A velocidade de migração de uma proteína depende da intensidade do campo, da carga líquida e do coeficiente de atrito. Os géis de poli(acrilamida) são meios de suporte escolhidos para eletroforese porque são quimicamente inertes e prontamente formados pela polimerização da acrilamida (Stryer, 2004). Quando

submetidos a condições desnaturantes (presença de sulfato sódico de dodecila) e redutoras (presença de β -mercaptoetanol) revelam o grau de pureza da proteína, a composição de subunidades e através de coloração específica, a natureza glicoprotéica (Coelho e Silva, 2000). A eletroforese em gel de poliacrilamida para proteínas sob condições não desnaturantes é utilizada para analisar a pureza de estruturas moleculares nativas. A eletroforese sob condições não desnaturantes caracteriza a proteína em relação à sua composição aminoacídica e a eletrofocalização define o ponto isoelétrico da proteína (Paiva e Coelho, 1992). Para caracterizar a atividade biológica da lectina avalia-se o efeito do pH, da temperatura, de íons e de inibidores na atividade hemaglutinante (Rego *et al.*, 2002).

1.1.4 Aplicações biotecnológicas das lectinas

As lectinas apresentam vasta área de aplicabilidade podendo ser ferramentas valiosas em processos biotecnológicos, nas áreas de pesquisa médica, biológica, farmacológica e bioquímica devido a sua capacidade para ligar especificamente carboidratos podendo agir como moléculas de reconhecimento dentro das células, na superfície celular e em fluídos fisiológicos (Gemeiner *et al.*, 2009). A partir dessa habilidade, elas têm sido ferramentas úteis na histoquímica em processos neoplásicos (Zheng *et al.*, 2005). Estudos têm usado lectinas como potenciais anticarcinogênicos. Neste sentido uma lectina com atividade antiproliferativa para câncer de células humanas foi purificada de rizoma de *Arundo donax* (Linn.) por cromatografia de afinidade (Kaur *et al.*, 2005).

Propriedades farmacológicas foram observadas em folhas de *Pandanus amaryllifolius* após isolamento de uma lectina ligadora de manose com atividade antiviral (Ooi *et al.*, 2004). As lectinas também servem como mediadoras de liberação e absorção de drogas e micropartículas nas mucosas (Bies *et al.*, 2004).

Zheng *et al.* (2007) purificaram uma lectina do cogumelo selvagem *Boletus edulis* e avaliaram sua atividade mitogênica, antifúngica e inibidora da transcriptase reversa do vírus HIV-1. A lectina aumentou a resposta mitogênica de esplenócitos murinos de ratos. Também inibiu a transcriptase reversa do vírus HIV-1 com uma IC₅₀ de 14.3 mM mas não teve nenhum efeito sobre o crescimento de fungos.

Ao longo das últimas décadas, lectinas têm sido investigadas devido a grande variedade de propriedades biológicas como atividade antiviral (Favacho *et al.*, 2007),

antifúngica (Tian *et al.*, 2008), antibacteriana (Santi-gadelha *et al.*, 2006), podendo ser úteis em aplicações terapêuticas e microbiologia clínica. Lectinas com forte atividade inseticida contra cupins da espécie *Nasutitermes corniger* também foram encontradas no cerne da aroeira (*Myracrodruon urundeuva*) e líquens da espécie *Cladonia verticillaris* (Sá *et al.*, 2008, Silva *et al.*, 2008).

2. *Moringa oleifera*

Moringa oleifera é uma planta tropical pertencente à família das *Moringaceae* que possui 14 espécies conhecidas, sendo *M. oleifera* a mais divulgada e utilizada dentre elas (Abdulkarin *et al.*, 2004). A Índia é o país de origem apesar de ser amplamente cultivada nas regiões tropicais de todo o mundo, onde cresce rapidamente sendo capaz de sobreviver até mesmo durante as estações secas (Nadir *et al.*, 2005).

Segundo Joly (1979), *M. oleifera* é uma planta arbórea com longas vagens verdes (Figura 3a), sementes aladas (Figura 3b), flores brancas perfumadas (Figura 3c) e folhas grandes (Figura 3d). As árvores de *Moringa* podem alcançar 4 m de altura, gerando flores e frutos em um ano; múltiplas colheitas de sementes são possíveis em muitas partes do mundo (Mcconnachie *et al.*, 1999). A árvore tem-se tornado conhecida no mundo como planta medicinal e rica fonte de óleos vegetais. Nas Filipinas, as folhas jovens, flores e vagens verdes são comuns na dieta (Guevara *et al.*, 1999). As folhas e as sementes jovens são ricas fontes de cálcio, ferro e vitamina C que servem como fontes de nutrientes para várias comunidades (Morton, 1991). Os frutos, que também são chamados de “vagens” e raízes da planta são usados como vegetais em países subdesenvolvidos (Katayon *et al.*, 2006).

Em decorrência dos vários usos tradicionais de *M. oleifera* muitas pesquisas têm sido feitas para isolar compostos bioativos de várias partes da planta (Guevara *et al.*, 1999). As sementes foram examinadas e apresentaram atividades hipotensiva (Faizi *et al.*, 1998), antimicrobiana (Ghebremichael *et al.*, 2005), antitumoral (Guevara *et al.*, 1999), atividade antifúngica *in vivo* contra dermatófitos (Chuang *et al.*, 2007) e nelas estão presentes uma lectina e um composto antioxidante solúveis em água (Santos *et al.*, 2005).

Vários materiais de planta têm sido testados ao longo dos anos para tratamento de água e as sementes de *M. oleifera* mostraram ter um dos mais eficientes coagulantes usados no tratamento de água para uso doméstico (Suleyman e Evison, 1995; Okuda *et*

al., 1999; Ghebremichael, 2004). Sementes descascadas de *Moringa* possuem a capacidade de descontaminar a água que contém arsênico e pode ser usada como uma tecnologia doméstica segura e que não causa danos para o meio-ambiente (Kumari *et al.*, 2006).



Figura 3. A: Vagens de *M. oleifera*, B: Sementes, C: Flores, D: Folhas.
(Fonte: Santos *et al.*, 2007)

2.1 Coagulantes de *Moringa oleifera*

Coagulantes naturais de origem vegetal e mineral foram usados no tratamento de água antes do advento de agentes químicos como sais de alumínio e ferro, mas seu uso foi progressivamente diminuído (Ndabgengesere e Narasiah, 1998) devido à falta de conhecimento científico sobre seus mecanismos de ação. No entanto, muitas pesquisas têm revelado vários inconvenientes com o uso de sais de alumínio no tratamento de água, como por exemplo, a doença de Alzheimer; neurotoxicidade e fortes propriedades carcinogênicas foram observadas quando se fazia uso de polímeros orgânicos sintéticos como acrilamida (Okuda *et al.*, 1999).

O aparecimento dessas doenças está associado a resíduos de alumínio na água conduzirem a uma redução de pH, produção de grande volume de resíduo orgânico e

diminuição na eficiência do processo de coagulação (Haarhoff e Cleasby, 1988). Em alguns países subdesenvolvidos o uso de sais químicos é inviabilizado pelo alto custo o que leva a problemas de importação (Rincon *et al.*, 1999). Recentemente o interesse por coagulantes naturais tem ressurgido devido a serem biodegradáveis, seguros para a saúde humana e de baixo custo.

De acordo com Jahn (1988) 14 espécies de *M. oleifera* já foram bem identificadas e possuem propriedades coagulantes em vários graus. Estudos feitos por Fink (1984), Gassen (1990) e Gassenschmidt (1991) sugeriam que o componente ativo de *M. oleifera* deveria ser um peptídeo catiônico com peso molecular entre 6 e 16 kDa e ponto isoelétrico em pH 10. Em 1995, Gassenschmidt fez análises da composição de aminoácidos e seqüenciamento e mostrou que o componente apresentava grande quantidade de glutamina, arginina e prolina e um total de 60 resíduos. Muyibi e Okufu (1995) reportaram que *M. oleifera* não era um coagulante eficiente para água com baixa turbidez.

Ndabigengesere *et al.* (1995) estudou a eficiência e os mecanismos de coagulação de *M. oleifera* em água turva. Confirmou que o componente ativo era uma proteína dimérica com propriedades coagulantes mais eficientes do que o alumínio, pois o resíduo orgânico formado era inócuo para o meio ambiente e de 4 a 5 vezes menor que o encontrado em água tratada com alumínio. O coagulante natural também não alterava o pH, era solúvel em água, tinha peso molecular de 13 kDa e ponto isoelétrico (pI) entre 10-11. Também revelou que as sementes de *M. oleifera* podem ser usadas em sua forma íntegra ou descascadas, no entanto, sementes descascadas eram mais eficientes para coagulação. Em 1998, Ndabigengesere e Narasiah observaram que a dosagem ótima era de 0,5 a 1 mg/L e que a proteína foi totalmente solúvel em água. *M. oleifera* como coagulante pode ser um substituto em potencial para o alumínio (Ndabigengesere *et al.*, 1995).

Um outro componente, com três frações ativas foi extraído de sementes de *M. oleifera* em tampão fosfato e cromatografia de troca iônica (Gassenschmidt *et al.*, 1995). A fração floculante isolada de uma das proteínas apresentava peso molecular ao redor de 6,5 kDa e pI acima de pH 10. A comparação da estrutura primária com seqüências de proteínas conhecidas não revelou significante homologia.

OKUDA *et al.* (1999), estudaram que as sementes de *M. oleifera* possuem um coagulante extraído com NaCl 1 M com capacidade de coagulação 7,4 vezes maior do que o extraído em água. Em 2001, Okuda *et al.* isolaram outro componente com

propriedades coagulantes em extratos salinos que não era proteína, polissacarídeo ou lipídio e sim, um polieletrólito com peso molecular em torno de 3,0 kDa e pH ótimo para coagulação acima de 8. Este coagulante também não aumentou a concentração de carbono orgânico residual.

Ghebremichael *et al.* em 2005, purificou por um método simples uma proteína catiônica com pI maior do que 9,6 e massa molecular de 6,5 kDa. Estes estudos sugerem que componentes extraídos em soluções aquosas ou salinas são de naturezas diferentes (Ghebremichael *et al.*, 2005).

2.2 Compostos coagulantes na água

Muitos coagulantes são amplamente usados em processos convencionais de tratamento para produção de água potável. Esses podem ser tanto coagulantes inorgânicos (sulfato de alumínio e cloreto de polialumínio), polímeros orgânicos sintéticos (derivados de poliacrilamida e polietileno imina) ou coagulantes naturais (quitosana e coagulantes microbianos). Polímeros orgânicos são comumente usados como coagulantes primários no tratamento de água (Ozacar e Sengil, 2002), possuem alto peso molecular e forte tendência a adsorver partículas na superfície da suspensão aquosa. Esses polímeros podem ser classificados em catiônicos, aniônicos ou não iônicos. Polímeros catiônicos são freqüentemente usados como coagulantes primários; polímeros aniônicos ou não iônicos são referidos como floculantes.

Coagulação/floculação é um processo comum no tratamento da água, o qual desestabiliza os materiais em suspensão e dissolvidos, sendo seguido por agregação em grandes flocos que são facilmente separados da água por subseqüentes processos de sedimentação e filtração (Chen *et al.*, 2006). A atividade floculante pode ser explicada por diferentes mecanismos. Proteínas catiônicas de alto peso molecular têm sua atividade floculante explicada pelo modelo de formação de pontes (Gassenschmidt *et al.*, 1995). Floculação de partículas negativamente carregadas é resultante de ligações como forças de Coulomb entre macromoléculas carregadas positivamente e neutralização de parte das cargas. Geralmente, uma pequena parte das macromoléculas liga-se à superfície das partículas enquanto que a maior parte fica livre para se ligar a outra e isso leva a aglomeração e formação de flocos. O mecanismo de ligação de cargas pode ser aplicado a proteínas pequenas e básicas como a isolada por Gassenschmidt *et al.* (1995); devido à colisão de partículas, ocorre saturação

interpartículas de setores diferentemente carregados e formação de flocos no local (Gassenschmidt *et al.*, 1995). Após a floculação, ocorre a remoção dos flocos através da sedimentação por gravidade e/ou filtração (Tomaszewska *et al.*, 2004).

2.3 Tratamento de água

A água constitui um recurso essencial à vida; um fator indispensável à sobrevivência da biosfera, do homem e de todas as outras espécies a ele associadas ou que com ele convivem. Conhecida como solvente universal, a água sempre retém algum resíduo dos materiais com os quais entra em contato. A água doce da natureza de rios, lagos e lençóis subterrâneos, contém resíduos das substâncias presentes no meio ambiente, como sais dissolvidos, partículas em suspensão e microorganismos. Existem muitas fontes de contaminação da água e esses contaminantes são principalmente substâncias do solo, provenientes de atividades agrícolas e industriais (Gopal *et al.*, 2007).

Para garantir que a água fornecida à população seja potável, as empresas buscam fontes de água de boa qualidade e utilizam alta tecnologia de tratamento para eliminar todos os poluentes e agentes ameaçadores à saúde. Nas Estações de Tratamento de Água (ETA) (Figura 4) a água bruta passa por diversos processos. Os principais são: coagulação (2), floculação (3), sedimentação (4), filtração (5) e desinfecção (6).

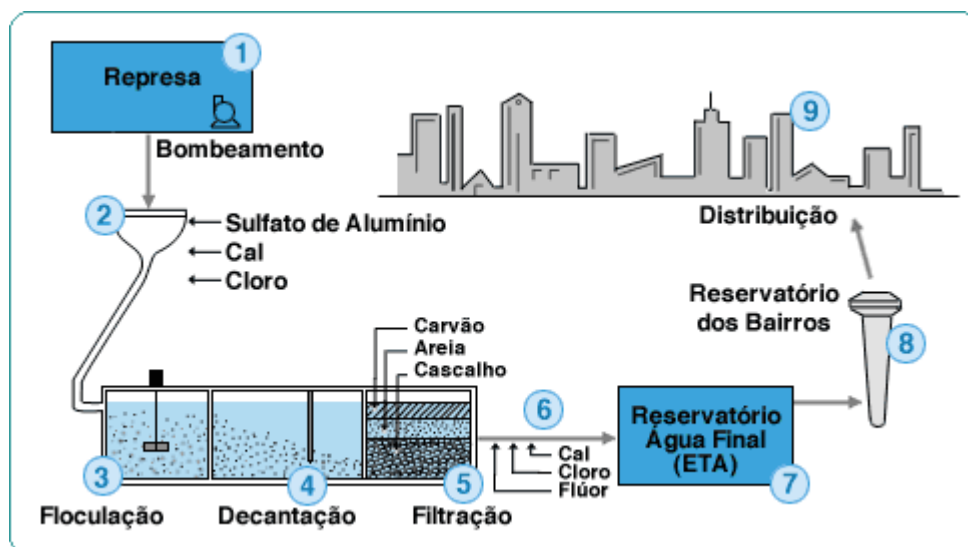


Figura 4. Esquema do Sistema de Tratamento de água

FONTE: SABESP

Coagulação e filtração são os processos mais críticos e estão interligados, determinando o sucesso ou o fracasso dos sistemas de tratamento de água (Ghebremichael, 2004). Do ponto de vista eletrostático, a coagulação é a redução do potencial zeta, pela adição de íons específicos. A coagulação ocorre quando a adição de um eletrólito catiônico induz baixa do potencial zeta, pois o eletrólito reduz as forças repulsivas permitindo que a ação das forças atrativas de Van der Waals promovam a aglutinação. As dosagens de eletrólitos dependem da concentração dos colóides (Di Bernardo, Costa, 1993). Em estações de tratamento, convencionalmente, ocorre agitação da água, seguida pela adição de coagulantes consequentemente redução da força repulsiva entre partículas (impurezas), aumento das colisões e formação de flocos (Mcconhachie *et al.*, 1999). Dentre as impurezas destacam-se as partículas com características bem definidas denominadas colóides. Estes colóides, por possuírem carga superficial negativa, há um grau de repulsão muito grande, permanecendo no meio até que sejam criadas condições favoráveis para a sua remoção.

Os reagentes mais comumente utilizados como coagulantes são o sulfato de alumínio e o cloreto férrico. Nesta etapa (2) também poderá ser necessária a utilização de um alcalinizante (cal hidratada ou cal virgem) que fará a necessária correção de pH para uma atuação mais efetiva do coagulante. No floculador (3), os motores agitam a água em velocidade controlada para aumentar o tamanho dos flocos. Em seguida, a água passa para os decantadores (4), onde os flocos maiores e mais pesados vão se depositar.

A desinfecção corresponde à adição de cloro à água antes de sua saída da ETA para manter um teor residual (6), até a chegada na casa do consumidor, e garantir que a água fornecida fique isenta de bactérias e vírus, mas quando os processos anteriores são bem operados o papel da desinfecção pode ser significativamente reduzido (Ghebremichael, 2004). A desinfecção por cloro é um importante passo no tratamento da água para o abastecimento público, contudo o cloro pode reagir com matéria orgânica natural e produzir subprodutos com efeitos prejudiciais a longo prazo. A formação desses subprodutos tem aumentado a necessidade de exploração de alternativas desinfectantes e novas tecnologias de tratamentos da água.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Identificar a presença de proteína com atividade hemaglutinante em extratos de diferentes tecidos de *M. oleifera*; purificar e caracterizar uma lectina das sementes, bem como determinar a atividade coagulante de preparações lectínicas e lectina purificada.

3.2 Objetivos específicos

- Detectar a presença de proteínas hemaglutinantes em diferentes tecidos de *M. oleifera*: flores, raques da inflorescência, sementes, folhas, tecido fundamental do tronco e casca do tronco;
- Isolar uma lectina das sementes através de fracionamento salino com sulfato de amônio utilizando o extrato bruto;
- Purificar a lectina através de métodos cromatográficos;
- Caracterizar parcialmente a lectina e os extratos dos diferentes tecidos quanto à especificidade a carboidratos e glicoproteínas;
- Caracterizar a lectina pura quanto à especificidade a eritrócitos humanos;
- Avaliar a estabilidade térmica, efeito do pH e de íons sob a atividade protéica;
- Avaliar a lectina através de eletroforese;
- Verificar a propriedade coagulante de preparações lectínicas e lectina de sementes de *M. oleifera* em água tratada com caolin.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULKARIM, S.M., LONG, K., LAI, O.M., MUHAMMAD, S.K.S., GUAZALI, H.M. Some physico-chemical properties of *Moringa oleifera* seed oil extracted using solvent and aqueous enzymatic methods. Food Chemistry, v. 93, p. 253-263, 2005.

BEZERRA, S. F.; VIEIRA, V. L. A.; CARVALHO JR, L. B. Proteases no trato digestivo de peixes. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, v. 22, p. 46-29, 2001.

BIES, C.; LEHR, C. M.; WOODLEY, J. F. Lectin-mediated drug targeting: history and applications. Advanced Drug Delivery Reviews, v. 56, p. 425– 435, 2004.

BOI, C.; CATTOLI, F.; FACCHINI, R.; SORCI, M.; SARTI, G. C. Adsorption of lectins on affinity membranes. Journal of Membrane Science, v. 273, p. 12-19, 2006.

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

CAVADA, B. S.; SANTOS, C. F.; GRANGEIRO, T. B.; NUNES, E. P.; SALES, P. V. P.; RAMOS, R. L; DE SOUSA, A. M.; CRISOSTOMO, C. V.; CALVETE, J. J. Purification and characterization of a lectin from seeds of *Vaitarea macrocarpa* Duke. Phytochemistry, v. 49, p. 675-680, 1998.

CHEN, Z.; FAN, B.; PENG, X.; ZHANG, Z.; FAN, J.; LUAN, Z. Evaluation of Al₃O polynuclear species in polyaluminum solutions as coagulant for water treatment. Chemosphere, v. 64, p. 912-918, 2006.

CHUANG, P.; LEE, C.; CHOU, J.; MURUGAN, M.; SHIEH, B.; CHEN, H. Antifungal activity of crude extracts and essential oil of *Moringa oleifera* Lam. Bioresource Technology, v. 98, p. 232-236, 2007.

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

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

CORREIA, M.T.S., COELHO, L.C.B.B., PAIVA, P.M.G. Lectins, carbohydrate recognition molecules: Are they toxic? In: Yasir Hasan Siddique, editor. Recent Trends in Toxicology. Transworld Research Network, v. 37, p. 47-59, 2008.

COUTIÑO-RODRÍGUEZ, R.; HERNÁNDEZ-CRUZ, P.; GILES-RÍOS, H. Lectins in Fruits having Gastrointestinal Activity: their participation in the hemagglutinating property of *Escherichia coli* 0157:H7. Archives of Medical Research, v. 32, p. 251–257, 2001.

DATTA, K.; USHA, R.; DUTTA, S. K.; SINGH, M. A comparative study of the winged bean protease inhibitors and their interaction with proteases. Plant Physiology and Biochemistry, v. 39, p. 949 - 959, 2001.

DI BERNARDO, L. COSTA, E. H. Curso de coagulação e floculação de água de abastecimento. ABES-MG, Associação Brasileira de Engenharia Sanitária Ambiental, 1993.

FAIZI, S.; SIDDIQUI, B. S.; SALEEM, R.; AFTAB, K.; SHAHEEN, F.; GILANI, A. H. Hypotensive constituents from the pods of *Moringa oleifera*. Planta Medica, v. 64, p. 225-228, 1998.

FAVACHO, A. R. M.; CINTRA, E. A.; COELHO, L. C. B. B.; LINHARES, M. I. S. *In vitro* activity evaluation of *Parkia pendula* seed lectin against human cytomegalovirus and herpes virus 6. BIOLOGICALS, v. 35, p. 189-194, 2007.

FERNANDES, M. P. Purificação, caracterização e aplicação biotecnológica da(s) lectina(s) presente(s) em *Bauhinia membranacea* Benth. Dissertação de Mestrado. Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Pernambuco, 2006.

FINK W. Identifizierung, Reindarstellung und strukturaufklärung flockungsaktiver wirkstoffe aus höheren planzen zur wasserreinigung, Doctoral thesis, Univ. Heidelberg, 1984.

GASSEN H. G.; GASSENSCHMIDT U.; JANY K. D.; TAUSCHER B.; WOLF S. Modern methods in protein and nucleic acid analysis. Biological Chemistry Hoppe-Seyler, v. 371, p. 768-769, 1990.

GASSENSCHMIDT, U.; JANY, K. D.; TAUSCHER, B. Chemical properties of flocculating active proteins from *Moringa oleifera*. Biological Chemistry Hoppe-Seyler 372, 659, 1991.

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.

GEMEINER, P.; MISLOVICOVÁ, D.; TKÁC, J.; SVITEL, J.; PATOPRSTÝ, V.; HRABÁROVÁ, E.; KOGAN, G.; KOZÁR, T. Lectinomics II. A highway to biomedical/ clinical diagnostic. Biotechnology Advances, 27 (1): 1-15, 2009.

GHEBREMICHAEL, K. A. Moringa seed and pumice as alternative natural materials for drinking water treatment. Tese (Pós-doutorado) - Department of Land and Water Resources Engineering - Royal Institute of Technology (KTH), Stockholm, Sweden, 2004.

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.

GOLDSTEIN, I. J.; HUGHES, R. C.; MONSIGNY, M.; OSAWA, T.; SHARON, N. What should be called a lectin? Nature, v. 285, p. 66, 1980.

GOLDSTEIN, I.J.; PORETZ, R.D. Isolation, physicochemical characterization, and carbohydrate-binding specificity of lectins. In: LIENER, I. E.; SHARON, N.;

GOLDSTEIN, I.J. (Eds) The Lectins: properties, functions, and applications in biology and medicine. New York: Academic Press, p. 33-248, 1986.

GOPAL, K.; TRIPATHY, S. S.; BERSILLON, J. L.; DUBEY, S. P. Chlorination byproducts, their toxicodynamics and removal from drinking water. Journal of Hazardous Materials, v. 140, p. 1-6, 2007.

GUEVARA A. P.; VARGAS C.; SAKURAI H.; FUJIWARA Y.; HASHIMOTO K.; MAOKA T.; KOZUKA. An antitumor promoter from *Moringa oleifera* Lam. Mutation Research, v. 440, p. 181-188, 1999.

GUIMARÃES-GOMES, V.; OLIVEIRA-CARVALHO, A.L.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M.; DUTRA, D. L. S.; PUJOL-LUZ, M; CASTRO, H. C.; LEE HO, P.; ZINGALI, R.B. Cloning, characterization, and structural analysis of a c-type lectin from *Bothrops insularis* (BiL) venom. Archives of Biochemistry and Biophysics, v. 432, p. 1-11, 2004.

HAARHOFF, J.; CLEASBY, J.L. Comparing aluminum and iron coagulants for in-line filtration of cold waters. Journal - American Water Works Association, v. 80, p. 168–175, 1988.

IMBERTY, A.; WIMMEROVÁ, M.; MITCHELL, E. P.; GILBOA-GARBE, N. Structures of the lectins from *Pseudomonas aeruginosa*: insights into the molecular basis for host glycan recognition. Microbes and Infection, v. 6, p. 221–228, 2004.

JOLY, A. B. Botânica: Introdução à taxonomia vegetal. 5. ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1979.

KABIR, S. 1998. Jacalin: a jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seed-derived lectin of versatile applications in immunobiological research. Journal of Immunological Methods, v. 212, p. 193-211, 1998.

KATAYON, S.; NOOR, M. J. M. M.; ASMA, M.; ABDUL, G. L. A.; THAMER, A. M.; AZNI, I.; AHMAD, J.; KHOR, B. C.; SULEYMAN, A. M. Effects of storage conditions of *Moringa oleifera* seeds on its performance in coagulation. *Bioresource Technology*, v. 97, p. 1455-1460, 2006.

KAUR, A.; SINGH, J.; KAMBOJ, S. S.; SEXANA, A. K.; PANDITA, R. M.; SHAMNUGAVEL, M. Isolation of an N-acetyl-D-glucosamine specific lectin from the rhizomes of *Arundo donax* with antiproliferative activity. *Phytochemistry*, v. 66, p. 1933-1940, 2005.

KAWAGISHI, H.; TAKAGI, J.; TAIRA, T.; MURATA, T.; USUI, T. Purification and characterization of a lectin from the mushroom *Mycoleptodonoides aitchisonii*. *Phytochemistry*, v. 56, p. 53-58, 2001.

KENNEDY, J.F., PAIVA, P.M.G.; CORREIA, M.T.S.; CAVALCANTI, M.S.M.; COELHO, L.C.B.B. Lectins, versatile protein of recognition - a review. *Carbohydrate Polymers*, 26 (3): 219-230, 1995.

KILPATRICK, D. C. Animal lectins: a historical introduction and overview. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1572, p. 87-197, 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 Mineral Processing*, v. 78, 131-139, 2006.

LIENER, I. E.; SHATON, N.; GOLDESTINE, I. J. The Lectins: properties, functions and applications in biology and medicine. Orlando: Academic Press, p. 371-435, 1986.

LIU, W., *et al.* Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a novel mannose-binding lectin from *Gastrodia elata* with antifungal properties. *Acta Crystallographica, Section D-Biological Crystallography*, v. 58, p. 1833-1835, 2002.

LUCK, K.; EHWALD, R.; ZIZKA, P.; KOPPITZ, H. Affinity sorbent for galactose specific lectins consisting of deproized plant cell wall ghosts. *Plant Science*, v. 82, p. 29-35, 1992.

MACHUKA, J. S.; OKEOLA, O. G.; ELS, J. M. V. D.; CHRISPEELS, M. J.; LEUVEN, F. V.; PEUMANS, W. J. Isolation and partial characterization of galactose-specific lectins from African yam beans, *Sphenostyles stenocarpa* Harms. *Phytochemistry*, v. 51, p. 721-728, 1999.

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

MONZO, A.; BONN, G. K.; GUTTMAN, A. Lectin-immobilization strategies for affinity purification and separation of glycoconjugates. *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 26, No. 5, 2007.

MORTON, J.F. The horseradish tree, *Moringaceae*-a boon to arid lands? *Economic Botany*, v.45, p. 318–333, 1991.

MOURE, A.; SINEIRO, J.; DOMÍNGUEZ, H. Extraction and functionality of membrane-concentrated protein from defatted *Rosa rubiginosa* seeds. *Food Chemistry*, v. 74, p. 327-339, 2001.

MUYIBI, S. A., OKUFU, C.A. Coagulation of low turbidity surface water with *Moringa oleifera* seeds. *The International Journal of Environmental Studies*, v. 48, p. 263 – 273, 1995.

NADIR, R.S., SPÖMDLY, E., LEDIN, I. Effect of feeding different levels of foliage of *Moringa oleifera* to creole dairy cows on intake, digestibility, milk production and composition. *Livestock Science*, 2005.

NAEEM, A.; KHAN, R.H.; VIKRAM, H.; AKIF, M. Purification of *Cajanus cajan* root lectin and its interaction with rhizobial lipopolysaccharide as studied by different

spectroscopic techniques. Archives of Biochemistry and Biophysics, v. 396, n.1, p.99-105, 2001.

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

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

NOMURA, K., ASHIDA, H., UEMURA, N., KUSHIBE, S., OZAKI, T., YOSHIDA, M. Purification and characterization of a mannose/glucose-specific lectin from *Castanea crenata*. Phytochemistry, v. 49, n. 3, p. 667-673, 1998.

OOI, L. S. M.; SUN, S. S. M.; OOI, V. E. C. Purification and characterization of a new antiviral protein from the leaves of *Pandanus amaryllifolius* (Pandanaceae). The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, v. 36, p.1440–1446, 2004.

OZACAR, M.; SENGIL, I. A. The use of tannins from turkish acorns (*Valonia*) in water treatment as a coagulant and coagulant aid. Journal of Environment Science, p. 26, v. 255-263, 2002.

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, 1999.

OKUDA, T.; BAES, A. U.; NISHIJIMA, W.; OKADA, M. Isolation and characterization of coagulant extracted from *Moringa oleifera* seed by salt solution. Water Research, v. 35, p. 405-410, 2001a.

OSHIKAWA, K; AOKI, K.; TERATA, S. Purification and characterization of a basic amino acid-specific peptidase from seeds of Jack bean (*Canavalia ensiformis*). Bioscience Biotechnology and Biochemistry, v. 64, p. 2186-2192, 2000.

OZEKI, Y.; MATSUI, T.; NITTA, K.; KAWAUCHI, H.; TAKAYANAG, T. K. Purification and characterization of β -galactoside binding lectin from frog (*Rana catesbiana*) eggs. Biochemical and Biophysical Research Communication, New York, v. 178, 407-13, 1991.

PAIVA, P. M. G. & COELHO, L. C. B. B. Purification and Partial Characterization of two lectins isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu Bean). Applied Biochemistry and Biotechnology v. 36, p. 113-118, 1992.

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

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

RAMESHWARAM, N. R., NADIMPALLI, S. K. An efficient method for the purification and quantification of a galactose-specific lectin from vegetative tissues of *Dolichos lablab*. Journal of Chromatography B, v. 861, p. 209–217, 2008.

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.

RINCON, A. D.N.; ESCORIHUELA, A.; FERNANDEZ , N.; CHACIN, E.; FORSTER, C.F. A preliminary evaluation of turbidity removal by natural coagulants indigenous to Venezuela, Process Biochemistry, v. 35, p. 91–395, 1999.

RUDIGER, H. Plant lectins-more than just tools for glycoscientists: occurrence, structure, and possible functions of plant lectins. Acta Anatomica (Basel), v. 161, p. 130-152, 1998.

SÁ, R.A.; NAPOLEÃO, T.H.; SANTOS, N.D.L.; GOMES, F. S.; ALBUQUERQUE, A.C.; XAVIER, H.S.; COELHO, L.C.B.B; BIEBER, L.W.; PAIVA, P.M.G. Induction

of mortality on *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae) by *Myracrodruon urundeuva* heartwood lectin. International Biodeterioration & Biodegradation Volume 62, Issue 4, Pages 460-464, 2008.

SANTI-GADELHA, T.; GADELHA, C. A. A; ARAGÃO, K. S.; OLIVEIRA, C. C.; MOTA, M. R. L.; GOMES, R. C.; PIRES, A. F.; TOYAMA, M. H.; TOYAMA, D. O.; ALENCAR, N. M. N.; CRIDDLE, D. N.; ASSREUY, A., M. S.; CAVADA, B. S. Purification and biological effects of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) seed lectin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 350, p. 1050–1055, 2006.

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*, v. 39, p. 975-980, 2005.

SANTOS, A. F. S. Moléculas bioativas de *Moringa oleifera*: detecção, isolamento e caracterização. Tese de doutorado – Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Pernambuco, 2007.

SHARON, N.; LIS, H. Legume lectins – a large family of homologous proteins. *FASEB Journal*, v. 4, p. 3198-3208, 1990.

SHARON, N.; LIS, H. The structural basis for carbohydrate recognition by lectins. In: *The molecular immunology of complex carbohydrates*, v.2, p. 1-16, 2001.

SILVA, M.D.C.; SÁ, R.A.; NAPOLEÃO, T.H.; GOMES, F. S.; SANTOS, N.D.L.; ALBUQUERQUE, A.C.; XAVIER, H.S.; PAIVA, P.M.G.; CORREIA, M.T.S.; COELHO, L.C.B.B. Purified *Cladonia verticillaris* lichen lectin: Insecticidal activity on *Nasutitermes corniger* (Isoptera: Termitidae). *International Biodeterioration & Biodegradation* 1–7, 2008.

SONG, H.; BELANGER, M.; WHITLOCK, J.; KOZAROV, E.; PROGULSKE-FOX, A. Hemagglutinin B is involved in the adherence of *Porphyromonas gingivalis* to human coronary artery endothelial cells. *Infection and Immunity*, v. 73, p. 7267-73, 2005.

STRYER, L. Bioquímica, Rio de Janeiro, Guanabara Kooagan, 2004.

SULEYMAN, A. M.; LILIAN, M. E. *Moringa oleifera* seeds for softening hardwater. Water Research, v. 29, p. 1099-1105, 1995.

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

TIAN, Q., WANG, W., MIAO, C., PENG, H., LIU, B., LENG, F., DAI, L., CHEN, F., BAO, J. Purification, characterization and molecular cloning of a novel mannose-binding lectin from rhizomes of *Ophiopogon japonicus* with antiviral and antifungal activities. Plant Science, v. 175, 877–884, 2008.

TOMASZEWSKA, M.; MOZIA, S.; MORAWSKI, A. W. Removal of organic matter by coagulation enhanced with adsorption on PAC. Desalination, v. 161, p. 79-87, 2004.

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

WIMMEROVA, M.; MITCHELL, E.; SANCHEZ, J. F.; GAUTIER, C.; IMBERTY, A. Crystal structure of fungal lectin: six-bladed beta-propeller fold and novel fucose recognition mode for *Aleuria aurantia* Lectin. The Journal of Biology Chemistry, v. 278, p.27059–27067, 2003.

WONG, J. H.; WONG, C. C. T.; NG, T. B. Purification and characterization of a galactose-specific lectin with mitogenic activity from pinto beans. Biochimica et Biophysica Acta, v. 1760, p. 808-813, 2006.

YAN, Q.; JIANG, Z.; YANG, S.; DENG, W.; HAN, L. A novel homodimeric lectin from *Astragalus mongholicus* with antifungal activity. Archives of Biochemistry and Biophysics, v. 442, p. 72-81, 2005.

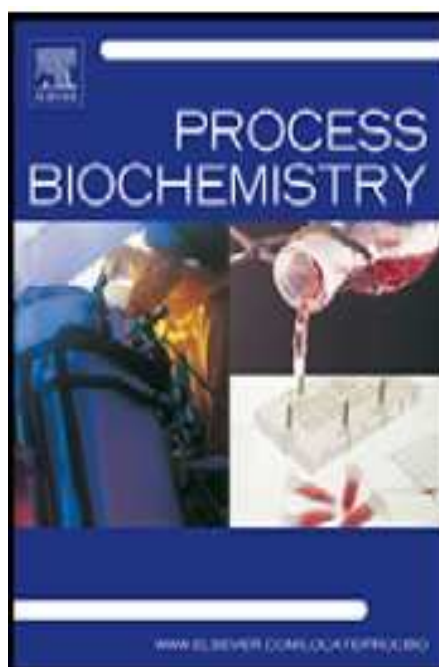
YE, X. Y.; NG, T. B. Isolation of a new cyclophilin-like protein from chickpeas with mitogenic, antifungal and anti-HIV-1 reverse transcriptase activities. *Life Sciences*, v. 70, p. 1129-1138, 2002.

ZHENG, Y. J.; ORNSTEINA, R. L.; LEARY, J. A. A density functional theory investigation of metal ion binding sites in monosaccharides. *Journal of Molecular Structure*, v. 389, p. 233-240, 1997.

ZHENG, T.; PEELEN, D.; SMITH, L.M. Lectin arrays for profiling cell surface carbohydrate expression. *Journal of the American Chemical Society*, 127 (28): 9982-3, 2005.

ZHENG, S., LI, C., NG, T. B., WANG, H. X. A lectin with mitogenic activity from the edible wild mushroom *Boletus edulis*. *Process Biochemistry*, v. 42, p. 1620–1624, 2007.

5. ARTIGO PUBLICADO NA PROCESS BIOCHEMISTRY



Qualis: B1

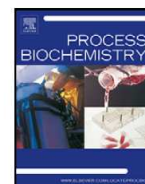
Área: Ciências Biológicas I

Fator de Impacto: 2.4



Contents lists available at ScienceDirect

Process Biochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/procbio

Short communication

Isolation of a seed coagulant *Moringa oleifera* lectin

Andréa F.S. Santos^{a,b}, Luciana A. Luz^a, Adriana C.C. Argolo^a, José A. Teixeira^b,
Patrícia M.G. Paiva^a, Luana C.B.B. Coelho^{a,*}

^a Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego s/n, 50670-901 Recife, PE, Brazil

^b IBB-Institute for Biotechnology and Bioengineering, Centre for Biological Engineering, Universidade do Minho, Campus de Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 October 2008

Received in revised form 14 January 2009

Accepted 15 January 2009

Keywords:

Protein purification

Lectin

Moringa oleifera

Coagulant activity

Water treatment

Natural coagulants

ABSTRACT

In this work hemagglutinating activity (HA) was investigated in distinct *Moringa oleifera* tissue extracts. A new lectin from seeds (cMoL) was purified and characterized; hemagglutinating and coagulating activities were evaluated. HA was detected in 0.15 M NaCl extracts from flowers and rachis inflorescence (5%, w/v), seeds, leaves, fundamental tissue of stem and steam bark (10%, w/v). cMoL isolated after saline extraction and guar gel column chromatography was active at pH range 4.0–9.0 agglutinating erythrocytes from rabbit and human blood types. Extracts of tissues and cMoL activities were carbohydrate inhibited; azocasein and asialofetuin abolished cMoL HA. The lectin was thermostable at 100 °C during 7 h. Polyacrylamide gel electrophoresis under reduced conditions revealed a main polypeptide band of 26.5 kDa; native basic cMoL was detected as a unique band. Seed lectin preparations and cMoL showed coagulant activity, similar to aluminium sulphate, the coagulant most widely used in water treatment.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Lectins are hemagglutinating proteins that exist in virus and all forms of life but most known are extracted from plants, especially from seeds [1], a storage organ, which is one of the main sources to obtain these molecules. In general, other plant tissues contain lower amount of lectins; also, not necessarily identical in structure or carbohydrate specificity to seed lectins [2]. These proteins interact selectively and reversibly with residues of specific sugars [3] and, structural characteristics result in the use of lectins for therapeutic applications [4] and biotechnological purposes [5]. Cytotoxic effects revealed by mitogenic, antitumoral, antimicrobial, and insecticide activities have been found in lectins [2].

Different protein purification protocols have been used to isolate lectins from the same tissue. In general, the first step involves preparation of extracts in saline or buffer solution [6]. From the crude extract, the protein can be fractionated through methods such as selective precipitation with salts at different concentrations. The isolation techniques used include ion exchange [7], gel filtration [8] and affinity [9] chromatography. However, due to the lectin ability for recognizing carbohydrates, affinity chromatography in columns containing polysaccharides

[10] or glycoproteins [11] has been the most commonly used technique [4].

Polymers have been applied in coagulation/flocculation processes for water purification for decades [12]. Natural coagulants of vegetable origin were used in water treatment before the advent of synthetic chemicals like aluminium and ferric salts [13]. Cactus (*Cactaceae opuntia*) is a natural macromolecular coagulant and the turbidity removal efficiency could reach 94%, the optimum pH was about 10 and temperature had slight influence on the coagulation effect [14]. *Cactus latifolia* and seeds of *Prosopis juliflora* act as natural coagulants and produced comparable turbidity removals in water with high (100–200 NTU) and low (30–40 NTU) initial turbidity [15].

Moringa oleifera (Lam), Moringaceae family, has been used in the Philippine diet; leaves, flowers and green pods are edible as a human nutritious vegetable [16]. In Malaysia, the young tender pods are cut into small pieces and added to curries [17]. Several properties have been identified in different parts of *M. oleifera*: the leaf extract is a potential source of antioxidants [18]; hypocholesterolemic effects have also been found in leaf extract [19] and fruits [20]; plant seeds contain hypotensive activity [21], strong antioxidant activity and chelating property against arsenic toxicity [22]. *Moringa* seed coagulant properties have been used to water treatment [23,24]. Shelled *M. oleifera* seeds have the property to decontaminate arsenic from water and can be used as domestic and environment-friendly safe technology [25].

* Corresponding author. Tel.: +55 8121268540; fax: +55 8121268576.

E-mail address: lcbcoelho@gmail.com (Luana C.B.B. Coelho).

In this report hemagglutinating proteins were identified in *M. oleifera* tissue extracts and a seed coagulant lectin isolated by affinity chromatography was partially characterized.

2. Materials and methods

2.1. Extract preparations

Flowers, inflorescence rachis, seeds, leaf tissue, fundamental tissue of stem and steam bark of *M. oleifera* Lam were collected in Recife city, Northeast of Brazil. A sample of the collected material is archived as voucher specimen number 63184, IPA, at the herbarium "Dárdano de Andrade Lima" (Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária, Recife, Brazil). Tissue flours of *M. oleifera* were extracted with 0.15 M NaCl for 6 h at room temperature and resulted in saline extracts from flowers and inflorescence rachis (E1 and E2, 5%, w/v), as well as seeds, leaves, fundamental tissue of stem and steam bark (E3, E4, E5 and E6, 10%, w/v).

2.2. Saline fractionation

Proteins of E3 were precipitated using 0–60% ammonium sulphate fractionation for 4 h at room temperature. The 0–60F was dialyzed with distilled water (two changes) and 0.15 M NaCl overnight.

2.3. Hemagglutinating activity

HA was performed in microtiter plates according to Correia and Coelho [26]. Lectin preparations (50 μ L) were serially two-fold diluted in 0.15 M NaCl before addition of 50 μ L 2.5% (v/v) suspension of rabbit glutaraldehyde treated erythrocytes or fresh human erythrocytes. Titer was expressed as the highest dilution exhibiting hemagglutination. Specific HA (SHA) was defined as the ratio between the titer and protein concentration (mg/mL).

2.4. Lectin isolation

The 0–60F was chromatographed (10 mg of protein) on a guar gel column (10.0 cm $\times$ 1.0 cm) previously equilibrated with 0.15 M NaCl (20 mL/h flow rate). The bound HA was eluted with 1.0 M NaCl (cMoL).

2.5. Effect of different pH, temperatures and cations on HA

The pH effect was evaluated with cMoL (50 μ L) diluted in 10 mM citrate-phosphate buffer (pH 3.0–6.5), 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0–8.0) or 10 mM Tris-HCl buffer (pH 8.5–9.0). Lectin thermal stability was evaluated with previously heated cMoL (30–90 °C, up to 30 min and subsequently 100 °C, every 30 min, up to 7 h). Assays for divalent cation requirements were performed by dialysis with 5 mM EDTA (16 h, 4 °C) and 0.15 M NaCl (6 h, 4 °C) and HA was measured with MgCl₂, CaCl₂ and KCl (5 mM). For all experiments, HA was measured as described in Section 2.3 using 50 μ L of a 2.5% (v/v) suspension of rabbit glutaraldehyde treated erythrocytes.

2.6. Hemagglutinating activity inhibition

The lectin inhibitory assays using extracts and cMoL were evaluated with solutions of carbohydrates D(-)-fructose, D(+)-raffinose, D(+)-glucose and D(+)-mannose. cMoL was also assayed with solutions of D(+)-lactose, (+)-arabinose, trehalose, L(+)-rhamnose and galactose. E and cMoL were assayed with 0.5 mg/mL glycoprotein solutions (fetuin, asialofetuin, ovalbumin, casein and azocasein). The inhibitory assays were similar to the hemagglutinating assay with exception of an incubation step (room temperature, 15 min) before erythrocyte addition.

2.7. Protein evaluation

The protein was estimated according to the Lowry et al. method [27] and by absorbance at 280 nm.

2.8. Lectin characterization

cMoL molecular weight was estimated by sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) as described by Laemmli [28]. Gels were stained either for protein with Coomassie Brilliant Blue [28] or for carbohydrate using Schiff reagent (Sigma) according to Pharmacia Fine Chemicals (1980). The native molecular weight was determined by Sephacryl S-300 gel filtration column (16 mm $\times$ 60 cm) with 0.5 M NaCl (20 mL/h flow rate) using molecular weight markers (bovine serum albumin: 66 kDa, fetuin: 64 kDa, ovalbumin: 44 kDa and ovalinhibitor: 28 kDa) using Äkta FPLC system (Amersham Pharmacia Biotech, Sweden).

2.9. Coagulation activity assay

The coagulation activity assay was based on the method described by Ghebremichael et al. [24]. Initially, the water sample was treated with kaolin

clay (10 g) to 1 L tap water, stirred for 30 min and allowed to settle for 24 h to achieve complete hydration. Desired turbidity was obtained by dilution. An aliquot (100 μ L) of samples (1 mg/mL, E3, seed 0–60F and cMoL) and positive control (aluminium sulphate 5%) were added to high turbidity clay suspension (900 μ L, 250–300 NTU, Nephelometric Turbidity Units) in 1 mL cuvette and homogenized instantly. Dilution (1:2) of clay suspension was done to obtain low turbidity (125–150 NTU) and samples were assayed. Samples were allowed to settle for 1 h and absorbance was measured at 500 nm using a UV-Visible spectrophotometer FEMTO 700 S. In order to reduce background effect, a sample volume of 800 μ L from the top was transferred to the cuvette for absorbance measurements every 5 min up to 60 min and subsequently to each 10 min up to 140 min. Reduction in absorbance relative to negative control defines coagulation activity. The assays were performed three times and under different temperatures (15, 30, 45 and 60 °C) or 5 mM solutions of ions (Ca²⁺, Mg²⁺ and Mn²⁺).

2.10. Statistics analysis

Values of experimental results shown in tables and figures are the mean of at least three determinations ($\pm$ standard deviation). Linear regression equations were established using the Origin version 6.0 program (Microcal, Northampton, MA, USA).

3. Results

HA was detected in all extracts obtained from *M. oleifera* tissues. The highest specific activities, however, were detected in extracts from steam bark, flowers and inflorescence rachis (Table 1). The differences in carbohydrate inhibition of lectin preparations from distinct tissues of the plant may indicate the presence of different lectins.

When 0–60F (Specific HA, SHA: 371) of *M. oleifera* seeds was chromatographed on guar gel affinity column (Fig. 1(A)) HA was detected in unabsorbed (SHA: 35) and 1.0 M NaCl eluted fractions (SHA: 864). The 1.0 M NaCl eluted fractions (cMoL) retained 59% of chromatographed lectin activity and the obtained purification factor was 2.3 (Table 2).

cMoL showed HA to rabbit (titer: 256⁻¹) and A, B, O and AB human fresh erythrocytes (titer: 64⁻¹, 128⁻¹, 16⁻¹ and 256⁻¹, respectively) like the seed lectin from *Crotalaria pallida* [8]. cMoL is a highly stable protein, active at pH range 4.0–9.0 and resistant up to 7 h at 100 °C. The presence of ions Mg²⁺, Ca²⁺ and K⁺ increased cMoL HA.

Inhibition assays revealed that HA of extracts was partially inhibited with carbohydrates and glycoproteins (Table 3); the latter macromolecules were more effective inhibitors to cMoL than carbohydrates. cMoL HA was strongly inhibited by ovalbumin; azocasein and asialofetuin completely abolished HA activity (Table 3) indicating complex sugar specificity.

Under denatured and reduced conditions a main polypeptide band of 26.5 kDa was revealed (Fig. 2(A)); PAGE confirmed cMoL as a basic protein (Fig. 2(B)) and no staining was detected with Schiff's reagent. Native cMoL Sephacryl S-300 gel filtration chromatography revealed a single peak of 30 kDa (Fig. 1(B)).

Flour of *M. oleifera* seeds has been broadly used in developing countries as a natural coagulant to treat water for human consumption. Seed extract, 0–60F and cMoL showed coagulant

Table 1

Protein concentrations and specific hemagglutinating activities of tissue extracts from *Moringa oleifera*.

Tissue extract ^a	Protein concentration (mg/L)	SHA ^b (HA/protein concentration)
Flowers	0.9	1185
Inflorescence rachis	0.4	680
Seeds	4.9	208
Leaf tissue	1.0	8
Fundamental tissue of steam	0.4	84
Steam bark	1.7	2444

^a All tissues were collected from a single plant.

^b SHA, specific hemagglutinating activity. Samples were assayed with glutaraldehyde treated rabbit erythrocytes.

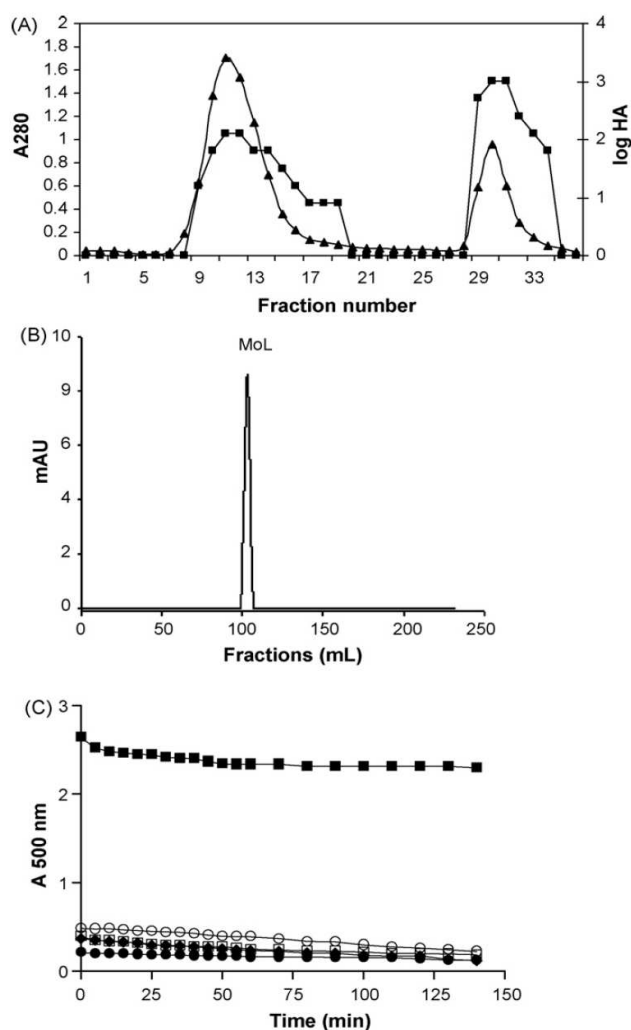


Fig. 1. (A) cMoL (10 mg of 0-60F protein) purification on a guar gel affinity column (10.0 cm $\times$ 1.0 cm). More than 2 mg of cMoL were obtained. At the point indicated (arrow) elution buffer was changed to 1.0 M NaCl. Absorbance at 280 nm ($\blacksquare$) and log of HA ($\blacktriangle$) are represented. (B) cMoL native molecular weight determination by gel filtration chromatography on a Sephacryl S-300 column. A peak of 30 kDa is represented. Molecular weight markers used were: bovine serum albumin, 66 kDa; fetuin, 64 kDa; ovalbumin, 44 kDa; ovomucoid, 28 kDa. (C) Coagulation activities of cMoL and lectin preparations with kaolin clay (10 g/L). cMoL (1 mg/mL, $\square$), extract (1 mg/mL, $\bullet$), 0-60F (1 mg/mL, $\blacklozenge$), aluminium sulphate (5% p/v, $\circ$) and negative control ($\blacksquare$). The values represent the mean of three assays ($\pm$ standard deviation); significant differences between groups were determined at $p < 0.05$.

activities (reduction in absorbance at 500 nm of approximately 92% in relation to negative control) similar to the positive control aluminium sulphate on water with high (250–300 NTU) and low (125–150 NTU) turbidity of kaolin clay suspension (Fig. 1(C)). Significant differences in coagulant activity were not observed at the temperatures the analysis was done. No coagulant activity was detected in seed extract with all tested ions, i.e. coagulation was also absent to 0-60F or cMoL with Ca^{+2} and Mg^{+2} . However, Mn^{+2} with 0-60F and cMoL decreased water turbidity similarly to sulphate.

4. Discussion

Tissues from *M. oleifera* such as leaves and flowers are eaten as nutritious vegetables and fried seeds have also been consumed

Table 2
Summary of cMoL purification.

Preparation	Total protein (mg)	HA	Total HA	SHA	Yield ^a (%)	Purification (folds)
0-60F	10.0	2048	3710	371	100	1.0
cMoL	2.5	256	2201	864	59	2.3

^a Percentage of total activity recovered. Hemagglutinating activity (HA) assays and SHA, specific HA were performed with rabbit erythrocytes. More than 2 mg of cMoL were obtained from 10 g of seed powder when a 10% (w/v) extract was submitted to 60% ammonium sulphate fractionation followed by guar gel affinity chromatography.

Table 3
Inhibition hemagglutinating activity of tissue extracts and cMoL by carbohydrates and glycoproteins.

Inhibitor	E1	E2	E3	E4	E5	E6	cMoL
D(-)-Fructose	148.1	N	N	N	N	305.5	N
D(+)-Raffinose	592.5	NS	76.8	N	10.5	N	320
D(+)-Glucose	148.1	167.5	153.6	N	N	N	80
D(+)-Mannose	N	335	153.6	N	N	N	N
D(+)-Lactose	ND	ND	ND	ND	ND	ND	160
D(+)-Arabinose	ND	ND	ND	ND	ND	ND	320
Trehalose	ND	ND	ND	ND	ND	ND	160
L(+)-Rhamnose	ND	ND	ND	ND	ND	ND	160
Galactose	ND	ND	ND	ND	ND	ND	80
Asialofetuin	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0
Fetuin	0	41.9	38.4	4.1	0	152.7	N
Ovalbumin	N	335	76.8	4.1	0	611	10
Casein	296.2	0	38.4	2.0	0	19	80
Azocasein	0	0	9.6	2.0	0	2.4	0

Flowers (E1), inflorescence rachis (E2), seeds (E3), leaf tissue (E4), fundamental tissue of stem (E5), stem bark (E6). Specific hemagglutinating activity (SHA) of E were 1185 (E1), 2680 (E2), 307 (E3), 8.16 (E4), 84.21 (E5) and 2444 (E6). SHA of cMoL was 640. Assays were performed with rabbit erythrocytes. Carbohydrates (0.2 M) and glycoproteins (0.5 mg/mL) were used. N indicates that no inhibition of HA was detected and ND indicates that the assays were not determinate.

[29]. Some lectins were found to be toxic or anti-nutritious for man and animals. In general, nausea, bloating, vomiting and diarrhoea characterize the oral acute toxicity of lectins on humans [30]. HA was detected in all extracts obtained from *M. oleifera* tissues; these findings make this plant an important model for study of different molecular forms of lectins and their correspondent functions. The same has been observed for *Bauhinia monandra* extracts [31] and lectins were purified from different tissues of *Dolichos lablab* [32]. The presence of lectins in different parts of *M. oleifera* that are consumed by the population requires a nutritional assessment of these tissues.

The presence of lectin is mainly detected through the hemagglutinating activity assay which is performed with a serial dilution of the lectin before an incubation step with human or other animal erythrocytes [6]. The lectin interaction with carbohydrates are performed through a combination of hydrogen bonds between sugar hydroxyl groups and protein main-chain, as well as side-chain groups, water-mediated contacts, van der Waals packing of the hydrophobic sugar ring face against an aromatic residue, and hydrophobic interactions [33].

Guar gel affinity chromatography efficiently purified seed cMoL, with good recoveries (59%). This new and simple protocol purified a lectin different from others already published, like the water soluble *M. oleifera* lectin, WSMoL, previously described in seeds [34]. cMoL is a basic protein with 30 kDa, active at pH range 4.0–9.0, thermostable at 100 °C during 7 h and HA was completely inhibited by azocasein and asialofetuin. WSMoL is an acidic glycoprotein and was mainly active with rabbit cells at pH 4.5; HA was abolished by heat treatment, pH 7.0, fructose and porcine thyroglobulin [34]. Katre et al. [35] isolated a hemagglutinin from

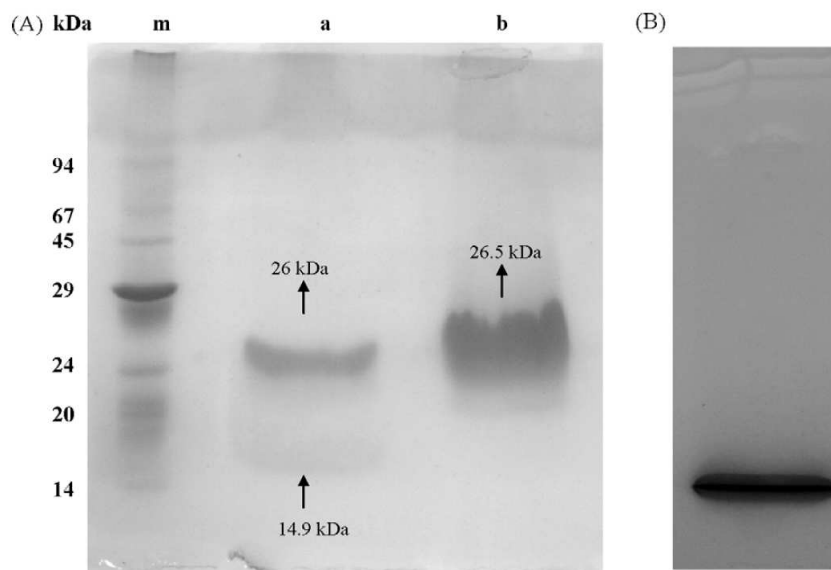


Fig. 2. SDS-PAGE (A) of lectin (100 μ g) treated (a) and untreated (b) with β -mercaptoethanol and PAGE showing purified native and basic cMoL (B). Molecular weight markers (m): phosphorylase b (94 kDa), bovine serum albumin (67 kDa), ovalbumin (43 kDa), carbonic anhydrase (30 kDa), trypsinogen (24 kDa), trypsin inhibitor (20 kDa) and α -lactalbumin (14 kDa); the gels were stained with Coomassie Brilliant Blue (A) and starch black (B).

seeds of *M. oleifera*, a homodimer with molecular mass of 14 kDa and subunits (7.1 kDa) linked by disulfide bond(s).

cMoL is also distinct from other coagulant proteins previously reported in *M. oleifera* seeds. Nadabgengesere et al. [13] described dimeric cationic proteins with molecular mass of 12–14 kDa and isoelectric point (pI) between 10 and 11; Ghebremichael et al. [24] studied a cationic protein with pI greater than 9.6 and molecular mass less than 6.5 kDa that showed coagulation efficiencies of heat-treated samples slightly higher than raw samples. Heat treatment promotes the molecular vibration and this can be responsible for better coagulation efficiency. Gassenschmidt et al. [36] purified a flocculating cationic protein with pI greater than 9.6 and molecular mass less than 6.5 kDa. Furthermore, Okuda et al. [37] founded a coagulant compound in saline extract of *M. oleifera* seeds that was neither protein, nor polysaccharide or lipid.

Coagulant activity of high-molecular cationic polyacrylamide derivatives has been explained by the bridge formation model; coagulation of negatively charged particles is a result of binding by Coulomb forces of positively charged particles and neutralization of part of the surface charge. Reduced electrostatic repulsion leads to the agglomeration and formation of flocs by bridges between negatively charged particles [36]. This mechanism may explain cMoL coagulant properties when positively charged proteins bind to parts of surface from negatively charged particles, flocs are formed and coagulation is observed.

M. oleifera may provide an interesting model for structural comparison of lectins since all extracts from distinct *M. oleifera* tissues revealed HA and others different lectins are present in the seeds.

In this paper a new thermoresistant coagulant lectin (cMoL) was purified from seed flour using a simple technique. *M. oleifera* coagulant proteins, cMoL and WSMoL, could contribute to unravel the function of products from a unique gene or genes in the plant.

Extracts, 0-60F and cMoL showed water coagulant properties in the same proportions. Similar results were found with aluminium sulphate, the most common synthetic coagulant used in water treatment all over the world. In conclusion, *M. oleifera* seed preparations and cMoL can be applied to water treatment for

human consumption. The production of filters containing cMoL is already being developed in our laboratories.

Acknowledgements

The authors express their gratitude to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for research grants and fellowship (LCBBC). Also, the Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) are acknowledged for financial support. The authors are deeply grateful for the technical assistance of Mrs. Maria Barbosa Reis da Silva.

References

- [1] Jeyaprakash AA, Jayashree G, Mahanta SK, Swaminathan CP, Sekar K, Suroliya A, et al. Structural basis for the energetics of jacalin-sugar interactions: promiscuity versus specificity. *J Mol Biol* 2005;347:181–8.
- [2] Correia MTS, Coelho LCBB, Paiva PMG. Lectins carbohydrate recognition molecules: are they toxic? In: Siddique YH, editor. Recent trends in toxicology, vol. 37. Kerala, India: Transworld Research Network; 2008. p. 47–59.
- [3] Franco-Fraguas L, Plá A, Ferreira F, Massaldi H, Suárez N, Viera FB. Preparative purification of soybean agglutinin by affinity chromatography and its immobilization for polysaccharide isolation. *J Chromatogr B* 2003;790:365–72.
- [4] Vega N, Pérez G. Isolation and characterisation of a *Salvia bogotensis* seed lectin specific for the Tn antigen. *Phytochemistry* 2006;67:347–55.
- [5] Fraguas LF, Batista-Vieira F, Carlsson J. Preparation of high-density Concavalin A adsorbent and its use for rapid, high-yield purification of peroxidase from horseradish roots. *J Chromatogr B* 2004;803:237–41.
- [6] Kennedy JF, Paiva PMG, Correia MTS, Cavalcanti MSM, Coelho LCBB. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. *Carbohydr Polym* 1995;26:219–30.
- [7] Yan Q, Jiang Z, Yang S, Deng W, Han L. A novel homodimeric lectin from *Astragalus mongholicus* with antifungal activity. *Arch Biochem Biophys* 2005;442:72–81.
- [8] Rego EJJ, Carvalho DD, Marangoni S, Oliveira B, Novello JC. Lectins from seeds of *Crotalaria pallida* (smooth rattlebox). *Phytochemistry* 2002;60:441–6.
- [9] Sitohy M, Doheim M, Badr H. Isolation and characterization of a lectin with antifungal activity from Egyptian *Pisum sativum* seeds. *Food Chem* 2007;104:971–9.
- [10] Machuka JS, Okeola OG, Els JMVD, Chrispeels MJ, Leuven FV, Peumans WJ. Isolation and partial characterization of galactose-specific lectins from African yam beans, *Sphenostyles stenocarpa* Harms. *Phytochemistry* 1999;51:721–8.
- [11] Kawagishi H, Takagi J, Taira T, Murata T, Usui T. Purification and characterization of a lectin from the mushroom *Mycophytonoides aitchisonii*. *Phytochemistry* 2001;56:53–8.

- [12] Özacar M, Şengil A. The use of tannins from Turkish acorns (*Valonia*) in water treatment as a coagulant and coagulant aid. *J Eng Environ Sci* 2007;26:255–63.
- [13] Ndabigengesere A, Narasiah KS, Talbot BG. Active agents and mechanism of coagulation of turbid waters using *Moringa oleifera* seeds. *Water Res* 1995;29:703–10.
- [14] Zhang J, Zhang F, Luo Y, Yang H. A preliminary study on cactus as coagulant in water treatment. *Process Biochem* 2006;41:730–3.
- [15] Diaz A, Rincon N, Escorihuela A, Fernandez N, Chacin E, Forster CF. A preliminary evaluation of turbidity removal by natural coagulants indigenous to Venezuela. *Process Biochem* 1999;35:391–5.
- [16] Guevara AP, Vargas C, Sakurai H, Fujiwara Y, Hashimoto K, Maoka T, et al. An antitumor promoter from *Moringa oleifera* Lam. *Mutat Res* 1999;440:181–8.
- [17] Abdulkarim SM, Long K, Lai OM, Muhammad SKS, Ghazali HM. Some physico-chemical properties of *Moringa oleifera* seed oil extracted using solvent and aqueous enzymatic methods. *Food Chem* 2005;93:253–63.
- [18] Arabshahi DS, Devi DV, Urooj A. Evaluation of antioxidant activity of some plant extracts and their heat, pH and storage stability. *Food Chem* 2007;100:1100–5.
- [19] Ghasi S, Nwobodo E, Ofili JO. Hypocholesterolemic effects of crude extract of leaf of *Moringa oleifera* Lam in high-fat diet fed Wistar rats. *J Ethnopharmacol* 2000;69:21–5.
- [20] Mehta LK, Balaraman R, Amin AH, Bafna PA, Gulati OD. Effect of fruits of *Moringa oleifera* on the lipid profile of normal and hypercholesterolaemic rabbits. *J Ethnopharmacol* 2003;86:191–5.
- [21] Faizi S, Siddiqui BS, Saleem R, Siddiqui S, Aftab K, Gilani AH. Fully acetylated carbamate and hypotensive thiocarbamate glycosides from *Moringa oleifera*. *Phytochemistry* 1995;38:957–63.
- [22] Gupta R, Kannan GM, Sharma M, Flora SJ. Therapeutic effects of *Moringa oleifera* on arsenic-induced toxicity in rats. *Environ Toxicol Pharmacol* 2005;20:456–64.
- [23] Okuda T, Baes AU, Nishijima W, Okada M. Improvements of extraction methods of coagulation active components from *Moringa oleifera* seed. *Water Res* 1999;33:3373–8.
- [24] Ghebremichael KA, Gunaratna KR, Henriksson H, Brumer H, Dalhammar G. A simple purification and activity assay of the coagulant protein from *Moringa oleifera* seed. *Water Res* 2005;39:2338–44.
- [25] Kumari P, Sharma P, Srivastava S, Srivastava MM. Biosorption studies on shelled *Moringa oleifera* Lamarck seed powder: removal and recovery of arsenic from aqueous system. *Int J Miner Process* 2006;78:131–9.
- [26] Correia MTS, Coelho LCBB. Purification of a glucose/mannose specific lectin, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu bean). *Appl Biochem Biotechnol* 1995;55:261–73.
- [27] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265–75.
- [28] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680–5.
- [29] Makkar HPS, Becker K. Nutritional value and antinutritional components of whole and ethanol extracted *Moringa oleifera*. *Anim Feed Sci Technol* 1996;63:211–28.
- [30] Vasconcelos IM, Oliveira JTA. Antinutritional properties of plant lectins. *Toxicon* 2004;44:385–403.
- [31] Coelho LCBB, Silva MBR. Simple method to purify milligram quantities of the galactose-specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*. *Phytochem Anal* 2000;11:295–300.
- [32] Rameshwaram NR, Nadimpalli SK. An efficient method for the purification and quantification of a galactose-specific lectin from vegetative tissues of *Dolichos lablab*. *J Chromatogr B* 2008;861:209–17.
- [33] Sol FGD, Cavada BS, Calvete JJ. Crystal structures of *Cratylia Xoribunda* seed lectin at acidic and basic pHs. Insights into the structural basis of the pH-dependent dimer–tetramer transition. *J Struct Biol* 2007;158:1–9.
- [34] Santos AFS, Argolo ACC, Coelho LCBB, Paiva PMG. Detection of water soluble lectin and antioxidant component from *Moringa oleifera* seeds. *Water Res* 2005;39:975–80.
- [35] Katre UV, Suresh CG, Khan MI, Gaikwad SM. Structure-activity relationship of a hemagglutinin from *Moringa oleifera* seeds. *Int J Biol Macromol* 2008;42:203–7.
- [36] Gassenschmidt U, Jany KD, Tauscher B, Niebergall H. Isolation and characterization of a flocculating protein from *Moringa oleifera* Lam. *Biochim Biophys Acta* 1995;1243:477–81.
- [37] Okuda T, Baes AU, Nishijima W, Okada M. Coagulation mechanism of salt solution-extracted active component in *Moringa oleifera* seeds. *Water Res* 2001;35:830–4.

6. CONCLUSÕES

- AH foi detectada em todos os extratos obtidos de tecidos de *M. oleifera*;
- A maior atividade específica foi determinada em extratos de cascas do tronco, flores e raques da inflorescência;
- Ensaios de inibição da AH revelaram que os extratos dos tecidos de *M. oleifera* foram parcial e diferentemente inibidos com carboidratos e glicoproteínas;
- Cromatografia de afinidade em gel de guar foi eficiente na separação de frações puras da lectina de sementes de *M. oleifera* (cMoL);
- O aquecimento de amostra lectínica contendo cMoL demonstrou que essa proteína é termoestável até 7 h a 100° C;
- cMoL se mostrou ativa na faixa de pH 4,0 - 9,0;
- A presença dos íons Mg^{2+} , Ca^{2+} e K^{+} aumentaram a AH de cMoL;
- cMoL apresentou maior AH frente a eritrócitos de coelho e humanos do tipo AB;
- AH de cMoL foi fortemente inibida por ovalbumina e azocaseína e abolida por asialofetuína;
- Em condições desnaturantes e redutoras uma banda polipeptídica principal de 26,5 kDa foi revelada;
- O peso molecular nativo de cMoL determinado por cromatografia de filtração em gel Sephacryl S-300 foi 30 kDa;
- PAGE confirmou cMoL como uma proteína básica que não foi corada com reagente de Schiff;
- Extrato, F0-60 e cMoL mostraram propriedades coagulantes na água similares ao controle positivo sulfato de alumínio, com elevada e baixa turvação;
- Preparações de sementes de *M. oleifera* e cMoL podem ser utilizadas para remoção de impurezas da água.