

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

**USO DE PLANEJAMENTO FATORIAL NA EXTRAÇÃO DE LECTINAS DE
ENTRECASCA DE *Sideroxylon obtusifolium* (QUIXABEIRA) : PURIFICAÇÃO E
CARACTERIZAÇÃO PARCIAL**

MAURICÉLIA FIRMINO DE SANTANA

Orientadora: Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia

Co-Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Sampaio de Andrade Lima

Recife, 2010

MAURICÉLIA FIRMINO DE SANTANA

**USO DE PLANEJAMENTO FATORIAL NA EXTRAÇÃO DE LECTINAS DE
ENTRECASCA DE *Sideroxylon obtusifolium* (QUIXABEIRA) : PURIFICAÇÃO E
CARACTERIZAÇÃO PARCIAL**

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

Recife, fevereiro de 2010

Santana, Mauricélia Firmino de

Uso de planejamento fatorial na extração de lectinas de entrecasca de *Sideroxylon obtusifolium* (quixabeira) : purificação e caracterização parcial / Mauricélia Firmino de Santana . – Recife: O Autor, 2010.

70 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Maria Tereza dos Santos Correia.

Co-Orientadora: Cláudia Sampaio de Andrade Lima.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.

CCB. Bioquímica e fisiologia, 2010.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Proteínas 2. Lectinas 3. Hemaglutinina I. Título.

572.6

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2010-138

Mauricélia Firmino de Santana

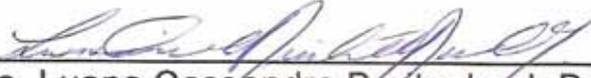
“Uso de planejamento fatorial na extração de lectina de entrecasca de *Sideroxylon obtusifolium* (quixabeira): purificação e caracterização parcial”

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:



Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia
Presidente



Profa. Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho



Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva



Profa. Dra. Márcia Vanusa da Silva

Data: 25 / 02 / 2010

*“Aos meus pais, Severina Rosa e Paulo Firmino,
e a todos que fazem da ciência um caminho
de encontros, de conhecimentos do mundo e de si mesmo”.*

*“Sábio não é quem nunca erra,
mas quem usa os seus erros para crescer”.*

(Augusto Cury)

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	VII
RESUMO	IX
ABSTRACT	X
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XI
LISTA DE FIGURAS	XII
LISTA DE TABELAS	XIII
1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Histórico das Lectinas.....	14
1.1.1 Conceito.....	17
1.1.2 Classificação.....	17
1.1.2.1 Subdivisões das lectinas de acordo com a ocorrência e especificidade.....	17
1.1.2.2 - Subdivisões de lectinas vegetais de acordo com a estrutura.....	18
1.1.3 Lectinas de plantas (famílias).....	19
1.1.3.1 Lectinas de leguminosa.....	19
1.1.3.2 Lectinas do floema de Cucurbitaceae.....	19
1.1.3.3 Lectinas relacionadas à jacalina.....	19
1.1.3.4 Lectinas ligadoras de quitina.....	19
1.1.3.5 Lectinas de Amaranthaceae.....	20
1.1.4 Funções Biológicas.....	20
1.1.5 Aplicações Biológicas.....	22
1.2 Planejamento Fatorial.....	23
1.3 Famílias das Sapotáceas.....	25
1.4 <i>Sideroxylon obtusifolium</i>	27
2. OBJETIVOS.....	31
2.1 Objetivo Geral.....	31
2.2 Objetivos Específicos.....	31
3. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	32
4. ARTIGOS A SER SUBMETIDO.....	41

4.1 Capítulo	41
5. CONCLUSÃO.....	65
6. ANEXOS.....	66
Instruções aos Autores.....	67
Resumo SBBq 2009.....	70

AGRADECIMENTOS

A maior gratidão que posso externar é em Deus que em meios a tantos desafios de minha existência sempre esteve presente, levando-me a acreditar na vida, além dos meios palpáveis e através de todas as dificuldades, ensina que, quando permitimos o seu comando em nossas vidas, podemos perceber quão belo e incrível é viver, é ter um caminho a percorrer.

Agradeço a meus pais Paulo Firmino e Severina Rosa que de modo especial colaborou para minha perseverança em todos os momentos de minha caminhada, em particular a minha mãe que sempre me ensinou a ver além das aparências do aqui e agora, apoiando-me a encarar os desafios da vida com confiança.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudo e apoio científico.

Ao Departamento de bioquímica e a todos que fazem parte deste, que de forma direta ou indireta esteve a disposição para apoiar as atividades de pesquisa, sempre que se fez necessário.

À Prof^a. Dr^a. Maria Tereza por sua orientação, compreensão, espírito humanista e científico em todas as fases da caminhada na pesquisa, a qual sempre esteve atenta as mudanças e colaborou na elaboração de novas nuances da visão científica.

A Prof^a. Dr^a. Cláudia Sampaio por sua paciência e aconselhamento em diferentes momentos da pesquisa, ensinando a olhar para a pesquisa como um processo contínuo, inacabado.

A Dr^a. Tatiana Porto por sua colaboração e criatividade na dinâmica da pesquisa, apoiando a criação de novos modelos metodológico apoiado em sua experiência e visão científica.

A Prof^a. Márcia Vanusa que sempre esteve disposta a apoiar e colaborar nos desafios oriundos da arte de pesquisar e tão bem se dispôs em momentos importantes de nosso projeto.

A Prof^a. Késia. e Rita Mendes do Dep. de antibióticos por sua disposição e apoio na busca por resposta em momentos importantes de nossa pesquisa.

A Prof^a. Vera Meneses por sua discreta participação, porém importante no processo de organização e realização dos tramites de apoio a pesquisa, em sua eficiente administração na coordenação do curso de Pós-graduação do Curso de mestrado em Bioquímica e Fisiologia.

A todos os colegas do Laboratório de Glicoproteínas pela união e apoio na construção da ciência, especialmente a Rosiely, Romero, Fernando, Thiago e Francis por compartilhar conhecimentos e experiências, os quais foram como sementes na colaboração de minha formação científica. Aos técnicos Maria Reis e João Virgínio por sua sempre dedicada atenção e José Roberto por seu entusiasmo e alegria constantes nas atividades desenvolvidas em sua presença.

A Alcides Francisco que, nos últimos momentos da pesquisa, no desafiador cansaço e desestímulo não apenas da pesquisa , mas sobretudo da vida, foi o apoio necessário para recomeçar a acreditar e olhar por além dos obstáculos e acreditar ainda mais que Deus está sempre ao meu lado, a me dá suporte nas fraquezas da vida.

Agradeço em particular a minha nobre e inesquecível amiga Ir. Marieta Santiago Cardoso (Ir. Adelaide), que mesmo não estando fisicamente presente, trouxe para minha vida uma nova versão e visão, ensinou-me em sua admirável sabedoria aos seus 99 anos que, tudo passa, porém tudo tem um fim a se cumprir, estando seu segredo oculto nas conexões discretas, na voz do silêncio interior, que faz do homem um ser imortal. Por meio das influências desta nobre e eterna amiga faço o propósito de lembrar que nossos esforços em busca do entendimento científico, são enriquecedores a vida humana, no entanto o nosso maior arsenal de descobertas e grandezas estão ainda a serem explorados no mais profundo e segredo de todos os universos a serem explorados, na galáxia do nosso interior, onde encontraremos nossas reais origens e fontes da verdadeira felicidade e integração da mente e alma humana.

Resumo

Este trabalho trata da extração de uma lectina da entrecasca de *Sideroxylon obtusifolium* utilizando planejamento fatorial completo seguido da purificação da lectina através de fracionamento salino e cromatografia de afinidade em quitina, além da caracterização parcial e avaliação da atividade antimicrobiana. Os resultados revelaram que as melhores condições de extração, obtidas através do planejamento fatorial $2^4 + 4$ pontos centrais, foi a na temperatura de 4°C, com tempo de extração de 4h, em pH 6,0 e com a concentração de NaCl 0,15 M. A partir destes dados, extrações em tampão citrato fosfato e fosfato de sódio, na faixa de pH (6,0 a 7,5) foram efetuados sendo selecionada a extração em tampão citrato fosfato, pH 6,5; o qual apresentou melhor atividade hemaglutinante específica (AHE) com eritrócitos de coelho. O fracionamento salino revelou que a fração 60-80% (F60-80) foi a que apresentou a maior AHE, a qual foi parcialmente inibida por glicose e totalmente inibida por N-acetil-D-glicosamina. A lectina denominada SoBL (*Sideroxylon Obtusifolium* Bark Lectin) foi obtida da cromatografia em quitina após eluição com ácido acético 1 M. SoBL é uma proteína termoestável, mantendo sua AH até 100°C, após 30 min de aquecimento. A avaliação da estabilidade frente a diferentes valores de pH indicou que a lectina apresentou maior AH no pH de 5,0. SDS-PAGE mostrou que SoBL é uma lectina de baixa massa molecular (6,0 kDa) e não glicosilada. SoBL (40µg) não inibiu o crescimento das bactérias *Bacillus subtilis*, *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiela pneumoniae* e dos fungos do gênero *Fusarium*. Em conclusão, uma lectina termoestável e de baixa massa molecular foi obtida da entrecasca de *S. obtusifolium* por cromatografia de afinidade em quitina, a qual aparentemente, não apresentou atividade antimicrobiana.

Palavras-chave: Planejamento Fatorial; lectina; *Sideroxylon obtusifolium*; atividade antimicrobiana.

Abstract

This work aims to extract a lectin from *Sideroxylon obtusifolium* bark using complete factorial design followed by purification of the lectin by salt fractionation and affinity chromatography on chitin, as well as partial characterization and evaluation of the antimicrobial activity. The results showed that the improved extraction conditions, obtained by factorial design of $2^4 + 4$ central points, was in extraction time of 4 hours at 4 °C, in pH 6.0 with NaCl concentration of 0.15 M. In brief, extractions were made in citrate phosphate and sodium phosphate buffers, with pH ranging from 6.0 to 7.5. Selected extraction was in phosphate citrate buffer (pH 6.5) which showed better specific hemagglutinating activity (SHA) using rabbit erythrocytes. Salt fractionation revealed that the fraction 60-80% (F60-80) had the highest SHA, which was partially inhibited by glucose and completely inhibited by N-acetyl-D-glucosamine. The SoBL (*Sideroxylon obtusifolium* bark lectin) was obtained by chromatography on chitin after elution with acetic acid 1 M. SoBL is thermostable, maintaining their HA at 100°C after 30 min of heating. The evaluation of stability against different pH values indicated that the lectin showed higher HA in pH 5.0. SoBL showed a single band of 6.0 kDa and is a glycoprotein by SDS-PAGE. SoBL (40µg) did not inhibit microbial growth of *Bacillus subtilis*, *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*; no inhibited the growth of fungi of the genus *Fusarium*. In conclusion, a thermostable lectin was obtained from the bark of *S. obtusifolium* by affinity chromatography on chitin, which apparently does not showed antimicrobial activity.

Keywords: factorial design; lectin; *Sideroxylon obtusifolium*; antimicrobial activity.

LISTA DE ABREVIATURAS

AH: Atividade hemaglutinante

AHE: Atividade hemaglutinante específica

BSA: Albumina sérica bovina

EB: Extrato Bruto

SDS: Sulfato sódico de dodecila

SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo sulfato sódico de dodecila

SoBL: Lectina obtida de entrecasca de *Sideroxylon obtusifolium*

LISTA DE FIGURAS

<u>DISSERTAÇÃO</u>	Pág.
Figura 1: Interações entre carboidratos de superfície celular e lectinas.	21
Figura 2: Família sapotaceae. (A) <i>Argania spinosa</i> , (B) <i>Chrysophyllum imperiale</i> (C) madeira de <i>Manilkara elata</i> (maçaranduba), (D) <i>Pouteria lucuma</i> (E) frutos de <i>Sideroxylon obtusifolium</i> (F) frutos de <i>Pouteria lucuma</i>	26
Figura 3: <i>Sideroxylon obtusifolium</i> . (A) <i>S. obtusifolium</i> , (B) Fruto de <i>S. obtusifolium</i> , (C) Madeira de <i>S. obtusifolium</i> .	28
 <u>ARTIGO</u>	
Figura 1: Esquema cúbico da AH, obtido no desing da tabela 1	62
Figura 2: Cromatografia em quitina.	63
Figure 3: SDS-PAGE de SoBL	64
Figure 4: Avaliação da estabilidade da lectina em AHE frente a variação de pH e temperatura	65

LISTA DE TABELAS

<u>DISSERTAÇÃO</u>	<u>Pág.</u>
Tabela 1 - Famílias de lectinas de plantas e animais	18
Tabela 2 - Planejamento fatorial completo	25
 <u>ARTIGO</u>	
Tabela 1 - Planejamento fatorial completo	58
Tabela 2 - Planejamento fatorial completo do extrato da entrecasca de <i>Sideroxylon obtusifolium</i> .	59
Tabela 3 – Tabela de purificação da lectina da entrecasca <i>Sideroxylon obtusifolium</i> .	60

1. INTRODUÇÃO

1.1 Histórico das lectinas

A ocorrência na natureza de proteínas que aglutina hemácias é conhecida desde o fim do século XIX. Acredita-se que a primeira descrição de hemaglutininas foi feita por Stillmark em sua tese de doutoramento apresentado em 1888 (FRANZ, 1988). Esta hemaglutinina, altamente tóxica, foi isolada a partir de sementes de mamona (*Ricinus communis*) e foi denominada de ricina. Posteriormente, descobriu-se a presença de uma outra hemaglutinina tóxica, a abrina, nos extratos do feijão *Abrus precatorius* (jequiriti). Ricina e abrina logo se tornaram comercialmente disponível, o que levou a estimular sua aplicação como modelos antigênicos para estudos imunológicos. Após mais de um século de pesquisas, as lectinas tornaram-se imprescindíveis ferramentas biológicas, especialmente por sua aplicabilidade em biotecnologia (SHARON & LIS, 2004). Os primeiros resultados obtidos por Stillmark indicaram propriedades seletivas da ricina, induzida por diferenças na aglutinação dos glóbulos vermelhos de distintos animais. Essa observação foi confirmada e ampliada por Karl Landsteiner, quase uma década mais tarde, ao relatar que as atividades relativas à hemaglutinação de extratos de sementes diversas, foram bastante diferentes, quando testado com hemácias de diferentes animais (Landsteiner & Raubitschek, 1907). Devido a esta especificidade, Landsteiner concluiu que as ações de hemaglutininas de planta assemelhavam-se a reações de anticorpos em todos os fundamentos". Portanto, estas proteínas foram usadas para ilustrar o conceito de especificidade no capítulo introdutório do seu livro clássico - A Especificidade das Reações Sorológicas - (1936).

Em 1919, James B. Sumner isolou do feijão (*Canavalia ensiformis*) uma proteína que ele nomeou de concanavalina A e desta forma obteve pela primeira vez uma hemaglutinina pura. No entanto, quase duas décadas se passaram antes de Sumner e Howell (1936) relatarem que concanavalina A aglutinava células, como hemácias e leveduras e também precipita glicogênio em solução. Eles também mostraram que a hemaglutinação foi inibida pela sacarose, demonstrando pela primeira vez, a especificidade das lectinas por açúcar. Baseado nessa observação, eles sugeriram que a hemaglutinação induzida por concanavalina A pode ser consequência de uma reação com carboidratos na superfície das células vermelhas.

Duas importantes descobertas ocorreram no início da década de 1960, a primeira delas foi a descoberta de que a lectina do feijão vermelho (*Phaseolus vulgaris*), conhecido como fitohemagglutina (PHA), tinha a capacidade de estimular os linfócitos a sofrerem mitose. Esta descoberta teve um impacto revolucionário sobre a imunologia. Dentro de pouco tempo, várias outras lectinas mostraram atividade mitogênica. De especial importância foi a constatação de que concanavalina A age como um mitógeno e pode ser inibida por baixas concentrações de monossacarídeos, por exemplo, manose. Esta descoberta prova de que a estimulação mitogênica é o resultado da ligação de lectinas a açúcares na superfície dos linfócitos. Lectinas mitogênicas logo se tornaram ferramentas para o estudo da transmissão de sinal para as células e para a análise dos eventos bioquímicos que ocorrem durante a estimulação de linfócitos *in vitro* (SHARON e LIS, 2004). Como consequência destes estudos e através do estímulo de PHA em meio condicionado de linfócitos humanos normais, descobriu-se o fator de crescimento de células T, agora conhecido como interleucina-II (MORGAN et al., 1976).

A segunda descoberta foi com a aglutinina de germe de trigo (WGA), a qual tem a capacidade de aglutinar preferencialmente células malignas (AUB et al. 1963, 1965). Esta característica foi também percebida com outras lectinas como a concanavalina A e a aglutinina de soja (SBA). Tais investigações forneceram provas que alterações nos açúcares da superfície celular estão associadas com o desenvolvimento do câncer e levou à suposição de que a alta suscetibilidade de aglutinação pelas lectinas foi uma propriedade compartilhada por todas as linhagens de células malignas. Atualmente sabe-se que isto não é uma verdade generalizada.

Embora amplamente demonstrado que ocorrem nas plantas e, com certa restrição, também em invertebrados, poucas lectinas foram isoladas até o início dos anos 1970, e atraíram pouca atenção, apenas três destas (de enguias, caracol, e do caranguejo-ferradura) foram isoladas e caracterizadas. A primeira lectina de animal purificada e específica para L-fucose, foi isolada da enguia (WATKINS & MORGAN, 1952). O isolamento em 1974, da primeira lectina de mamífero, um receptor asialoglicoproteína hepática, específica para galactose, foi o resultado da investigação dos mecanismos que controlam a vida de glicoproteínas na circulação sanguínea, estudado por Anatol G. Morell (HUDGIN et al., 1974; STOCKERT et al., 1974). Em estudos paralelos relatou-se o isolamento do primeiro

membro da família das β -lectinas galactose-específicas, da enguia elétrica, designado galectinas (BARONDES et al., 1994), dos quais mais de uma dúzia de membros que até agora foram caracterizadas (TEICHBERG et al., 1975).

O ritmo do isolamento das lectinas aumentou dramaticamente com a introdução da cromatografia de afinidade para a purificação das mesmas, originalmente pelo isolamento de concanavalina A por dextrana imobilizada (Sephadex) através de estudos pioneiros de Goldstein (AGRAWAL & GOLDSTEIN, 1967). Desde o início da década de 1980, o número de lectinas animais purificadas cresceu rapidamente, em grande parte, graças ao advento das técnicas de recombinação. No final da década de 1980, um número considerável de informações se tornou disponíveis, após o advento de técnicas como, cristalografia de raios X e mutagênese localizada e dirigida. Concluiu-se dessa forma, que as lectinas reconhecem açúcares de diversas maneiras, assim como outras proteínas reconhecem seus ligantes (SHARON, 1993).

Os estudos com lectinas começaram a se tornar alvo de maior atenção com a demonstração de que as lectinas são ferramentas extremamente úteis para a investigação de carboidratos na superfície das células, indicando as alterações que estas sofrem por malignidade, bem como para o isolamento e caracterização de glicoproteínas. Nos anos subsequentes, numerosas lectinas tem sido extraída a partir de plantas, bem como a partir de microrganismos e animais, e durante as duas últimas décadas, as estruturas de centenas deles foram estabelecidas. Paralelamente, foi demonstrado que as lectinas funcionam como moléculas de reconhecimento de célula-molécula e interações célula-célula em uma variedade de sistemas biológicos (SHARON e LIS, 2004).

Desta forma, as lectinas de plantas são importantes ferramentas em glicobiologia e glicobioquímica devido à multiplicidade de eventos que se pode conhecer em função da sua habilidade. Esta habilidade só foi devidamente explorada segundo sua importância quando a comunidade científica se deu conta que os oligossacarídeos compreendem um extraordinário sistema de armazenagem de informação de alta densidade, constituindo o código do açúcar (GABIUS et al. 2002). A partir daí, as lectinas têm sido largamente utilizada na investigação estrutural e funcional de carboidratos complexos, glicoproteínas e para examinar mudanças decorrentes de processos fisiológicos e patológicos na superfície celular. Portanto, o desenvolvimento da glicociência sempre estará atrelado às lectinas.

1.2 Conceito

As lectinas consistem em uma classe de proteínas de origem não-imunológica. de distribuição ubíqua na natureza e que reconhecem carboidratos livres ou ligados a superfícies celulares através de sítios de ligação nos quais a hidrofobicidade é a principal força de interação (GOLDSTEIN et al.,1980; KENNEDY et al., 1995; PEUMANS & VAN DAMME, 1995; CORREIA et al., 2008). Têm capacidade de aglutinar células e/ou precipitar glicoconjugados devido a sua capacidade específica de reconhecimento e ligação sem, entretanto, alterar a estrutura de nenhum ligante (GOLDSTEIN et al., 1978; LIENER et al, 1986). A dificuldade de definir lectinas deve-se ao fato de sua grande variação no número e na distribuição dos sítios de ligação para carboidrato, de sítios de ligação de carboidrato por subunidade, e no número de subunidade, levando a uma diversidade no nível de organização estrutural.

1.2.1 Classificação

1.2.1.1 Subdivisões das lectinas de acordo com a ocorrência e especificidade

Dentre o grande número de lectinas já conhecidas, percebe-se que há uma grande variedade de especificidade tanto para mono como para oligossacarídeos. Desta forma, a especificidade oligossacarídea tem sido definida para aquelas lectinas que não sejam inibidas por monossacarídeos, podendo, então classificar as lectinas não específicas para o sistema ABO como proteínas que apresentam especificidade mono e/ou oligossacarídica. Os sítios de ligação de carboidratos em lectinas reconhecem o carboidrato ligante, e a ele se ajustam basicamente como o modelo chave-fechadura (KENNEDY et al., 1995).

De acordo com Sharon (Sharon & Lis, 2004), lectinas de plantas e animais demonstram características estruturais, composição da estrutura primária e nível de glicosilação distintos. Entretanto, ambas podem ser reunidas e classificadas com base na especificidade para carboidratos, estrutura molecular e ocorrência.

Tabela 1 - Famílias de lectinas de plantas e animais

Superfamília	Família	Especificidade	Lectina	Referência
Lectina de vegetais	Lectina de leguminosas	Glicoseo diversas	<i>Conylin maffii</i> (Cumali I)	Correia e Coelho, 1993
	Lectina de flozans arabidinoso	(GlcNAc) _n	<i>Urtica dioica</i>	Van Damme et al., 1998
	Jacelina relacioneche	Glicoseo diversas	<i>Arizocarpus integrifolia</i> (jacelina)	Van Damme et al., 1998
	Ligandans de quitina (heveína, RIF tipo-2 e mannoetilglicinas)	(GlcNAc) _n e Mannose	Heveína do látex de <i>Hevea brasiliensis</i> e RCA.	Van Damme et al., 1998
	Amerantócos	GalNAc	ACA	Van Damme et al., 1998
Lectina tipo C	Selectina	Birdy-Lewis ^x	P-Selectina	Morris et al., 1992
	Colectina	Ligante de Colágeno	—	Kuwasaki et al., 1978
	Lectinas endocitosis	Asialoglicoproteínas	—	Sharon and Lis, 2004; Driekamer, 1988
	Postcitosas		—	
Lectina tipo P	Receptor manose-6P	Mannose-6P	—	Hoflack e Korfeld, 1983
Lectina tipo S	Colectina	β -galactofide	Colectina-1	Berendes et al., 1994
Lectina tipo N	—	Glicoseo complexas	IL-2	Shurblom et al., 1989
Ig	Sialinas*	Glicoseo complexas	Sialinas (sialin-4)	Cooker et al., 1994

GalNAc, N-acetilgalactosamina; GlcNAc, N-acetilglicosamina; ^x NeuAc α (2-3)Gal β (1-4)[Fuc α (1-3)]GlcNAc;

* Esta família de lectina Ig conjugadas ligantes de ácido siálico, um membro da Superfamília Ig (SHARON AND LIS. 2004)

1.2.1.2 - Subdivisões de lectinas vegetais de acordo com a estrutura

Segundo Van Damme et al (1996), as lectinas vegetais podem ser classificadas de acordo com a característica estrutural em:

- merolectinas - são monovalentes e, por isso, não precipitam glicoconjugados ou aglutinam células. São representadas pela família da heveína;

- hololectinas - possuem dois ou mais sítios de ligação a carboidratos que são idênticos ou muito semelhantes; esse grupo compreende as lectinas que são capazes de aglutinar células e/ou precipitar glicoconjugados;

- quimerolectinas - são proteínas com um ou mais sítios de ligação a carboidratos e um domínio não relacionado. Esse domínio diferente pode ter atividade enzimática bem definida, ou outra atividade biológica, mas age independentemente do domínio ligante a carboidrato. Assim representadas pelos grupos RIFs tipo 2 e quitinase de plantas tipo I;

- superlectinas - são proteínas com dois domínios de ligação a carboidratos. Esse pode ser considerado um grupo especial de quimerolectinas, consistindo de dois domínios estrutural e funcionalmente diferentes de ligação a carboidratos, como a lectina TGL da

tulipa gesneriana L., que são formados por dois domínios de ligação a carboidrato, que reconhecem D-manose e L-fucose, respectivamente.

1.2.2 Lectinas de plantas (famílias)

1.2.2.1 Lectinas de leguminosa

Esta família é encontrada exclusivamente em leguminosa (Sharon & Lis, 2002). Todas são homólogas no nível molecular, mas mostram variação na especificidade ao carboidrato. Essa ampla especificidade certamente contribui para o sucesso dessa família de lectinas como ferramenta biotecnológica. Algumas lectinas estão envolvidas na simbiose entre legumes e a fixação de nitrogênio da bactéria do gênero *Rhizobium* (Van Damme et al., 1998).

1.2.2.2 Lectinas do floema de Cucurbitaceae

Muitas espécies de Cucurbitaceae contêm alta concentração de lectinas que ligam a oligômeros de GlcNAc. As lectinas do floema de Cucurbitaceae são proteínas diméricas, compostas por duas subunidades idênticas de 24kDa. Todas as lectinas conhecidas dos floemas de Cucurbitaceae mostram grau de similaridade seqüencial, mas não têm qualquer similaridade com outras famílias de lectinas de plantas (Peumans & Van Damme, 1998).

1.2.2.3 Lectinas relacionadas à jacalina

São lectinas específicas à galactose de sementes da fruta jaca (*Artocarpus integrifolia*). Lectinas similares têm sido encontrados em poucas espécies de *Artocarpus* e em *Maclura pomifera* (Young et al., 1989).

1.2.2.4 Lectinas ligadoras de quitina

A proteína ligante de quitina (polímero de N-acetil-glicosamina) contém o chamado domínio(s) heveína(s). O termo “heveína” refere-se à pequena proteína de 43 resíduos de

aminoácidos, encontrados no látex de árvores de seringueira, *Hevea brasiliensis* (Waljuno et al., 1975). As quitinases classe I, por exemplo, são quimerolectinas compostas por um único domínio heveína, ligado a um domínio catalítico com atividade quitinásica (Sharon & Lis, 2004). Proteínas inativadoras de ribossomo (RIP), tipo 2, são quimerolectinas compostas de um polinucleotídeo constituído por um domínio adenosina glicosidase (cadeia A), ligado ao domínio ligante a carboidrato (cadeia B). A maioria das RIP, tipo 2, liga-se preferencialmente a Gal ou GalNAc. A RIP, tipo 2, tem sido encontrado em plantas das famílias Euphorbiaceae, Fabaceae, entre outras (Peumans & Van Damme, 1998).

1.2.2.5 Lectinas de Amaranthaceae

Clonagem molecular e análise de difração de raios X revelaram que amarantina, uma lectina de semente de *Amaranthus caudatus* não se assemelha a qualquer outra lectina de planta com relação à seqüência de aminoácidos e à estrutura tridimensional (Transue et al., 1997). Com base nesses dados, a amarantina é agora considerada como um protótipo da família de lectina amarantina, uma lectina ligante específica de N-acetilgalactosamina (Van Damme et al., 1998).

1.3 Funções Biológicas

O papel fisiológico das lectinas tem sido alvo de especulações e investigações, mas admite-se que a função primária das lectinas seja a de reconhecimento, esta função se manifesta de maneira distinta em diferentes órgãos e tecidos do mesmo organismo (LIS & SHARON, 1981; LIS & SHARON, 1986). Em animais, lectinas de membranas parecem participar na endocitose e na translocação intracelular de glicoproteínas (ASHWELL & HARFORD, 1982), na ligação de bactérias a células epiteliais (ASHKENASI & MIRELMAN, 1984) e na regulação de migração e na adesão celular (GABIUS et. al., 1985). Para lectinas solúveis de vertebrados foi proposto uma função comum, a de ligar glicoconjugados presentes em células (BARONDES, 1984). As lectinas de microorganismos atuam como determinantes de reconhecimento em fagocitose não imunológica (SILVERBLAT & COHEN, 1979), como determinantes de reconhecimento

em adesão de células de *Dictyostelium discoideum* (SPRINGER et al., 1985), e atuam na ligação a célula hospedeira (VANDERBERG et al., 1985).

O papel de lectinas em plantas tem sido estudado mais sem que ainda exista uma proposta conclusiva. Dentre os papéis biológicos detectáveis nas lectinas vegetais, podemos citar sua ação fungicida, antimicrobiana e inseticida, além de mimetizar as selectinas humanas e estimular células do sistema imune (FREIRE, 2003). Num sentido mais amplo, a discussão sobre as funções das lectinas implica na capacidade de agir como moléculas de reconhecimento no interior das células, na superfície da célula, e em fluidos fisiológicos (SHARON & LIS, 2004).

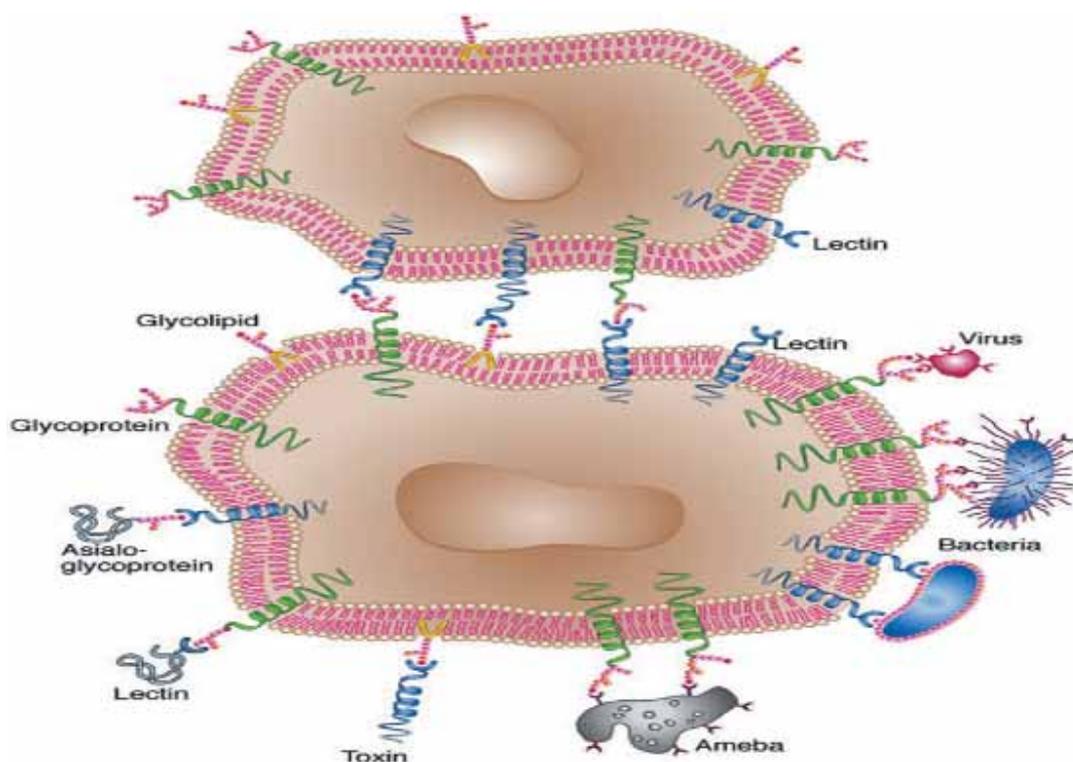


Figura 1 - Interações entre carboidratos de superfície celular e lectinas.

Lectinas de superfície celular ligam em particular glicoproteínas (por exemplo asialoglicoproteínas), quando em outros casos os carboidratos da superfície celular, glicoproteínas e glicolípídios servem como sítios de conexões para moléculas biologicamente ativas que reconhecem, elas mesmas são lectinas (por exemplo carboidrato específico de bactérias e toxinas de plantas, ou galectinas) Baseada no diagrama original da BioCarbAB (Lund, Suécia). Fonte: Sharon & Lis (2004).

As funções das lectinas de animais abrangem um espectro de variedades que, e em termos gerais, são consideradas moléculas de reconhecimento dentro do sistema imune, especificamente, implicadas na defesa contra patógenos, trânsito celular, regulação da resposta imune e na atuação da auto-imunidade (KILPATRIK, 2002). Questões sobre o papel biológico extrínseco das lectinas de plantas vêm sendo investigadas e revisadas, refletindo a potencialidade e diversidade de atividades destas proteínas frente a predadores e fitopatógenos em vegetais. Dentre elas, atividade antifúngica, inseticida, antinutricional e tóxica vêm sendo objeto de intensa pesquisa. Investigações concernentes aos mecanismos de ação, diversidade de organismos em que elas atuam, as concentrações que promovem atividade e aplicações nos ramos agrícolas (cultivos de plantas transgênicas resistentes a pragas), farmacêutico (como agentes terapêuticos contra fungos e bactérias causadoras de patologias em humanos) e no estudo de reações tóxicas em animais têm sido amplamente divulgadas (SELITRENNIKOFF, 2001; CARLINI & GROSSI DE SÁ, 2002; VASCONCELOS & OLIVEIRA, 2004).

1.4 Aplicações Biológicas

Graças ao arsenal de técnicas como modelagem, RMN, microcalorimetria e mapeamento químico de complexos de um ligante com diferentes lectinas, as análises estruturais dos sítios de interação carboidrato-lectina, bem como sua afinidade pode ser elucidada e discutida com muita precisão. Estes estudos fornecem informações valiosas para o desenvolvimento de miméticos que desempenham afinidade superior aos ligantes naturais da lectina alvo (por exemplo, aquelas que envolvidas na adesão de agentes infecciosos, de células e na cascata metastásica) que atuariam como dispositivos de bloqueio, resultando em substâncias promissoras a serem testadas para as mais variadas aplicações (DUDIGER et al., 2000; HAYASHIDA et al., 2003; NEUMANN et al., 2004).

A utilização de lectinas como mediadoras no transporte de drogas também vem sendo explorada por diferentes estratégias, tais como o emprego de lectina carreadora específica de drogas, já que células tumorais ou transformadas expressam glicanas de superfície celular diferente das células normais; podem ser utilizadas como coadjuvantes da absorção de drogas porque, ao acionar o transporte vesicular, algumas lectinas sofrem endocitose pelas células epiteliais do trato gastrointestinal, como mostram os estudos com

aglutininas de germe de trigo, (WGA), lectina de tomate (TL) e Con-A (RUSSEL-JONES, 1999; APUD BIES et al., 2004; LEHR, 2002; BIES et al., 2004).

1.5 Planejamento Fatorial

O isolamento das lectinas ocorre por meio do processo extrativo, sendo esses diversificados e aprimorados para cada espécie em estudo, na obtenção de proteína são utilizados métodos de pulverização do material, seguido de sua dissolução em tampão com um pH que favoreça a melhor condição extrativa. As diferentes soluções aquosas utilizadas no processo extrativo são adaptadas a algumas variáveis que são utilizadas para se obter uma condição adequada para a estabilidade da lectina, sendo o planejamento fatorial um importante instrumento para identificar estas condições favoráveis de forma clara. Para facilitar o processo extrativo e para melhor selecionar uma solução aquosa com maior eficiência, tem-se recorrido a métodos alternativos, como o planejamento fatorial, que visa tornar hábil o processo de extração e possibilita o conhecimento das interações entre as variáveis que interferem na extração.

Com a utilização do planejamento fatorial é possível tornar muito mais eficiente os métodos usuais já estabelecidos, pois este leva em consideração algumas variáveis relacionadas entre si de forma a estabelecer um vínculo entre diferentes variáveis sem necessitar averiguar passo a passo cada uma delas isoladamente, facilitando assim o tempo e a quantidade de reagentes e amostras a serem utilizados. Atualmente a possibilidade de obtenção de uma grande quantidade de dados numéricos tem crescido em todos os campos da ciência, incluindo a química analítica, devido ao desenvolvimento de novas técnicas e instrumentação que permitem uma resposta de forma mais rápida (VALCÁRCEL, 1997). Neste contexto, a aplicação de ferramentas estatísticas é de fundamental importância, principalmente para explorar e entender uma gama crescente de dados e informações originadas de um sistema (BEEBE et al., 1987).

O planejamento fatorial de experimentos é uma ferramenta utilizada em otimizações de processos que reduz a quantidade de ensaios a serem realizados no experimento, através de "design" de aproximações geométricas que proporcionam de uma forma simples, confiável e eficiente analisar dados, já que se utiliza à metodologia de análise de superfície

de resposta (ASR). ASR é uma técnica estatística muito útil para a modelagem e análise de problemas nos quais as respostas são influenciadas por várias variáveis (fatores). Seus modelos são avaliados por parâmetros estatísticos específicos, contidos na metodologia de análise de variância dos dados (ANOVA). Nesta metodologia de otimização, as variáveis independentes são conhecidas como sendo os fatores, e suas variações são chamadas de níveis, enquanto que as variáveis dependentes são tidas como respostas (BARROS NETO et al., 1995 e 2001).

Os fundamentos e aplicações de técnicas de estatística multivariada para a otimização de sistemas de cromatografia, tem sido utilizada e relacionada também com a otimização de outras etapas do aperfeiçoamento experimental. Metodologias de resposta de superfície usando design central composto e matriz, para otimização das etapas de preparação da amostra (extrações) e a determinação das condições experimentais para separações em fase gasosa tem sido realizadas com sucesso, fornecendo importantes informações para otimização de sistemas cromatográficos (FERREIRA et al., 2007). Metodologias experimentais usando planejamento experimental têm sido utilizadas em diferentes áreas de conhecimentos, desde a pesquisa em laboratório à produção em trabalhos de desenvolvimento industrial. Um exemplo de uso desta metodologia em indústrias é observado no planejamento experimental aplicado ao estudo de misturas, para avaliar a potencialidade do uso conjunto dos resíduos do beneficiamento do caulim e da serragem do granito para a produção de blocos e revestimentos cerâmicos, os quais são realizados, sendo ajustados modelos matemáticos de regressão relacionando a absorção de água e o módulo de ruptura com as proporções das matérias-primas. Os resultados mostraram que o procedimento de planejamento experimental utilizado permite maximizar a quantidade de resíduo incorporado às formulações para blocos e revestimentos cerâmicos, sendo possível a incorporação de teores de resíduos de até 50% em formulações para a produção de blocos cerâmicos e de até 40% em composições para a produção de revestimentos cerâmicos (CAMPOS et al., 2007). Na literatura abordando a reciclagem de resíduos como matérias-primas cerâmicas alternativas observam-se poucos estudos, desta forma o planejamento fatorial tem demonstrado ser um método eficiente também no campo industrial, servindo ao mesmo tempo de suporte a proteção e conservação ao meio ambiente.

Os estudos de extração com *Sideroxylon obtusifolium* foram feitos baseados em planejamentos experimentais propostos por Barros-Neto (2002). Existem vários fatores que interferem no processo de extração de uma lectina e eles foram analisados, sendo determinado o nível de significância e a interação entre estes fatores sobre a atividade hemaglutinante. Desta forma fatores como temperatura, tempo de extração e concentração salina foi analisada, sendo estes fatores independentes, e por meio das interações destes fatores com os níveis de variações (valores quantitativos) dos mesmos foram correlacionados, obtendo como resposta as variáveis dependentes, as quais são os resultantes destas interações gerando os conhecimentos das melhores e mais eficientes condições extrativas. Na **tabela 2**, encontram-se as variáveis contendo os níveis selecionados para a extração de acordo com a literatura (OLIVEIRA et al., 2009).

Tabela 2 - As variáveis contendo os níveis selecionados para a extração e obtenção da lectina utilizando planejamento fatorial completo $2^4 + 4$ pontos centrais.

VARIÁVEIS	- 1	0	+1
pH	6,0	7,0	8,0
NaCl (M)	0	0,075	0,15
Tempo (h)	4	8	16
Temperatura (°C)	4	27	40

Estes valores foram selecionados de acordo com os padrões mais comuns utilizados nos trabalhos com lectinas.

1.6 Famílias das Sapotáceas

A família sapotácea possui 53 gêneros nos quais se distribuem cerca de 1100 espécies de distribuição pantropical, em florestas pluviais situadas em altitudes inferiores a 1000 metros. No Brasil, ocorrem 14 gêneros e cerca de 200 espécies, principalmente na Floresta

Amazônica. Na Mata Atlântica são encontradas 63 espécies, distribuídas em nove gêneros, metade das quais endêmicas. Os gêneros mais ricos em espécies e endemismos são *Pouteria* e *Chrysophyllum*. O maior número de endemismos é encontrado nas florestas do Espírito Santo e sul da Bahia, dentro do Corredor Central de Biodiversidade, inclui árvores e arbustos (**Figura 2, A-F**).



Figura 2 - Fotos de representantes da família Sapotaceae (A) *Argania spinosa*, (B) *Chrysophyllum imperiale* (C) madeira de *Manilkara elata* (massaranduba) (D) *Pouteria lucuma* (E) frutos de *Sideroxylom obtusifolium* (F) frutos de *Pouteria lucuma*. Fonte: <http://pt.wikipedia.org>

A família inclui diversas espécies frutíferas como o Abiu ou Caimito (*Pouteria caimito*) e a Lucuma (*Pouteria lucuma*), apreciados na culinária e por ser uma fonte rica de vitaminas, ferro e carboidratos. *Manilkara elata* (Maçaranduba) fornece madeira de qualidade e que são exploradas em algumas aplicações como construção civil e material para soalho sendo também resistente a ataques de fungos e insetos. Algumas espécies têm o óleo extraído das sementes (*Pouteria butyrocarpa*) e outras fornecem o látex retirado em

diferentes partes da planta (PENNINGTON, 1990). Uma característica bem marcante nessa família além do látex branco, que pode ser encontrado no tronco, ramos e frutos, podendo ser usado para a fabricação de goma de mascar, outras possuem frutos comestíveis. As estruturas secretoras são responsáveis pela produção de um grande número de substâncias que desempenham diferentes funções nas plantas como defesa contra a herbivoria, atração de polinizadores e adaptação ambiental. De acordo com Fahn (2000), os estudos sobre tecidos secretores enfocando a anatomia e sua aplicação na sistemática; a natureza das substâncias secretadas e a respectiva importância econômica têm dado lugar aos relacionados à ultra-estruturas celular, citoquímica e biofísica.

As espécies da família Sapotácea são caracterizadas pela diversidade das substâncias resultantes do seu metabolismo secundário, como triterpenos, esteróides, taninos, polifenóis além de alcalóides, caroteno, compostos cianogênicos, carboidratos e ácidos graxos (BELTRÃO, 2000; PERFEITO et al., 2005; MONTENEGRO et al., 2006; BARBOSA-FILHO et al., 2008). Apesar de toda essa riqueza ainda se tem poucas informações sobre a ecologia, botânica, estrutura, dinâmica e potencial madeireiro da maioria das espécies de Sapotáceas (CASTRO & CARVALHO, 2008).

1.7 Sideroxylon obtusifolium

Sideroxylon obtusifolium, conhecida popularmente como quixaba, quixabeira ou rompe gibão é uma planta da flora brasileira que ocorre em diferentes tipos de solo como savanas e sertões. Consiste em uma árvore de até 15m de altura, da família das sapotáceas, nativa do Brasil, mais precisamente dos estados do Piauí e de Minas Gerais. A madeira é dura e muito resistente, a casca tem propriedades adstringentes e tonificantes; as folhas e os frutos são forrageiros. No Brasil existem cerca de 500 espécies de plantas frutíferas, na sua maioria ainda pouco estudadas (VIEIRA NETO, 2002). Dentre elas está a quixabeira, que ocorre na região da caatinga no Nordeste, na restinga da costa litorânea do Ceará, do Rio Grande do Sul e no Pantanal Mato-Grossense, sendo muito freqüente no Vale do São Francisco. É característica das várzeas úmidas e da beira de rios da caatinga arbórea, das restingas litorâneas e da mata chaquenha do Pantanal Mato-Grossense (LORENZI, 1998). Na época da escassez pluvial e fluviométrica, serve de alimento para o gado. Em sua estrutura física a mesma possui espinhos fortes, folhas coriáceas, flores aromáticas e bagas roxo-escuras, doces e comestíveis (**Figura**

3). Ela é considerada uma planta medicinal e é bastante utilizada por possuir propriedades antiinflamatórias e hipoglicêmicas e sua casca tem propriedades tônicas, adstringentes. Dada à intensa utilização de sua casca e a falta de cultivo da planta, tornaram rara sua ocorrência no habitat natural, sendo hoje em dia considerada como uma planta em extinção (AGRA et al., 2007).



Figura 3 - Fotos de *Sideroxylon obtusifolium*. Fonte: <http://pt.wikipedia.org>

Sideroxylon obtusifolium é uma planta da flora brasileira que ocorre em diferentes tipos de solo, na savana e no sertão, algumas espécies pertencentes à família sapotácea também são empregadas como anti-hiperglicemiante. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), 194 milhões de pessoas sofrem desta doença em todo o mundo. No Brasil, estima-se a afetar 12 milhões nos próximos anos. As espécies da família Sapotácea são caracterizadas pela diversidade das substâncias resultantes do seu metabolismo secundário, como triterpenos, esteróides, taninos, polifenóis além de alcalóides, carotenos, compostos cianogênicos, carboidratos e ácidos graxos (BELTRÃO, 2000; PERFEITO et al., 2005; MONTENEGRO et al., 2006; BARBOSA-FILHO et al., 2008).

Estudos sobre plantas medicinais usadas na medicina popular, foram realizados a fim de busca de novas drogas hipoglicemiantes (BARBOSA-FILHO et al., 2005; CAVALLI et al., 2007, MENEZES et al., 2007; TORRICO et al., 2007; FERREIRA et al., 2008, FIGUEIREDO & MODESTO-FILHO, 2008, SANTOS et al., 2008). A quixaba destaca-se entre as espécies medicinais consideradas como promissoras no tratamento de diabetes (CARVALHO et al., 2005; SILVA et al., 2004; TRESSENS, 1996). O extrato etanólico da casca da raiz de *S.*

obtusifolium, além da atividade hipoglicêmica, apresenta atividade antiinflamatória significativa (ALMEIDA et al., 1985). A casca do tronco e das raízes de *S. obtusifolium* por serem consideradas adstringentes, tônicas, antiinflamatórias e antidiabéticas, tem amplo uso na medicina popular alternativa, no interior do nordeste (BRAGA, 1976; LIMA, 1989). O extrato aquoso de *S. obtusifolium* é usado popularmente no Brasil, principalmente no tratamento de inflamações ovarianas e contra diabetes (AGRA, 1996; AGRA et al., 2007; CARVALHO et al., 2005).

Em estudos para avaliação da atividade antioxidante e a capacidade cicatrizante e anti-inflamatória tópica do extrato etanólico da entrecasca da *S. obtusifolium* foram utilizados o modelo de seqüestro do radical livre e o modelo de ferida e cicatrização cutânea em ratos. O grau de cicatrização observado pela tensão necessária que foi aplicada para romper a ferida demonstrou que, o extrato etanólico usado da entrecasca da *S. obtusifolium* não apresentou atividades cicatrizante e antiinflamatória, no entanto apresentou forte ação antioxidante (REIS et al., 2009). Os taninos e os triterpenos presentes na quixabeira podem estar relacionados com a atividade hipoglicêmica desta planta. Do extrato etanólico das cascas das raízes desta planta obtém-se o ácido bássico, um triterpeno insaturado que promove o aumento dos níveis de insulina plasmática (NAIK et al., 1991). Além do ácido bássico, outros triterpenos, como o taraxerona, o tarxerol e o eritridiol, alguns esteróides foram isoladas da casca desta espécie (LORENZI E MATOS, 2002). Esteróides e triterpenos com hipoglicemiantes e antiinflamatórias atividades foram isoladas de *Sideroxylon obtusifolium* (ALMEIDA et al., 1985, NAIK et al., 1991). O ácido bássico, encontrado no extrato alcoólico, preparado com a casca do caule de *S. obtusifolium*, possui uma significativa atividade hipoglicemiante, além de aumentar os níveis de insulina plasmática (MATOS, 2007).

Sua ocorrência segundo Lorenzi (1998), se dá preferencialmente em solos argilosos e ricos em cálcio e apresenta distribuição predominantemente descontínua ao longo da área que ocupa. A árvore é perenifólia e possui copa densa e elegante, sendo utilizada com sucesso na arborização de fazendas, tanto no Pantanal Mato-Grossense como na região Nordeste. A madeira também é usada em carpintaria e no artesanato, por exemplo, na modelagem de esculturas (carrancas). Os frutos, denominados de quixabas, são comestíveis e avidamente procurados por pássaros e outros animais silvestres. A casca tem aplicações medicinais. A espécie floresce durante os meses de outubro e novembro, quando há o surgimento de nova

folhagem. Os frutos amadurecem nos meses de janeiro e fevereiro. Produz anualmente abundante quantidade de sementes viáveis, que são disseminadas pela avifauna. O aproveitamento socioeconômico e a demanda de pesquisas de espécies frutíferas nativas refletem na oferta de novas alternativas de frutas frescas para o consumo in natura e matéria-prima para agroindústria, constituindo uma preciosa fonte de alimentos e, riqueza para o país (GIACOMETTI, 1993; MORAES et al., 1994; SOUZA, 2001; LIRA JÚNIOR, et al., 2005).

No que concerne aos estudos de lectinas da família sapotácea, poucos estudos foram realizados até o momento, sendo apresentada pela primeira vez em Labraia bojeri, uma lectina ligante de quitina, sendo obtida através de isolamento, purificação e caracterização parcial (COELHO et al., 2004) Foi obtida a partir de sementes de *L. bojeri* (Labramin), esta espécie apresenta características bem particulares, seus frutos são cápsulas esféricas com casca dura e amarela, contendo popa esbranquiçada envolvendo 1 ou 2 sementes marrons. Suas propriedades medicinais são identificadas no uso popular, no qual o látex do tronco é utilizado para remover verrugas e “bicho de pé”, tratando doenças fúngicas da pele. As sementes são anti-helmínticas. Na Costa Rica o chá das folhas é empregado no tratamento da arteriosclerose e hipertensão. Com os estudos da caracterização parcial da lectina, realizou-se a busca de seqüência de dados, a qual mostrou que, a seqüência N-terminal de Labramin apresentou um alto grau de homologia com inibidor de tripsina tipo Kunitz, apesar da não detecção de atividade de inibição de tripsina, mas exibiu atividade lectin-like. A lectina foi inibida por glicoproteínas e também apresentou inibição do crescimento do fungo *Colletotrichum lindemuthianum* e da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, mas não apresentou um efeito aparente sobre *Fusarium oxysporum*.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Obter a partir da entre casca, Purificar, Caracterizar e Avaliar Atividade antimicrobiana de uma lectina de *Sideroxylon obtusifolium*.

Extrair através do planejamento fatorial

2.2 Objetivos Específicos

- Coletar e identificar a *Sideroxylon obtusifolium*;

- Extrair a lectina com homogeneizados da entre casca em diferentes soluções aquosas com planejamento fatorial, utilizando variáveis como pH, tempo e temperatura;

- Purificar parcialmente a lectina por fracionamento com sulfato de amônio utilizando o extrato com melhor atividade específica;

- Purificar a lectina a partir da melhor fração obtida pelo fracionamento utilizando cromatografia de afinidade.

- Caracterizar a lectina pura quanto à especificidade a carboidratos ou glicoproteínas pela inibição da atividade hemaglutinante, estabilidade térmica, especificidade para eritrócitos e estabilidade frente a variações de pH;

- Avaliar através da eletroforese SDS-PAGE a determinação da massa molecular e do padrão de pureza da lectina obtida;

- Determinar a atividades biológicas (antimicrobiana) da lectina purificada.

3. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

AGRA M., F., FRANÇA P., F., BARBOSA, J., M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Rev Bras Farmacogn** 17: 114-140, 2007.

AGRA M.F., SILVA K.N., BASÍLIO I.J.L.D., FRANÇA P.F., BARBOSA-FILHO J.M. 2008. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Rev Bras Farmacogn** 18: 472-508.

AGRA, M.F., 1996. Plantas da medicina popular dos Cariris Velhos – Paraíba – Brasil. PNE, 1ª ed. João Pessoa. Editora União.

AGRAWAL, B.B.I. AND GOLDSTEIN, I.J. (1967) Specific binding of concanvalin A to cross-linked dextran gels. **Biochem. J.**, 96, 23C–15C.

ALMEIDA, R.N., FILHO, J.M.B., NAIK, S.R., 1985. Chemistry and pharmacology of an ethanol extract of *Bumelia sartorum*. **Journal of Ethnopharmacology** 14, 173-185.

ASHWELL, G. AND MORELL, A.G. (1972) Membrane glycoproteins and recognition phenomena. **Trends Biochem. Sci.**, 2, 76–78.

AUB, J.C., SANFORD, B.H., and COTE, M.N. (1965) Studies on reactivity of tumor and normal cells to a wheat germ agglutinin. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, 54, 396–399.

AUB, J.C., TIESLAU, C., and LANKESTER, A. (1963) Reactions of normal and tumor cell to enzymes. I. Wheat-germ lipase and associated mucopolysaccharides. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, 50, 613–619.

BARBOSA-FILHO J., M., ALENCAR, A., A., NUNES, X.,P., TOMAZ, A., C., A., SENA-FILHO, J.,G., ATHAYDE-FILHO, P., F., SILVA, M., S., SOUZA, M., F., V., DA-CUNHA, E., V., L. Sources of alpha-, beta-, gamma-, delta- and epsilon-carotenes: A twentieth century review. **Rev Bras Farmacogn** 18: 135-154. 2008.

BARONDES, S.H., CASTRONOVO, V., COOPER, D.N.W., and others. (1994) Galectins—a family of beta-galactoside-binding lectins. **Cell**, 76, 597–598.

BARONDES, S.H. (1984) **Science (Wash.)**, 223, 1259-1264.

BARROS NETO, B.; PIMENTEL, M. F.; ARAÚJO, M. C. U. Recomendações para calibração em química analítica - Parte I. Fundamentos e calibração com um componente (calibração univariada). **Quim. Nova**, v.25, n.5, p.856-865, 2002.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S. ; BRUNS, R. E. Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. V.1, **1.ed. Coleção Livros-Textos, Campinas:UNICAMP**, 2001, 406p.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Planejamento e otimização de experimentos. v.1, 1.ed., **Série Manuais, Campinas: UNICAMP**, 1995, 302p.

BEEBE, K. R.; KOWALSKI, B. R.; **Anal. Chem.** 1987, 59, 1017A.

BELTRÃO A.E.S. 2000. Metabólitos Secundários Bioativos em Cultura de Tecidos de *Sideroxylon obtusifolium* Roem & Schult e Micropropagação de *Mentha vilosa* Hudson. João Pessoa, Paraíba, 82 p. (Tese de Doutorado) Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica. Universidade Federal da Paraíba.

BHATTACHARYYA, L. E BREWER, C. F. (1990). Isoelectric focusing studies of concanavalin A and the lentil lectin. **Can. J. Microbiol.** 35:349-58.

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

BRAGA R. 1976. Plantas do nordeste, especialmente do Ceará. 3ª edição. **Coleção Mossoroense. Mossoró. Vol. XLII.**

CARLINI, C.R.; GRISSI DE SÁ, M.F. (2002); Plant toxic proteins with insectidal properties: A review on their potentialities as bioinsecticides, **toxicon** 40, 1515-1539.

CARVALHO ACB, DINIZ, MFFM, MUKHERJEE R. 2005. Estudos da atividade antidiabética de algumas plantas de uso popular contra o diabetes no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 86: 11-16.

CARVALHO, J.H. A. et al. Utilização de plantas medicinais pela população das áreas de unidades elementares da fundação SESP. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde/ Fundação SESP, 1988. 40p.

CASTRO, T. C. & CARVALHO, J. O. P. Dinâmica das populações de espécies arbóreas da família sapotaceae em áreas sob manejo na Floresta Nacional do Tapajós, pa, 2008
CAVALLI A, et al. Protein structure determination from NMR chemical shifts. **Proc. Natl Acad. Sci. USA** (2007) 104:9615-9620.

CORREIA, M.T.S. COELHO, L.C.B.B., PAIVA, P.M.G. Lectins, Carbohydrate recognition molecules: are they toxic? In: SISSIQUE, Y.H. (org.). **Recent Trends in toxicology**. V.37. Kerala: Transworld Reserch Network, 2008, p.47-59.

CRAMER AND GABIUS, F. CRAMER AND H.-J. GABIUS, New carbohydrate binding proteins (lectins) in human cancer cells and their possible role in cell differentiation and metastasation. In: B. Pullman et al. Interrelationship Among Ageing, Cancer and Differentiation, **Kluwer, Dordrecht** (1985), 187–205.

DORLAND, L., VAN HALBEEK, H., VLIEGENTHART, J. F. G., LIS, H., AND SHARON, N. (1981) Primary structure of the carbohydrate chain of soybean hemagglutinin. A reinvestigation by high resolution ¹H NMR spectroscopy. **J. Biol. Chem.** 256, 7708–7711

ETZLER, M.E. (1986) Distribution and function of plant lectins. In LIENER, I.E., SHARON, N., and GOLDSTEIN, I.J. (Eds.), The lectins: properties, functions and applications in biology and medicine. **Academic Press, Orlando, FL**, pp. 371–435.

F J SILVERBLATT AND L S COHEN. Antipili antibody affords protection against experimental ascending pyelonephritis. **J Clin Invest.** 1979 July; 64(1): 333–336. doi: 10.1172/JCI109458.

FAHN A. (1979) Secretory tissues in plants. **Academic Press**, London.

FAHN, A. 2000 – Structure and function of secretory cells. In: HALLAHAN, D.L. &

GRAY, J.C. (Eds.) – *Plant trichomes*. Advances in Botanical Research. Vol. 31. London: **Academic Press Inc.**, p. 37-75.

FERREIRA S.L.C., BRUNS R.E., SILVA E.G.P., SANTOS W.N.L., QUINTELLA C.M., DAVID J.M., ANDRADE J.B., BREITKREITZ M.C., JARDIM I.C.S.F., NETO B.B. ,. Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems **Journal of Chromatography A**, 1158 (2007) 2–14

FERREIRA, L.F., BOODTS, J.F.C ; BRITO-MADURRO, A.G., MADURRO, J.M. 2008. Gold electrodes modified with poly(4-aminophenol): incorporation of nitrogenated bases and an oligonucleotide. **Polymer International**, 57: 644-650.

FIGUEIREDO A.S, MODESTO-FILHO J. 2008. Efeito do uso da farinha desengordurada do *Sesamum indicum* L nos níveis glicêmicos em diabéticas tipo 2. **Rev Bras Farmacogn** 18: 77-83.

FRANZ, H. (1988) The ricin story. *Adv. Lectin Res.*, 1, 10–25. GALLATIN, W. M., WEISSMAN, I. L., and BUTCHER, E.C. (1983) A cell-surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes. **Nature**, 304, 30–34.

FREIRE, M.G. et al. Inflammatory responses induced in mice by lectin from *Talisia esculenta* seeds. **Toxicon**, v.42, p.275-280, 2003.

FREIRE, M.G. Isolamento, caracterização físico-química e estudo das atividades inseticida, microbicida e inflamatória da lectina de sementes de *Talisia Esculenta* (ST. HILL) RALDLAK. 2003. 189p. Tese (Doutorado em Bioquímica). Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas. Campinas,SP, 2001.

GALELLI, A E TRUFFA-BACHI, P. (1993). *Urtica dioica* agglutinin. A superantigenic lectin from stinging nettle rhizome. **J. Immunol.** 151:1821-31.

GEEG, C. V., ROBERTS, D. D., SEGEL, I. H. E ETZER, M. E. (1992). Characterization of the adenine binding sites of two *Dolichos biflorus* lectins. **Biochemistry** 31:6938-42.

GIACOMETTI, D.C. Recursos genéticos de fruteiras nativas do Brasil. In: Simpósio nacional de recursos genéticos de fruteiras nativas, 1992, **Anais... Cruz das Almas, BA: Embrapa-CNPMP**, 1993. pp.13-28.

GILBOA-GARBENR., , MIZRAHI, L. & GARBER,N .(1977). Mannose-binding hemagglutinins in extracts of *Pseudomonas aeruginosa*. **Canadian Journal of Biochemistry** 55, 975-98 1.

GOLDSTEIN, H. (1989). Restricted unbiased iterative generalised least squares estimation. **Biometrika** 76, 622-3.

HAYASHIDA M., FUKUNAGA A., AND HANAOKA K. Detection of Acute Tolerance to the Analgesic and Nonanalgesic Effects of Remifentanil Infusion in a Rabbit Model **Anesth. Analg.** 2003 97: 1347-1352

HUDGIN,R.L., PRICER,W.E. JR.,ASHWELL,G., STOCKERT, R. J., AND MORELL,A.G. (1974) The isolation and properties of a rabbit liver binding protein specific for asialoglycoproteins. **J. Biol. Chem.**, 249, 5536–5543.

J P VANDERBERG, S K GUPTA, S SCHULMAN, J D OPPENHEIM, AND H FURTHMAYR. Role of the carbohydrate domains of glycoporphins as erythrocyte receptors for invasion by *Plasmodium falciparum* merozoites. **Infect Immun.** 1985 January; 47(1): 201–210.

J. SCARISBRICK, G. ORCHARD, and R. RUSSELL-JONES. Lymphocytoma cutis with conjunctival lesions. **Br J Ophthalmol.** 1999 July; 83(7): 878.

K BRIDGES, J HARFORD, G ASHWELL, AND R D KLAUSNER. Fate of receptor and ligand during endocytosis of asialoglycoproteins by isolated hepatocytes. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1982 January; 79(2): 350–354.

KAKU, H., PEUMANS, W. J. E GOLDSTEIN, I. J. (1990). Isolation and (Sambucus nigra L.) bark. **Arch. Biochem. Biophys.** 277:255-62.

KENNEDY, J. F., PAIVA, P. M. G., CORREIA, M. T. S., CAVALCANTI, M. S. M. E

COELHO, L. C. B. B. (1995). Lectins, versatile proteins of recognition: a review. *Carbohydr. Polym.* 26:219-30.

KILPATRICK, D.C., 2002. Mannan-binding lectin: clinical significance and applications. *Biochim. Biophys. Acta* 1572, 401–413.

KILPATRICK, D.C. (2002); Animal lectins: a historical introduction and overview; *Biochim. Biophys. Acta* 1572, 187-197.

KOO, J. C.; LEE, S. Y.; CHUN, H. J.; CHEONG, Y. H.; CHOI, J. S.; KAWABATA, S.; MIYAGI, M.; TSUNASAWA, S.; HA, K. S.; BAE, D.W.; HAN, C.; LEE, B. L.; CHO, J. M. Two hevein homologs isolated from the seed of *Pharbitis nil* L. exhibit potent antifungal activity. *Biochim. Biophys. Acta* 1998, 1382, 80-90.

KOSHTE, V. L., VAN DIJK, W., VAN DER STELT, M. E. EAABERSE, R. C. (1990). Isolation and characterization of BanLec-I, a mannoside-binding lectin from *Musa paradisiac* (banana). *Biochem. J.* 227:721-6.

L. F. A. CAMPOS; R. R. MENEZES; D. LISBOA; L. N. L. SANTANA; G. A. NEVES; H. C. FERREIRA. Experimental design to maximize the waste content in ceramic bricks and tiles. *Cerâmica vol.53 no.328 São Paulo Oct./Dec. 2007*

LANDSTEINER, K. and RAUBITSCHKE, H. (1907) Beobachtungen über Hamolyse und Hamagglutination. *Zbl. Bakt. I. Abt. Orig.*, 45, 600–607.

LIMA D.A. 1989. Plantas das caatingas. *Academia Brasileira de Ciências. Rio de Janeiro.*
LIRA JUNIOR, M. A.; LIMA, A. S. T.; ARRUDA, J. R. F.; SMITH, D. L. Effect of root temperature on nodule development of bean, lentil and pea. *Soil Biology and Biochemistry*, Elmsford, v. 37, p. 235-239, 2005.

LIS, H. E SHARON, N. (1986). Lectins as molecules and as tools. *Ann. Rev. Biochem.* 55:35-67.

LIS, H., AND SHARON, N. (1986) Lectins as molecules and tools. *Annu. Rev. Biochem.* 55, 35–67

LORENZI, H. Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 2 ed. Nova Odessa – SP: **Editora Plantarum**, 1998. 352 p.

LORENZI, H., MATOS, F.J.A., 2002. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas. **Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum.**

MACEDO, M.L.R., FREIRE, M.G.M., MARTINS, L.T.D.M., MARTINEZ, D.S.T., GOMES, V.M.G., SMOLKA, M.B., TOYAMA, M.H., MARANGONI, S., COELHO, L.C.B.B. (2004). Avaliação in vitro do efeito de lectinas de sementes de *Talisia esculenta* e *Labramia Bojeri* sobre o biofilme oral *J. Agric. Food Chem.*, 52, 7548-7554.

MCCURRACH, P. M. E KILPATRICK, D. C. (1986). Purification of potato lectins (*Solanum tuberosum* agglutinin) from tubers or fruits using chromatofocusing. **Anal. Biochem.** 154:492-62.

MERGIA A, PRATT-LOWE E, SHAW K E, RENSHAW-GEGG L W, AND P A LUCIW cis-acting regulatory regions in the long terminal repeat of simian foamy virus type 1. **J Virol** 1992; 66(1): 251–257.

MO, H., VAN DAMME, E. J. M., PEUMANS, W. J. E GOLDSTEIN, I. J. (1993). Purification and characterization of a mannose-specific lectins from shallot (*Allium ascalonicum*) bulbs. **Arch. biochem. Biophys.** 306:431-8.

MONTENEGRO L.H.M., OLIVEIRA P.E.S., CONSERVA L.M., ROCHA E.M.M., BRITO A.C., ARAÚJO R.M., TREVISAN M.T.S., LEMOS R.P.L. 2006. Terpenóides e avaliação do potencial antimalárico, larvicida, anti-radicalar e anticolinesterásico de *Pouteria venosa* (Sapotaceae). **Rev Bras Farmacogn** 16 (Supl.): 611-617.

MORAES, C. D. A. Resposta de algumas espécies arbóreas nativas do cerrado à adubação e calagem. Universidade de Brasília, 1994. 66p. Dissertação de Mestrado.

MORGAN, D.A., RUSCETTI, F.W., AND GALLO, R. (1976) Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. **Science**, 193, 1007–1008.

NAIK S.R., BARBOSA-FILHO J.M., DHULLEY J.N. 1991. Probable mechanism of hypoglycemic activity of bassic acid, a natural product isolated from *Bumelia sartorum*. **J Ethnopharmacol** 33: 37-44.

NEUMANN, D.; LEHR, C.M.; LENHOF, H.P.; KOHLBACHER, O. (2004). Computational modeling of the sugar-lectin interaction, **adv. Drug Deliver. Rev.** 56, 437-457.

NG, T.B. (2004); Antifungal proteins and peptides of leguminous and non-leguminous origins, **peptides** 25, 1215-1222.

NICOLSON, G. L., BLAUSTEIN, J. E ETZLER, M. M. (1974). Characterization of two plant lectins from *Ricinus communis* and their quantitative interaction with a murine lymphoma. **Biochemistry** 13: 196-204.

NOWELL, P.C. (1960) Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in culture of animal and human leukocytes. **Cancer Res.**, 20, 462–466.

OFEK, I., BEACHEY, E.H., and SHARON, N. (1978) Surface sugars of animal cells as determinants of recognition in bacterial adherence. **Trends Biochem. Sci.**, 3, 159–160.

OIVEIRA C. COSTA S. TEIXEIRA J.A. DOMINGUES L. cDNA Cloning and functional Expression of the α -D-Galactose-Binding Lectin Frutalin in *Escherichia coli* . **Mol Biotechnol** (2009) 43:212–220.

OTTENSOOSER F, NAKAMIZO Y, SATO M, MIYAMOTO Y, TAKIZAWA K. Lectins detecting group C streptococci. **Infect Immun.** 1974 ;9 (5):971–973.

- PENNINGTON, T.D. 1990. Sapotaceae. Flora Neotropical Monograph. **New York Botanic Garden** 52: 1-770.
- PERFEITO J.P., SANTOS ML, LÓPEZ K.S.E., PAULA JE, SILVEIRA D 2005. Characterization and biological properties of Pouteria torta extracts: a preliminary study. **Rev Bras Farmacogn** 15: 183-186.
- PEUMANS W J And VAN DAMME E J. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiol.** 1995 ,109(2): 347–352.
- PEUMANS, W. J., SPAEPEN, C., STINISSEN, H. M. E CARLIER, A. R. (1982). Isolation and partial characterization of a lectins from a false brome grassb (Brachypodium sylvaticum). **Biochem J.** 205:635-8.
- REIS, A. M. P., LEITE, N. S. , LIMA, D. P., CAMARGO, E. A., ESTEVAM, C. S., PANTALEÃO, S. M., FERNANDES, R. P. M., COSTA, S. K. P. MUSCARA, M. N., THOMAZZI, S.M., Avaliação das atividades antioxidante, cicatrizante e antiinflamatória tópica da sideroxyylon obtusifolium. 19º Encontro de Iniciação Científica da UFS 20 a 23 de Outubro de 2009.
- RUDIGER, H.; SIEBERT, H.C.; SOLIS, D.; JIMÉNEZ BARRETO, J.; ROMERO, A.; VON DERLIETH, C.-W; DIAZ-MAURIÑO, T.; GABIUS, H.-J (2000). Medicinal Chemistry Based on the Sugar Code: Fundamentals of Lectinology and Experimental Strategies with Lectins as Targets . **Current Medicinal Chemistry**, 7, 4, 389-416(28).
- SAITO, K., KOMAE, A., KAKUTA, M., VAN DAMME, E. J. M., PEUMANS, W. J., GOLDESTEIN, I. J. E MISAKI, A. (1993). The mannosyl-binding lectin from leaves of orchid twayblade (Litera ovata). Application to separation of D-mannans from D-glucans. **Eur. J. Biochem.** 217:677-81.
- SANTOS H.B, MODESTO-FILHO J., DINIZ M.F.F.M., VASCONCELOS T.H.C., PEREIRA F.S.B., RAMALHO J.A., DANTAS J.G., SANTOS E.B. 2008. Avaliação do efeito hipoglicemiante de Cissus sicyoides em estudos clínicos fase II. **Rev Bras Farmacogn** 18: 70-76.
- SCHMEDA-HIRSCHMANN G. et al 2008. Cycloaspeptide A and pseurotin A from the endophytic fungus Penicillium janczewskii.; **Z. Naturforsch.** 63, 383 (2008)
- SELITRENKOFF, C.P. (2001). Antifungal Proteins, **Appl. Environ. Microb** 67, 2883-2894.
- SHARON N. AND LIS H. (2004). History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology** 14, 53R-62R
- Sharon, N. (1993) Lectin-carbohydrate complexes of plants and animals: an atomic view. **Trends Biochem. Sci.**, 18, 221–226.

SHARON, N. (1993) Lectin-carbohydrate complexes of plants and animals: an atomic view. **Trends Biochem. Sci.**, 18, 221–226.

SHARON, N. E LIS, H. (1990). Legume lectins a large family of homologous proteins. **FASEB J.** 4:3198-208

SILVA, G.M.C., MARTINS, P.L., SILVA, H., FREITAS, K.K.C., 2004. Estudo autoecológico de *Bumelia sertorium* (Quixabeira) – Espécie ameaçada de extinção no ecossistema Caatinga. **Revista de Biologia e Ciências da Terra** 4.

SOUZA, A.L.; GARCIA, R.; PEREIRA, O.G. et al. Composição químico-bromatológica da casca de café tratada com amônia anidra e sulfeto de sódio. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.3, p.983-992, 2001. suplemento 1,

STOCKERT, R.J., MORELL, A.G., AND SCHEINBERG, I.H. (1974) Mammalian hepatic lectin. **Science**, 186, 365–366.

Sumner, J.B. and Howell, S.F. (1936) The identification of the hemagglutinin of the jack bean with concanavalin **A. J. Bacteriol.**, 32, 227–237.

TEICHBERG VI, SILMAN I, BEITSCH DD, RESHEFF G. A beta-D-galactoside binding protein from electric organ tissue of *Electrophorus electricus*. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1975 Apr;72(4):1383–1387.

TORRICO F., CEPEDA M., GUERRERO G., MELENDEZ F., BLANCO Z., CANELÓN D.J, DIAZ B., COMPAGNONE R.S., SUÁREZ A.I. 2007. Hypoglycaemic effect of *Croton cuneatus* in streptozotocin-induced diabetic rats. **Rev Bras Farmacogn** 17: 166-169.

TRESSENS, S. G. 1996. Sapotaceae en flora fanerogámica Argentina 30, 1-9

VALCÁRCEL, M.; Trends Anal. **Chem.** 1997, 16, 124.

VASCONCELOS, I.M.; OLIVEIRA, J.T.A. (2004); Antinutritional properties of plant lectins, **toxicol** 44, 385-403.

VIEIRA NETO, R.D. (Ed.) Frutíferas potenciais para os tabuleiros costeiros e baixadas litorâneas. Aracajú: Embrapa Tabuleiros Costeiros/ Empresa de Desenvolvimento Agropecuário de Sergipe – **Emdagro**, 2002. 216p.

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

WIRTH M. KNEUER C., LEHR C.M., F. GABOR. Lectin-mediated Drug Delivery: Discrimination Between Cytoadhesion and Cytoinvasion and Evidence for Lysosomal Accumulation of Wheat Germ Agglutinin in the Caco-2 Model **Journal of Drug Targeting**, Jan 2002, Vol. 10, No. 6, Pages 439-448.

YAMASHITA, K., OHKURA, T., UMETSU, K. E SUZUKI, T. (1992). Isolation and characterization of isolectins from *Erythrina variegata* seeds. **J. Chromatogr.** 597:207-11

YAMEGUSHI, O., KIMURA, M., YAMAZAKI, N., KIMURA, Y., NAKAJIMA, S. E TAKAGI, S. (1993). Chemical structures of two subunits, A-subunit and B-subunit, of galactose-specific isolectins from *Erythrina variegata* seeds. **J. Chromatogr.** 597-11

Capítulo 1

Artigo a ser submetido à publicação

Revista Brasileira de Botânica

Impacto: 0.827 (2009)

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_serial&pid=0100-8404&lng=pt&nrm=iso

USO DE PLANEJAMENTO FATORIAL NA EXTRAÇÃO DE LECTINAS DE *Sideroxylon obtusifolium*: PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL

M. F. Santana^a, C.S.A.Lima^b, T. Porto^c e M.T.S. Correia^{a*}

^aDepartamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas Universidade Federal de Pernambuco(UFPE), Av. Prof. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, 50670-420, Recife, PE Brasil
Departamento de Biofísica, Centro de Ciências Biológicas Universidade Federal de Pernambuco(UFPE), Av. Prof. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, 50670-420, Recife, PE Brasil Recife, PE Brasil
Laboratório de Imunopatologia Keizo Azami- LIKA/UFPE, Recife, PE Brasil

Abstract

This work aims to extract a lectin from *Sideroxylon obtusifolium* bark using complete factorial design followed by purification of the lectin by salt fractionation and affinity chromatography on chitin, as well as partial characterization and evaluation of the antimicrobial activity. The results showed that the improved extraction conditions, obtained by factorial design of $2^4 + 4$ central points, was in extraction time of 4 hours at 4 °C, in pH 6.0 with NaCl concentration of 0.15 M. In brief, extractions were made in citrate phosphate and sodium phosphate buffers, with pH ranging from 6.0 to 7.5. Selected extraction was in phosphate citrate buffer (pH 6.5) which showed better specific hemagglutinating activity (SHA) using rabbit erythrocytes. Salt fractionation revealed that the fraction 60-80% (F60-80) had the highest SHA, which was partially inhibited by glucose and completely inhibited by N-acetyl-D-glucosamine. The SoBL (*Sideroxylon obtusifolium* bark lectin) was obtained by chromatography on chitin after elution with acetic acid 1 M. SoBL is thermostable, maintaining their HA at 100°C after 30 min of heating. The evaluation of stability against different pH values indicated that the lectin showed higher HA in pH 5.0. SoBL showed a single band of 6.0 kDa and is a glycoprotein by SDS-PAGE. SoBL (40µg) did not inhibit microbial growth of *Bacillus subtilis*, *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Klebsiella pneumoniae* and no inhibited the growth of fungi of the genus *Fusarium*. In conclusion, a thermostable lectin was obtained from the bark of *S. obtusifolium* by affinity chromatography on chitin, which apparently does not showed antimicrobial activity.

Keywords: factorial design; lectin; *Sideroxylon obtusifolium*; antimicrobial activity.

1. Introdução

As lectinas pertencem a uma classe de proteínas de origem não imunológica, de distribuição ubíqua na natureza e que reconhecem carboidratos livres ou ligados a superfícies celulares através de sítios de ligação nos quais a hidrofobicidade é a principal força de interação (Kennedy et al., 1995). Lectinas reconhecem carboidratos, moléculas cujas características estruturais favorecem suas interações com receptores celulares específicos e que são, portanto, envolvido em vários processos celulares (Sharon, 1993 e Sharon & Lis, 2004). Além disso, algumas propriedades farmacológicas de plantas são atribuídas ao seu teor de lectina, cujas propriedades biológicas identificadas incluem atividades antitumoral, mitogênica e antioxidantes (Andrade, 2004; Maciel, 2004; Argolo, 2004) As lectinas têm sido encontradas em larga escala, em uma variedade de formas de vida – microrganismos, mamíferos e vegetais - sendo que aquelas encontradas nos vegetais superiores têm sido mais estudadas (Gilboagarber et al, 1977; Ottensooser et al, 1974).

A primeira etapa na purificação de lectinas é a extração de proteínas em solução salina ou tampão. A detecção de lectinas em uma amostra é feita explorando a capacidade dessas proteínas de aglutinarem células. Caso apresentem atividade, os extratos são submetidos ao fracionamento salino com sulfato de amônio, que precipita as proteínas e promove purificação parcial (Coelho & Silva, 2000), em seguida, as frações obtidas são submetidas a diálise e posteriormente é iniciado as técnicas cromatográficas. Estas técnicas purificam a proteína de acordo com o tamanho da molécula (cromatografia em gel), carga (cromatografia de troca iônica) e afinidade específica de ligação a carboidratos (cromatografia de afinidade). Métodos eletroforéticos são utilizados para a caracterização estrutural de lectinas, assim como para estabelecer o grau de pureza das mesmas.

As espécies da família Sapotaceae são caracterizadas pela diversidade das substâncias resultantes do seu metabolismo secundário, como triterpenos, esteróides, taninos, polifenóis além de alcalóides, carotenos, compostos cianogênicos, carboidratos e ácidos graxos (Beltrão, 2000; Montenegro et al., 2006; Barbosa-Filho et al., 2008). *Siderorylon obtusifolium*

pertencente à família sapotácea, possui distribuição pantropical e é conhecida popularmente no Brasil como quixabeira. O extrato aquoso de *S. obtusifolium* é usado popularmente no Brasil, principalmente no tratamento de inflamações ovarianas e contra diabetes (AGRA, 1996; CARVALHO et al., 2005; AGRA et al., 2007;). No que concerne aos estudos de lectinas da família sapotácea, poucos estudos foram realizados até o momento, sendo apresentada pela primeira vez em *Labramia bojeri*, uma lectina ligante de quitina, sendo obtida através de isolamento, purificação e caracterização parcial (COELHO et al., 2004). Este trabalho descreve o uso de planejamento fatorial na extração de uma lectina de *Sideroxylon obtusifolium*, purificação e caracterização parcial da primeira lectina obtida nesta espécie, com a intenção de aperfeiçoar o método extrativo, assim como abrir espaço para novas investigações referente ao potencial biológico desta lectina.

2. Materiais e métodos

2.1 Produtos químicos

Carboidratos (N-acetyl-D-glucosamina, D-arabinose, D-manose, L-fucose, L-rafinose, D-galactose, D-frutose, D-glicose, sacarose, lactose, L-trealose, D-xilose, L-raminose, metil-D-manopiranosideo, metil-D-glicopiranosideo, glicose-6-fosfato, frutose-1,6-bifosfato); glicoproteínas (caseína, azocaseína, asialofetuína, fetuína, albumina de soro bovino – BSA) foram adquiridos da Sigma Chemical Company (E.U.A.). Todos os reagentes foram de grau analítico.

2.2 Extração por planejamento fatorial

Para o melhoramento e otimização do processo extrativo na obtenção de lectinas, foi utilizado a entrecasca de *S. obtusifolium*, o qual foi coletado no Parque Nacional do Catimbal, no município de Buíque, sendo processado conforme as técnicas usuais taxonômicas, obtendo o registro nº 84038 e 84076, ficando material exemplar depositado no Herbário IPA (Instituto Agrônomo de Pernambuco). Foi realizado um planejamento experimental, partindo do qual seguiram os procedimentos comuns da extração (10% p/v), sendo a entrecasca pulverizada, homogeneizada e mantida em agitação nas condições de tempo

e temperatura selecionados. Posteriormente, a mistura foi filtrada através de gaze e centrifugando em 11180 x g por 15 minutos. De todos os sobrenadantes (extratos) obtidos durante o período de investigação, o que demonstrou o valor mais elevado de atividade hemaglutinante específica (AHE) foi denominado extrato bruto (EB), baseado no planejamento fatorial, sendo considerado o de melhores interações entre as variáveis independentes.

O planejamento fatorial baseado em planejamentos experimentais foi proposto por Barros-Neto (2002). O planejamento fatorial completo (2^4) utilizou um total de 16 extrações e 4 repetições no ponto central, as quais possibilitaram o cálculo do erro experimental (**Tabela 1**). As variáveis independentes utilizadas estavam relacionadas com o tempo, temperatura e concentração de sal (NaCl), por meio das quais foram analisadas suas interações, através da análise estatística dos resultados, sendo realizada com o auxílio do software Statistica 8 (STATSOFT INC., 2008).

2.3 Determinação de atividade hemaglutinante e ensaio de inibição

Para a avaliação da atividade hemaglutinante foram coletados eritrócitos humanos (tipos A, B, O e AB) e de coelho, sendo obtidos como descrito em Bukantz et al., 1946 e o tratamento com glutaraldeído de acordo com Bing et al (1967). A atividade hemaglutinante (AH) foi avaliada em placas de microtitulação de acordo com Correia e Coelho (1995), definido como a menor diluição da amostra apresentando hemaglutinação, atividade hemaglutinante específica (AHE) correspondendo a AH dividida pela concentração protéica. Resumidamente, as preparações da lectina (50 μ L) foram duas vezes diluídas em série em 0,15 M de NaCl antes da adição de 2,5% (v/v suspensão) (50 μ L) de eritrócitos de coelho, tratados com glutaraldeído ou suspensões frescas de eritrócitos humanos (A, B, O e AB). Foi observado pela ausência de precipitação de eritrócitos, após incubação de 45 min, sendo repetido em 4 ensaios e confirmado os resultados.

A inibição da lectina na presença de vários açúcares ou glicoproteínas foi utilizada para determinar a especificidade de da lectina. A ligação do carboidrato específico foi determinada sobre a inibição da AH usando diversos açúcares (D(+)-manose, D(+)- glicose, N-acetil-glicosamina, trealose, rafinose, metil- α -D-manopiranosídeo, xilose, frutose, arabinose, raminose e metil- α -D-glicopiranosídeo) e glicoproteínas (soro bovino fetal, caseína,

tiroglobulina, ovoalbumina, fetuína, aldolase, heparina) como descrito em Correia e Coelho (1995). Eritrócitos de coelho foram escolhidos para ensaios posteriores.

2.4 Purificação de Lectina da entrecasca de *Sideroxylon obtusifolium* (SoBL)

A lectina foi purificada através do extrato a 10% (p/v) da entrecasca, em tampão citrato fosfato pH 6.5 em NaCl a 0.15 M baseado no planejamento fatorial (**Tabela 2**) por apresentar as melhores condições extrativas, indicado pela melhor atividade hemaglutinante específica AHE do EB. O extrato bruto foi saturado em diferentes fracionamentos salinos, para se obter o que apresentasse a melhor AHE, iniciando com saturação de 20% e continuando o processo até 100% de saturação. A fração com maior AHE foi escolhido, dialisados contra água, e utilizados para os procedimentos de cromatografia em quitina. A fração selecionada (F60-80) foi saturado com sulfato de amônio durante 4 h, e centrifugado a 11180 x g por 15 min. Com a obtenção do melhor precipitado seguiram-se os procedimentos de purificação, sendo utilizado 2 ml da F60-80, contendo 14,3 mg/ml de proteína, para aplicação na coluna de quitina. A coluna foi previamente equilibrada com 0,15 M de NaCl a uma vazão de 40 ml/h e eluída com ácido acético 1 M. A AH de SoBL, foi avaliada na presença de eritrócitos (humano e de coelho), de carboidratos, glicoproteínas, íons, e com tratamentos em diferentes temperaturas, valores de pH e íons metálicos. A concentração de proteínas foi mensurada de acordo com Lowry et al (1951).

2.5 Efeitos do pH, de íons metálicos e da temperatura na atividade hemaglutinante

O efeito do pH, de íons metálicos e da temperatura na AH foi avaliado sobre a incubação de (100µg) de SoBL. Para a avaliação da resistência ao pH, foram utilizados diferentes valores de pH, por uma hora em tampões selecionados (10mM de tampão citrato fosfato, pH entre 3 e 7 e 10mM de tampão Tris-HCl, pH entre 8 e 12). Na avaliação de estabilidade térmica foi utilizada uma faixa de temperaturas entre 30 e 100 °C por 30 minutos, utilizando dois tipos de avaliação, na análise da amostra fracionada, a qual foi introduzida uma nova solução contendo lectinas a cada 30 minutos, e na avaliação contínua, onde a mesma

amostra permaneceu por quatro horas seguidas. A avaliação da AH frente a diferentes íons metálicos foi realizado com íons mono e divalentes. O efeito de mono (K) e íons metálicos divalentes (Mg^{2+} e Ca^{+2}) sobre AH foi verificado de acordo com Pajic et al., (2002), realizando incubação de 15 minutos do mesmo volume de solução, contendo ambos os íons metálicos $CaCl_2$, $MgCl_2$ e KCl (5, 10 e 20 mM) em 0.15 M de NaCl e preparação com SoBL. Uma alíquota (50 μ l) da mistura foi distribuída em placas de micro titulação e a HA procedeu como descrita no ensaio de inibição.

2.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida

A eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) foi realizada de acordo com Laemmli (1970) utilizando 12,5% (p/v gel). O marcador padrão de proteínas foi baseado nas massas moleculares da Miosina (205 kDa), β -galactosidase de *E. Coli* (116 kDa), Fosforilase b (97.4 kDa), Frutose-6-fosfato quinase (84 kDa), BSA (66 kDa), glutâmico desidrogenase (55 kDa), ovoalbumina (45 kDa), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (36 kDa), anidrase carbonica (29 kDa), tripsinogênio (24 kDa), Inibidor de tripsina de soja (20 kDa), α -lactoalbumina (14.2 kDa) e aprotinina (6.5 kDa).

2.7 Atividade antimicrobiana

As bactérias foram fornecidos pelo Departamento de Antibióticos (DA), da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Brasil, em DifcoTM Agar nutritivo (NA) e armazenadas a 4°C. Gram-positivas foram *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Streptococcus faecalis* (ATCC 6057) e *Bacillus subtilis* (UFPEDA16) e Gram-negativas foram *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853) e *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 29665). O ensaio de atividade antimicrobiana foi realizada de acordo com Kirb & Bauer, 1966. Preparou-se uma suspensão padronizada 0,5 da escala de Mc Farland, no qual foram semeados os

microrganismos padronizados em 10mL de meio de cultivo específico Muller Hinton. Foram adicionados aos discos de papel 40µg de SoBL, colocados os discos na placa semeada com os microrganismos e incubados a 37°C por 48h, e observado a cada 24h. Foi também avaliado o potencial de inibição sobre o crescimento fúngico, sobre *Fusarium oxysporum*.

3. Resultados e Discussões

Lectinas têm sido extraídas de diversas fontes, as lectinas de plantas entre outras têm tido importantes aplicações. O isolamento, purificação, caracterização e aplicações biológicas de novas lectinas de plantas têm ampliado as aplicações biotecnológicas (Latha et al. 2006; Wong et al. 2006). A utilização de planejamento fatorial tem aprimorado consideravelmente os métodos convencionais, levando em consideração as interações das variáveis independentes e utilizando suas respostas em análises estatísticas, tem desta forma otimizado o processo extrativo. Metodologias de resposta de superfície usando design central composto, matriz e aplicações dessas técnicas, para otimização das etapas de preparação da amostra (extrações) e a determinação das condições experimentais para separações em fase gasosa tem sido realizadas com sucesso, fornecendo importantes informações para otimização de sistemas cromatográficos (FERREIRA *et al.*, 2007). Desta forma métodos baseado em planejamento experimental tem mostrado ser de grade importância na obtenção de melhores condições para a obtenção de macromoléculas, indicando seu potencial de otimização dos processos para a purificação das mesmas.

A obtenção da lectina denominada SoBL (*Sideroxylon Obtusifolium* bark lectin) foi realizada por meio do planejamento fatorial completo $2^4 + 2$ pontos centrais, baseado em Barros-Neto (2002), indicado na **tabela 1**. Neste planejamento fatorial completo (2^4) utilizou um total de 16 extrações e 4 repetições no ponto central, as quais possibilitaram o cálculo do erro experimental, apresentados na **tabela 2**. As variáveis independentes utilizadas estavam relacionadas com o tempo, temperatura e concentração de sal (NaCl), por meio das quais foram analisadas suas interações, através da análise estatística dos resultados, sendo realizada com o auxílio do software Statistica 8 (STATSOFT INC., 2008), indicados na **figura 1** em um esquema cúbico da AHE obtido do design da **tabela 1**. Baseado no planejamento fatorial foi selecionado dois tampões, citrato fosfato e fosfato de sódio, partindo deste obteve-se o melhor

tampão nas melhores condições extrativas, indicando que, o tampão citrato fosfato em pH 6.5 contendo NaCl 0,15 M foi o que apresentou melhor atividade hemaglutinante específica AHE, associado com o tempo de 4h de extração em temperatura de 4°C, indicados na **tabela 3**. Estes parâmetros extrativos indicaram que SoBL tem maior potencial extrativo em baixas temperaturas, no tempo mínimo de extração utilizado de 4h e que é otimizado em tampão ligeiramente ácido, contendo NaCl 0.15M. Partindo destes resultados, observa-se que, o planejamento fatorial foi de grande importância para indicar quais as condições permite melhor interação entre as variáveis e garante uma otimização do processo extrativo, assegurando a lectina um potencial maior de estabilidade e expressão de suas características.

Lectinas ligantes de quitina têm sido isoladas de diversas fontes, incluindo bactérias, insetos, plantas e mamíferos (Huang et al. 2000, Campos-Olivas et al. 2001, Stoeva et al. 2001, Vuocolo et al. 2001, Suzuki et al. 2002, Van Dellen et al. 2002) e muitas delas apresentam atividade antifúngica, uma vez que a quitina é um componente chave da parede celular de fungos. As lectinas ligantes de quitinas são um exemplo de lectinas com grande potencial biológico e biotecnológico, um exemplo da função antifúngica pode ser percebida com as lectinas jackina e frutackina oriundas das espécies *Artocarpus integrifolia* (jaca) e *Artocarpus incisa* (fruta-pão) respectivamente, (Trindade, 2005). A busca de novas lectinas tem sido de grande interesse para ampliar o conhecimento sobre esta classe de proteínas, bem como para a investigação de atividade farmacológica, considerando o potencial fitoterápico de plantas utilizadas na medicina popular.

Entre as frações saturadas com sulfato de amônio do EB, a F60-80% apresentou a melhor AHE, com uma concentração protéica de 36,62 mg/mL, portanto, escolhida para o protocolo de purificação da lectina utilizando coluna de afinidade em quitina, foi orientado segundo a característica de especificidade ao carboidrato N-acetil-D-glicosamina, de acordo com o ensaio de inibição. A coluna foi lavada com NaCl 0.15 M, para retirar a amostra não adsorvida e a amostra adsorvida foi eluída com 1 M de ácido acético, a qual revelou apenas um pico (**Figura 2**). O pico obtido apresentou AH de 512, tendo concentração de 68 µg/mL (**Tabela 3**). Este resultado indica que SoBL apresenta um rendimento na purificação similar a lectinas de *Dolichos lablab* (Rao, 2008). Os métodos habituais aplicada para purificar lectinas são de saturação com sulfato de amônio, cromatografia de afinidade (Takahashi, 2008).

Após a purificação de SoBL foram realizados alguns ensaios para obtenção da caracterização parcial, desta forma observou que, a lectina é uma proteína não glicosilada por não apresentar a porção carboidrato avaliada utilizando coloração de Schiff. SoBL apresentou AH contra eritrócitos humanos do tipo A, B, e O e não apresentou AH para o tipo AB. No entanto, a AH utilizando eritrócitos de coelho foi muito mais expressiva. A inibição da lectina na presença de vários açúcares ou glicoproteínas foi utilizada para determinar a especificidade da lectina. A ligação do carboidrato específico foi determinada sobre a inibição da AH usando diversos açúcares. Houve inibição parcial com a glicoproteína albumina do soro bovino e inibição parcial da glicose e inibição total com a azocaseína e N-acetil-D-glicosamina.

Para a avaliação da AH de SoBL frente à variação de pH, temperatura e de íons metálicos mono e divalentes foram avaliados no intuito de observar sua estabilidade estrutural. O efeito da variação do pH foi avaliado, em diferentes valores de pH, por uma hora. SoBL apresentou uma melhor AH em pH 5.0, no entanto permaneceu ativa até o pH 7.0 e perdeu totalmente a AH a partir do pH 8.0 (**Figura 4**). A redução e inativação da atividade foram irreversíveis após retornar ao pH neutro. Desta forma SoBL indicou ter maior estabilidade em pH ácido, apresentando semelhança a lectina de *Labramia bojeri* (Macedo et al., 2004).

Na avaliação de estabilidade térmica foi utilizada uma faixa de temperaturas entre 30 e 100 °C por 30 minutos. SoBL apresentou AH até 70 °C, com o aumento da temperatura ocorreu uma queda da AH, a qual permaneceu estável até 100°C (**Figura 4**). Apesar da diminuição da AH de SoBL em temperaturas elevadas, a lectina mostrou ser termoestável, pois manteve sua função de interação célula-carboidrato mesmo em alta temperatura. Embora na maioria dos casos, quando ocorre mudança de conformação torna-se irreversível, deve-se tomar nota que, de fato, a agregação em solução térmica por ser totalmente reversível para um número de proteínas (Chuan-He et al., 2007; Iwakura et al., 2001). SoBL mostrou ser uma lectina termo estável, com um comportamento semelhante ao relatado por proteína de Ngai e Ng (2004), que manteve a HA a 100 ° C por 60 min. Os íons não afetaram AH de SoBL.

SoBL em eletroforese apresentou um pequeno peso molecular, indicando uma massa molecular de aproximadamente 6 kDa (**Figura 3**). As lectinas ligantes de quitinas são um exemplo de lectinas com grande potencial biológico e biotecnológico. Foi apresentado também que, lectina de *L. bojeri* tem pequena massa molecular, sendo formada por um polipeptídeo ligados por ponte de sulfeto, apresentando 19 e 20 kDa, quando tratado em eletroforese redutora. Lectinas, particularmente ligantes de quitina carregando o domínio Heveina, tem sido estudado extensivamente. Lectinas como Hevein (4,7 kDa) e UDA (8,5 kDa), pode ser pequeno o suficiente para penetrar através da parede celular de fungos e chegar à membrana plasmática, onde eles podem ter um efeito sobre os sítios ativos envolvidos na morfogênese da parede celular (KOO et al., 1998).

SoBL não inibe o crescimento microbiano das espécies de bactérias Gram-negativas *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*; bactérias Gram-positivas *Bacillus subtilis*, *Streptococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus* na concentração de 40µg. A avaliação da

atividade antifúngica foi realizada em paralelo e foi observado que SoBL é ineficiente em inibir o crescimento fúngico, nas concentrações de 40µg. O fato de SoBL não ter apresentado atividade antimicrobiana com os microorganismos testados não impossibilita seu potencial antimicrobiano frente a outras espécies, alterando simultaneamente sua concentração.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Os autores agradecem a Antonio Fernando e Maria Barbosa Reis da Silva pelo apoio técnico e científico, assim como a todos os colaboradores que participaram de diferentes etapas da pesquisa.

Referências

A.C.C. ARGOLO, A.E.G. SANT'ANA, M. PLETSCH, L.C.B.B. COELHO, **Biores. Technol.** 95 (2004) 229.

AGRA M., F., FRANÇA P., F., BARBOSA, J., M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Rev Bras Farmacogn** 17: 114-140, 2007.

AGRA, M.F., 1996. Plantas da medicina popular dos Cariris Velhos – Paraíba – Brasil. PNE, 1ª ed. João Pessoa. Editora União.

BARBOSA-FILHO J., M., ALENCAR, A., A., NUNES, X.,P., TOMAZ, A., C., A., SENA-FILHO, J.,G., ATHAYDE-FILHO, P., F., SILVA, M., S., SOUZA, M., F., V., DA-CUNHA, E., V., L. Sources of alpha-, beta-, gamma-, delta- and epsilon-carotenes: A twentieth century review. **Rev Bras Farmacogn** 18: 135-154. 2008.

BARROS NETO, B.; PIMENTEL, M. F.; ARAÚJO, M. C. U. Recomendações para calibração em química analítica - Parte I. Fundamentos e calibração com um componente (calibração univariada). **Quim. Nova**, v.25, n.5, p.856-865, 2002.

BAUER, A.W; KIRBY, W.M.M; SHERRIS, J.C; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology. Philadelphia**, v.45, p.493-496, 1966.

BELTRÃO A.E.S. 2000. Metabólitos Secundários Bioativos em Cultura de Tecidos de *Sideroxylon obtusifolium* Roem & Schult e Micropropagação de *Mentha vilosa* Hudson. João Pessoa, Paraíba, 82 p. (Tese de Doutorado) Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica. Universidade Federal da Paraíba.

BING, D. H., WEYAND, J. G.M. E STAVITSKY, A.B. (1967). Hemagglutination with aldehyde-fixed erythrocytes for assay of antigens and antibodies. **Proc. Soc. Cyp. Biol. Med.** 124:1166-70

BRUSTEIN, V. P.; PAIVA, P. M. G. Purificação e caracterização da lectina de sementes de *Eugenia malaccensis* (E.Mal): imobilização para aplicações biológicas.. 2003. **Trabalho de**

Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biomédicas) - Universidade Federal de Pernambuco.

BUKANTZ, S. C., REIN, C. R. E KENT, J. F. (1946). Studies in complement fixation. II. Preservation of sheep's blood in citrate dextrose mixtures (modified Alserver's solution) for use in the complement fixation reaction. **J. Lab. & Clin. Med.** 31: 394-99.

C.A.S. ANDRADE, M.T.S. CORREIA, L.C.B.B. COELHO, S.C. NASCIMENTO, N.S. SANTOS-MAGALHAES, **Int. J. Pharm.** 278 (2004) 435.

CAMPOS-OLIVA, R.; HERR, I.; BORMANN, C.; B.; GRONENBORN, A.M. (2001); Solution structure, backbone dynamics and chitin-binding of the anti-fungal protein from *Streptomyces tendae* TU901, **J. Mol Biol.** 308, 765-782.

CARVALHO ACB, DINIZ, MFFM, MUKHERJEE R. 2005. Estudos da atividade antidiabética de algumas plantas de uso popular contra o diabetes no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 86: 11-16.

CORREIA, M. T. S. E COELHO, L. C. B. B. (1995). Purification of a glucose/mannose specific lectin, isoform seeds of *Cratylia mollis* Mart. (camaratu bean). **Appl. Biochem. Biotechnol.** 55: in press.

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, n.5, p. 295-300, 2000.

E.V.M. MACIEL, V.S. ARAUJO, M. NAKAZAWA, Y.M. GOMES, L.C.B.B. COELHO, M.T.S. CORREIA, **Biologicals** 32 (2004) 57.

GILBOA-GARBENR, ., MIZRAHI, L. & GARBER, N. (1977). Mannose-binding hemagglutinins in extracts of *Pseudomonas aeruginosa*. **Canadian Journal of Biochemistry** 55, 975-981.

HUANG, X.; XIE, W.; GONG, A. (2000); Characteristics and antifungal activity of a chitin binding protein from ginkgo biloba, **FEBS Lett.** 478, 123-126

HUANG, X.; XIE, W.; GONG, A. (2000); Characteristics and antifungal activity of a chitin binding protein from ginkgo biloba, **FEBS Lett.** 478, 123-126.

IWAKURA K *et al.* (2001) Predictive factors for development of the no-reflow phenomenon in patients with reperfused anterior wall acute myocardial infarction. **J Am Coll Cardiol** 38: 472-477.

KENNEDY, J. F., PAIVA, P. M. G., CORREIA, M. T. S., CAVALCANTI, M. S. M. E COELHO, L. C. B. B. (1995). Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydr. Polym.** 26:219-30.

LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** 227: 680-5.

LATHA, V.L., RAO, R.N. AND NADIMPALLI, S.K. (2006) Affinity purification, physicochemical and immunological characterization of a galactose-specific lectin from the seeds of *Dolichos lablab* (Indian lablab beans). **Protein Expr Purif** 45, 296–306.

LI-JUN, L.; CHUAN-HE, Z.; ZHENG, Z. Analyzing molecular weight distribution of whey protein hydrolysates. **Food Bioprod. Proc.**, v. 86, n. 1, p. 1-6, 2007.

LIU B, LI C-Y, BIAN H-J, MIN M-W, CHEN L-F, BAO J-K. Antiproliferative activity and apoptosis-inducing mechanism of Concanavalin A on human melanoma A375 cells **Arch Biochem Biophys** 2009; 482:1-6.

LOWRY, O.H., ROSEMBROUGH, N.J., FARR, A. L. E RANDALL, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193: 265-75.

MACEDO, M.L.R., FREIRE, M.G.M., MARTINS, L.T.D.M., MARTINEZ, D.S.T., GOMES, V.M.G., SMOLKA, M.B., TOYAMA, M.H., MARANGONI, S., COELHO, L.C.B.B. (2004). Avaliação in vitro do efeito de lectinas De sementes de *talisia esculenta* e *labramia Bojeri* sobre o biofilme oral **J. Agric. Food Chem.**, 52, 7548-7554.

MONTENEGRO L.H.M., OLIVEIRA P.E.S., CONSERVA L.M., ROCHA E.M.M., BRITO A.C., ARAÚJO R.M., TREVISAN M.T.S., LEMOS R.P.L. 2006. Terpenóides e avaliação do potencial antimalárico, larvicida, anti-radicalar e anticolinesterásico de *Pouteria venosa* (Sapotaceae). **Rev Bras Farmacogn** 16 (Supl.): 611-617.

NASCIMENTO CO, COSTA RMPB, ARAÚJO RMS, CHAVES MEC, COELHO LCBB, PAIVA PMG, TEIXEIRA JA, CORREIA MTS, CARNEIRO-DA-CUNHA MG. Optimized extraction of a lectin from *Crataeva tapia* bark using AOT in isoctane reversed micelles. **Process Biochem** 2008;43:779-782.

NGAI, P.H.K. and NG, T.B. (2004) A mushroom (*Ganoderma capense*) lectin with spectacular thermostability, potent mitogenic activity toward tumor cells. **Biochem Biophys Res Commun** 314, 988–993.

OTTENSOOSER F, NAKAMIZO Y, SATO M, MIYAMOTO Y, TAKIZAWA K. Lectins detecting group C streptococci. **Infect Immun.** 1974 ;9 (5):971–973.

PAJIC I, KLJAJIC Z, DOGOVIC N, SLADIC D, JURANIC Z, GASIC MJ. A novel lectin from the sponge *Haliclona cratera*: isolation, characterization and biological activity. **Comp Biochem Physiol Part C: Toxicol Pharmacol** 2002; 132:213-221.

PERFEITO J.P., SANTOS ML, LÓPEZ K.S.E., PAULA JE, SILVEIRA D 2005. Characterization and biological properties of *Pouteria torta* extracts: a preliminary study. **Rev Bras Farmacogn** 15: 183-186.

SHARON N. AND LIS H. (2004). History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology** 14, 53R-62R

SHARON, N. (1993) Lectin-carbohydrate complexes of plants and animals: an atomic view. **Trends Biochem. Sci.**, 18, 221–226.

STOEVA, S.; FRANZ, M.; WACKER, R.; KRAUSPENHAAR, R.; GUTHOHRLEIN, E.; MIKHAILOV, A.; BETZEL, C.; VOELTER, W. (2001). Primary structure, isoforms and molecular modeling of a chitin-binding mistletoe lectin; **Arch. Biophys.** 392, 23-31.

SUZUKI, M.; MORIMATSU, M.; SYUTO, B. (2002); The identification and properties of chitin-binding protein b01 (CBpb01), **J. Vet. Med. Sci.** 64, 477-481.

TAKAHASHI KG, 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*. *Comp Biochem Physiol Part B: Biochem Mol Biol* 2008; 150:45-52.

TRINDADE, M. B. (2005) Purificação, caracterização e estudos estruturais de duas lectinas ligantes de quitina das sementes do gênero *Artocarpus*. São Paulo, pág. 85. Tese (Doutorado) Universidade de São Paulo.

VAN DELLEN, K.; GHOSH, S.K.; ROBBINS, LOFTUS, B.; SAMUELSON, J. (2002); *Entamoeba histolytica* lectins contain unique 6-Cys or 8-Cys chitin-binding domains, **Infect. Immun.** 70, 3259-3263.

VUOCOLO, T.; EISEMANN, C. H.; PEARSON, R.D.; WILLADSEN, P.; TELLAM, E.L. (2001); Identification and molecular characterization of a peritrophin gene, peritrophin-48 from the myiasis fly *Chrysomya bezziana*, **Insect Biochem. Molec.** 31 919-932.

WONG, J.H., WONG, C.C.T. AND NG, T.B. (2006) Purification and characterization of a galactose-specific lectin with mitogenic activity from pinto beans. *Biochim Biophys Acta* 1760, 808–813.

Tabela 1 - Extração e obtenção da lectina utilizando planejamento fatorial completo $2^4 + 4$

VARIÁVEIS	- 1	0	+1
pH	6.0	7.0	8.0
NaCl (M)	0	0.075	0.15
Tempo (h)	4	8	16
Temperatura (°C)	4	27	40

Tabela 2 - Planejamento fatorial completo (2^4) com um total de 16 extrações e 4 repetições no ponto central, utilizando as variáveis contendo os níveis selecionados na tabela 1.

AMOSTRAS	pH	NaCl	TEMPO	TEMP(°c)	AH	DP	AHE
1	6.0	0	4	4	8192	34,37	238
2	8.0	0	4	4	32768	17,87	1833
3	6.0	0.15	4	4	32768	16,26	2015
4	8.0	0.15	4	4	32768	17,26	1898
5	6.0	0	16	4	16384	28,37	577
6	8.0	0	16	4	32768	27,72	1182
7	6.0	0.15	16	4	8192	20,87	392
8	8.0	0.15	16	4	8192	13,18	621
9	6.0	0	4	40	8192	30,54	268
10	8.0	0	4	40	16384	32,44	505
11	6.0	0.15	4	40	2048	27,94	73
12	8.0	0.15	4	40	4096	23,65	173
13	6.0	0	16	40	8192	31,05	263
14	8.0	0	16	40	4096	24,62	166
15	6.0	0.15	16	40	2048	17,66	115
16	8.0	0.15	16	40	8192	25,09	326
17	7.0	0.075	8	27	8192	20,92	390
18	7.0	0.075	8	27	8192	22,47	364
19	7.0	0.075	8	27	8192	22,37	366
20	7.0	0.075	8	27	8192	20,33	402

Tabela 3 – Tabela de purificação da lectina da entrecasca de *Sideroxylon obtusifolium* (SoBL) com planejamento fatorial (P.F.)

Amostra	Proteína (mg)	Atividade Hemaglutinante		Rendimento (%)	Vezes de purificação
		Específica (units/mg)	Total (units)		
Extração por P. F.	3252	2015	$6,5 \times 10^6$	100	1
Extração baseado no P. F.	7324	3579	$26,2 \times 10^6$	403.07	1,77
(NH ₄) ₂ SO ₄ fração	1726	7593	$13,1 \times 10^6$	201.53	3,77
Quitina	13.6	7529	$1,05 \times 10^5$	1.61	3,73

Para um volume total de 200 mL de extrato bruto.

Lista de figuras

Figura 1. Esquema Cúbico da AHE obtido do design da tabela 1.

Figura 2. Purificação por quitina (14.3 mg de proteína). Seta indica eluição com ácido acético 1 M. Absorbância a 280 nm (-□-); log da AH (-●-).

Figura 3. SDS-PAGE foi desenvolvido em sistema descontinuo 12% de gel de separação e 5% de gel de empacotamento (MM) padrão de massa molecular. (B) Extrato. (C) Fração 60-80%. (D) 100 ug e (E) 200 ug de SoBL. Miosina (205 kDa), β -galactosidase de *E. Coli* (116 kDa), Fosforilase b (97.4 kDa), Frutose-6-fosfato quinase (84 kDa), BSA (66 kDa), glutamico desidrogenase (55 kDa), ovoalbumina (45 kDa), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (36 kDa), anidrase carbonica (29 kDa), tripisinogênio (24 kDa), Inibidor de tripsina de soja (20 kDa), α -lactoalbumina (14.2 kDa) e aprotinina (6.5 kDa).

Figura 4. Efeito da temperatura e pH sobre AHE. AHE em NaCl 0.15M com eritrócitos de coelho foi 7539 em pH 5.0 a 25 °C.

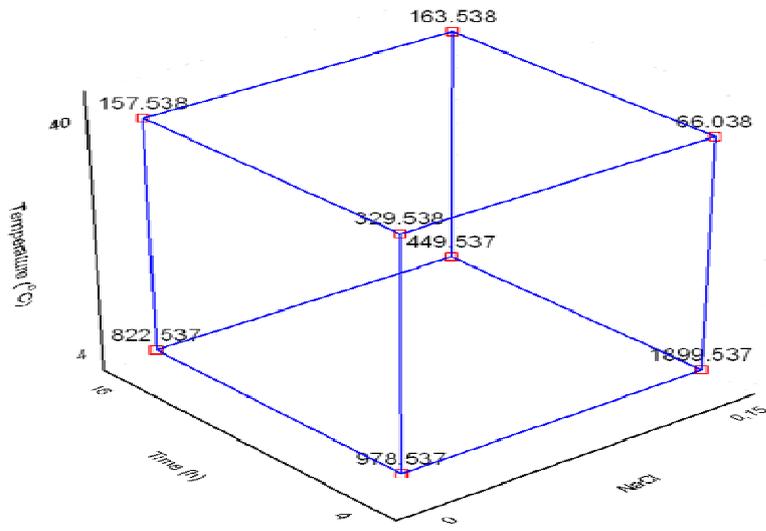


Figura 1

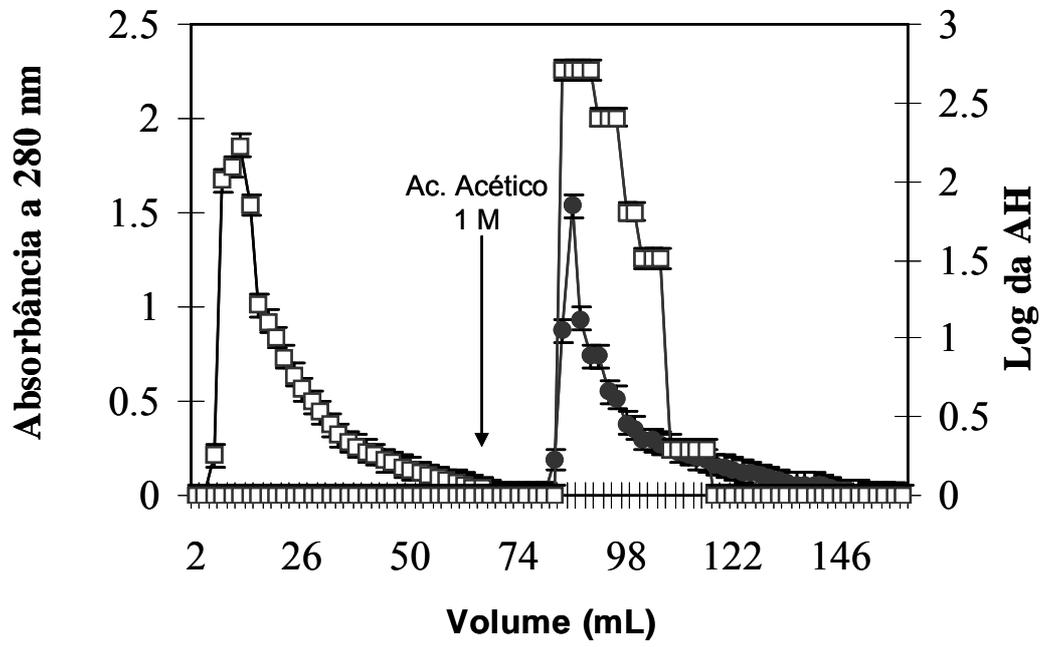


Figura 2

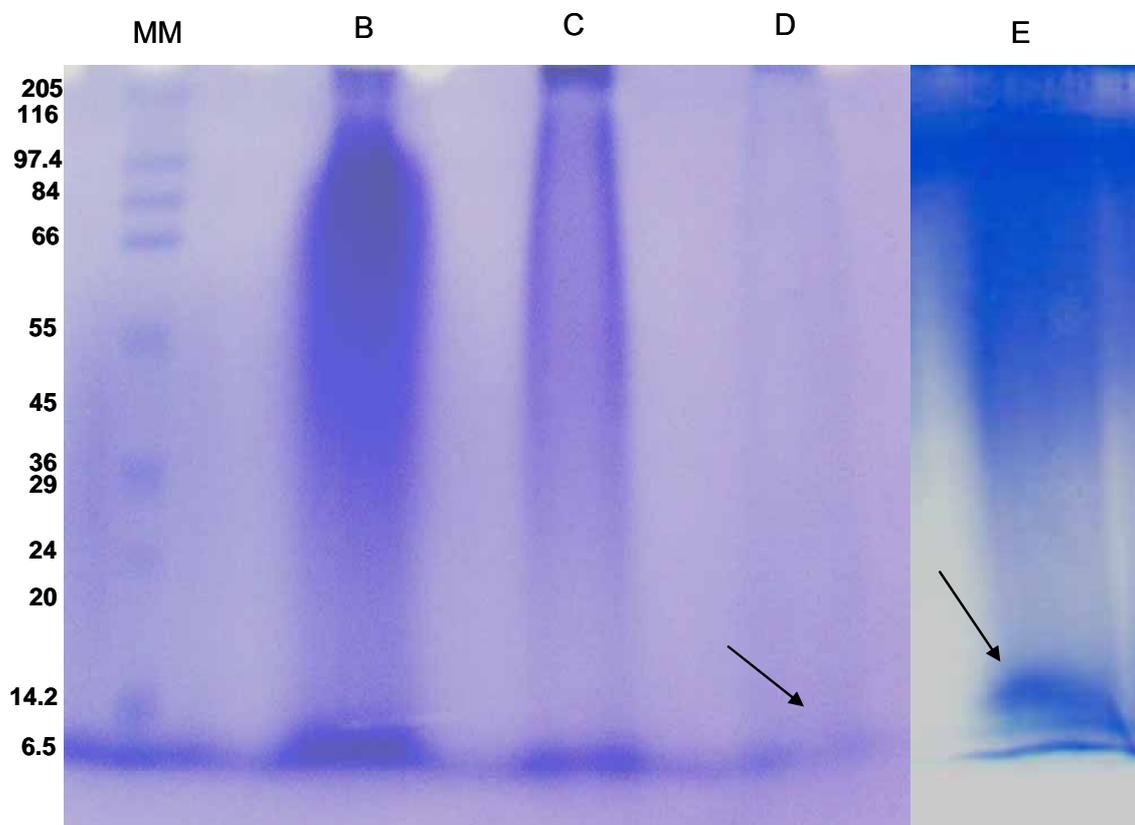


Figura 3

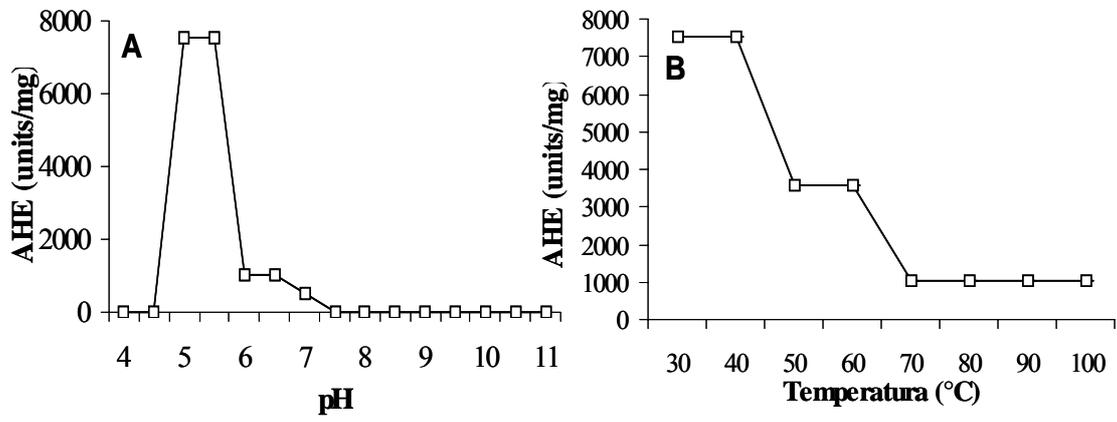


Figure 4

5. CONCLUSÕES

No presente estudo da espécie *Sideroxylon obtusifolium* foi obtida a primeira lectina obtida por meio do planejamento fatorial e por um único processo cromatográfico, indicando que esta proteína faz parte da família das lectinas ligantes de quitina. Por meio desta característica pode-se sugerir que SoBL poderá apresentar um potencial biológico importante, visto que muitas lectinas desta família apresentam interessante atividade biológica. A identificação de SoBL como uma lectina termoestável possibilita sua futura utilização de forma segura em formulações, abrindo espaço para novas investigações relacionadas à suas funções e aplicações biotecnológica. Futuras descobertas de aplicações de lectinas obtidas por plantas medicinais podem desta forma abrir importantes possibilidades na medicina alternativa, levando em consideração o grande e diversificado potencial de lectinas e do potencial fitoterápico de *S. obtusifolium*.

6. ANEXOS

Normas do periódico especializado, ao qual o trabalho da dissertação será submetido.

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Objetivo

A Revista Brasileira de Botânica é a publicação oficial da Sociedade Botânica de São Paulo - SBSP, cujo objetivo é publicar artigos originais de pesquisa científica em Botânica, em português, espanhol ou inglês.

Normas editoriais

Os manuscritos completos (incluindo figuras e tabelas), em quatro cópias, devem ser enviados ao Editor Responsável da Revista Brasileira de Botânica no endereço abaixo.

A aceitação dos trabalhos depende da decisão do Corpo Editorial. Os artigos devem conter as informações estritamente necessárias para a sua compreensão. Artigos que excedam 15 páginas impressas (cerca de 30 páginas digitadas, incluindo figuras e tabelas), poderão ser publicados, a critério do Corpo Editorial, devendo o(s) autor(es) cobrir(em) o custo adicional de sua publicação. Igualmente, fotografias coloridas poderão ser publicadas a critério do Corpo Editorial, devendo o(s) autor(es) cobrir(em) os custos de publicação das mesmas. As notas científicas deverão apresentar contribuição científica ou metodológica original e não poderão exceder 10 páginas digitadas, incluindo até 3 ilustrações (figuras ou tabelas). Notas científicas seguirão as mesmas normas de publicação dos artigos completos. Serão fornecidas gratuitamente 20 separatas dos trabalhos nos quais pelo menos um dos autores seja sócio quite da SBSP. Para os demais casos, as separatas poderão ser solicitadas por ocasião da aceitação do trabalho e fornecidas mediante pagamento.

Instruções aos autores

Preparar todo o manuscrito com numeração seqüencial das páginas utilizando: Word for Windows versão 6.0 ou superior; papel A4, todas as margens com 2 cm; fonte Times New Roman, tamanho 12 e espaçamento duplo. Deixar apenas um espaço entre as palavras e não hifenizá-las. Usar tabulação (tecla Tab) apenas no início de parágrafos. Não usar negrito ou sublinhado. Usar itálico apenas para nomes científicos ou palavras e expressões em latim.

Formato do manuscrito

Primeira página - Título: conciso e informativo (em negrito e apenas com as iniciais maiúsculas); nome completo dos autores (em maiúsculas); filiação e endereço completo como nota de rodapé, indicando autor para correspondência e respectivo e-mail; título resumido. Auxílios, bolsas recebidas e números de processos, quando for o caso, devem ser referidos no item Agradecimentos.

Segunda página - ABSTRACT (incluir título do trabalho em inglês), RESUMO (incluir título do trabalho em português), Key words (até 5, em inglês). O Abstract e o Resumo devem conter no máximo 250 palavras.

Texto - Iniciar em nova página colocando seqüencialmente: Introdução, Material e métodos, Resultados/ Discussão, Agradecimentos e Referências bibliográficas.

Citar cada figura e tabela no texto em ordem numérica crescente. Colocar as citações bibliográficas de acordo com os exemplos: Smith (1960) / (Smith 1960); Smith (1960, 1973); Smith (1960a, b); Smith & Gomez (1979) / (Smith & Gomez 1979); Smith et al.

(1990) / (Smith et al. 1990); (Smith 1989, Liu & Barros 1993, Araujo et al. 1996, Sanches 1997).

Em trabalhos taxonômicos, detalhar as citações de material botânico, incluindo ordenadamente: local e data de coleta, nome e número do coletor e sigla do herbário, conforme os modelos a seguir: BRASIL: Mato Grosso: Xavantina, s.d., H.S. Irwin s.n. (HB 3689). São Paulo: Amparo, 23/12/1942, J.R. Kuhlmann & E.R. Menezes 290 (SP); Matão, ao longo da BR 156, 8/6/1961, G. Eiten et al. 2215 (SP, US).

Citar referências a resultados não publicados ou trabalhos submetidos da seguinte forma: (S.E. Sanchez, dados não publicados)

Citar números e unidades da seguinte forma:

- Escrever números até nove por extenso, a menos que sejam seguidos de unidades ou indiquem numeração de figuras ou tabelas.
- Utilizar, para número decimal, vírgula nos artigos em português ou espanhol (10,5 m) ou ponto nos artigos escritos em inglês (10.5 m).
- Separar as unidades dos valores por um espaço (exceto para porcentagens, graus, minutos e segundos de coordenadas geográficas); utilizar abreviações sempre que possível.
- Utilizar, para unidades compostas, exponenciação e não barras (Ex.: mg.dia-1 ao invés de mg/dia, $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ ao invés de $\mu\text{mol}/\text{min}$).

Não inserir espaços para mudar de linha, caso a unidade não caiba na mesma linha.

Não inserir figuras no arquivo do texto.

Referências bibliográficas - Indicar ao lado da referência, a lápis, a página onde a mesma foi citada.

Adotar o formato apresentado nos seguintes exemplos:

ZAR, J.H. 1999. Biostatistical analysis. Prentice-Hall, New Jersey.

YEN, A.C. & OLMSTEAD, R.G. 2000. Phylogenetic analysis of *Carex* (Cyperaceae): generic and subgeneric relationships based on chloroplast DNA. In *Monocots: Systematics and Evolution* (K.L. Wilson & D.A. Morrison, eds.). CSIRO Publishing, Collingwood, p.602-609.

BENTHAM, G. 1862. Leguminosae. Dalbergiae. In *Flora brasiliensis* (C.F.P. Martius & A.G. Eichler, eds.). F. Fleischer, Lipsiae, v.15, pars 1, p.1-349.

DÖBEREINER, J. 1998. Função da fixação de nitrogênio em plantas não leguminosas e sua importância no ecossistema brasileiro. In *Anais do IV Simpósio de Ecossistemas Brasileiros* (S. Watanabe, coord.). ACIESP, São Paulo, v.3, p.1-6.

FARRAR, J.F., POLLOCK, C.J. & GALLAGHER, J.A. 2000. Sucrose and the integration of metabolism in vascular plants. *Plant Science* 154:1-11.

Citar dissertações ou teses somente em caráter excepcional, quando as informações nelas contidas forem imprescindíveis ao entendimento do trabalho e quando não estiverem publicadas na forma de artigos científicos. Nesse caso, utilizar o seguinte formato:

SANO, P.T. 1999. Revisão de *Actinocephalus* (Koern.) Sano - Eriocaulaceae. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Não citar resumos de congressos.

Tabelas

Usar os recursos de criação e formatação de tabela do Word for Windows. Evitar abreviações (exceto para unidades).

Colocar cada tabela em página separada e o título na parte superior conforme exemplo:

Tabela 1. Produção de flavonóides totais e fenóis totais (% de peso seco) em folhas de *Pyrostegia venusta*.

Não inserir linhas verticais; usar linhas horizontais apenas para destacar o cabeçalho e para fechar a tabela.

Em tabelas que ocupem mais de uma página, acrescentar na(s) página(s) seguinte(s) "(cont.)" no início da página, à esquerda.

Figuras

Submeter um conjunto de figuras originais em preto e branco e três cópias com alta resolução.

Enviar ilustrações (pranchas com fotos ou desenhos, gráficos mapas, esquemas) no tamanho máximo de 15 x 21 cm, incluindo-se o espaço necessário para a legenda. Não serão aceitas figuras que ultrapassem o tamanho estabelecido ou que apresentem qualidade gráfica ruim. Figuras digitalizadas podem ser enviadas, desde que possuam nitidez e que sejam impressas em papel fotográfico ou "glossy paper".

Gráficos ou outras figuras que possam ser publicados em uma única coluna (7,2 cm) serão reduzidos; atentar, portanto, para o tamanho de números ou letras, para que continuem visíveis após a redução. Tipo e tamanho da fonte, tanto na legenda quanto no gráfico, deverão ser os mesmos utilizados no texto. Gráficos e figuras confeccionados em planilhas eletrônicas devem vir acompanhados do arquivo com a planilha original.

Colocar cada figura em página separada e o conjunto de legendas das figuras, seqüencialmente, em outra(s) página(s).

Utilizar escala de barras para indicar tamanho. A escala, sempre que possível, deve vir à esquerda da figura; o canto inferior direito deve ser reservado para o número da(s) figura(s).

Detalhes para a elaboração do manuscrito são encontrados nas últimas páginas de cada fascículo. Sempre que houver dúvida consulte o fascículo mais recente da Revista.

O trabalho somente receberá data definitiva de aceitação após aprovação pelo Corpo Editorial, tanto quanto ao mérito científico como quanto ao formato gráfico. A versão final do trabalho, aceita para publicação, deverá ser enviada em uma via impressa e em disquete, devidamente identificados.

Resumo SBBq 2009.

XXXVIII Reunião Anual da SBBq
Águas de Lindóia, São Paulo, 16 a 19 de maio de 2009



Extraction Factorial Design Evaluation of *Sideroxylon obtusifolium* Bark Lectin



Santana, M.F.¹, Carneiro, A.J.O.L.L.², Cahú, G.G.O.M.¹, Coelho, L.C.B.B.¹, Porto, T.³, Correia, M. T. S.¹

1 - Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.
2 - Núcleo em Educação à Distância, Faculdade de Formação de Professores de Nazaré da Mata, Universidade de Pernambuco, Nazaré da Mata, Brasil.
3 - Laboratório de Imunopatologia Keizo Azami- LIKA, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

INTRODUCTION

Sideroxylon obtusifolium, plant popularly known as *quixabeira* (Figure 1) is an abundant species in the Caatinga Region of Northeastern Brazil. The tree is widely used in popular medicine for its astringent, tonic, anti-diabetic and healing properties. The use of a statistical planning is justified in the evaluation of appropriate biochemical methods to minimize biological material, optimize the time and ensure high-reliability statistical results (95%).



Figure 1 - *Sideroxylon obtusifolium* tree

OBJECTIVE

This study aims to determine the best extraction conditions for *S. obtusifolium* bark lectin through a factorial design.

MATERIALS AND METHODS

A full factorial design (2^4) was used (Table 1), which was evaluated in four independent variables: pH values (6.0, 7.0 and 8.0); NaCl concentrations (distilled water, 0.075 M and 0.15 M), time (4, 8 and 16 h) and temperature (4, 24 and 40 °C) of extraction. The lectin activity was evaluated through specific hemagglutinating activity (SHA) in each extract.

RESULTS

The results (Table 1) showed that temperature (4° C) was the best variable (Figure 2), showing significant effects for SHA, followed by time (4 h), pH (6.0) and addition of NaCl (0.15 M).

TABLE 1 - Variable analysis for *S. obtusifolium* bark lectin extraction

	pH	NaCl (M)	TIME	TEMPERATURE (°C)	AH	Protein (mg/ml)	SHA
1	6.0	0	4	4	8192	34.37	238
2	8.0	0	4	4	32768	17.87	1.833
3	6.0	0.15	4	4	32768	16.26	2.015
4	8.0	0.15	4	4	32768	17.26	1.898
5	6.0	0	16	4	16384	28.37	577
6	8.0	0	16	4	32768	27.72	1.182
7	6.0	0.15	16	4	8192	20.87	392
8	8.0	0.15	16	4	8192	13.18	621
9	6.0	0	4	40	8192	30.54	268
10	8.0	0	4	40	16384	32.44	505
11	6.0	0.15	4	40	2048	27.94	73
12	8.0	0.15	4	40	4096	23.65	173
13	6.0	0	16	40	8192	31.05	263
14	8.0	0	16	40	4096	24.62	166
15	6.0	0.15	16	40	2048	17.66	115
16	8.0	0.15	16	40	8192	25.09	-326
17	7.0	0.075	8	27	8192	20.97	390
18	7.0	0.075	8	27	8192	22.47	364
19	7.0	0.075	8	27	8192	22.37	366
20	7.0	0.075	8	27	8192	20.33	402

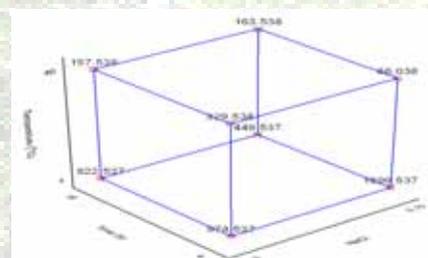


Figure 2 - Cubic plot of the SHA effect obtained in the design of Table 1.

CONCLUSION

The obtained results revealed that the factorial design was an efficient technique to help the determination of the best conditions for lectin extraction. The steps followed, with the best settings, will help in *S. obtusifolium* lectin investigation.

Supported by : CAPES, CNPq, PRONEX/FACEPE, UFPE