

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

**PURIFICAÇÃO DA LECTINA DE
SEMENTES DE *Moringa oleifera* (WSMoL) E
AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE**

LUCÍOLA A. D. M. M. ROLIM

RECIFE
2007

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

PURIFICAÇÃO DA LECTINA DE SEMENTES DE *Moringa oleifera* (WSMoL) E AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

ORIENTADOR: Prof^ª Dr^a Patrícia Maria Guedes Paiva

CO-ORIENTADOR: Prof^ª Dr^a Silvia Regina B. de Medeiros

RECIFE

2007

Rolim, Lucíola A. D. M. M.

Purificação da lectina de sementes de *Moringa oleifera* (WSMoL) e avaliação da genotoxicidade / Lucíola A. D. M. M. Rolim. – Recife: O Autor, 2007.

vii, 67 folhas : il., fig.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Bioquímica, 2007.

Inclui bibliografia e anexo.

1. Proteínas 2. Lectinas 3. Moringa oleifera 4. Genotoxicidade I. Título.

577.112 CDU (2.ed.)

UFPE

572.6 CDD (22.ed.)

CCB – 2007-075

"Que mágico poder é aquele encontrado nas plantas, nas ervas...! Em tudo aquilo que nasce da terra nada é isento de algo que tenha em si qualquer coisa de bom; e nada daquilo que é bom está isento de poder se transformar em veneno!"

(Shakespeare-Romeu e Julieta, ato III, cena 3)

Ata da defesa de dissertação da Mestranda **Lucíola Abílio Diniz Melquíades de Medeiros Rolim**, realizada em 28 de fevereiro de 2007, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Às 09:15 minutos do dia 28 de fevereiro de 2007, foi aberto, no Auditório Prof. Marcionilo Lins - Depto. de Bioquímica/UFPE, o ato de defesa de dissertação da mestranda **Lucíola Abílio Diniz Melquíades de Medeiros Rolim**, aluna do Curso de Mestrado em Bioquímica/CCB/UFPE. Iniciando os trabalhos, a Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva, Vice-Coordenadora do Curso supra citado, fez a apresentação da aluna, de sua orientadora, ela própria, de sua Co-Orientadora Profa. Dra. Profa. Dra. Sílvia Regina Batistuzzo de Medeiros, do Laboratório de Biologia Molecular e Genômica da UFRN, e da Banca Examinadora composta pelos professores doutores: Patrícia Maria Guedes Paiva, na qualidade de Presidente, Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho, Maria Tereza dos Santos Correia, os três do Depto. de Bioquímica, e Adriana Carla Cavalcante Malta Argolo, Pesquisadora do CCB/UFPE. Após as apresentações, a Sra. Presidente convidou a aluna para a apresentação de sua dissertação intitulada: **"Purificação da lectina de sementes de *Moringa oleifera* (WSMol) e avaliação da genotoxicidade"**, e informou que de acordo com o Regimento Interno do Curso, o candidato disporia de até 50 (cinquenta) minutos para apresentação do trabalho e o tempo de arguição para cada examinador, juntamente com o tempo gasto pela aluna para responder às perguntas seria de 30 (trinta) minutos. A aluna procedeu à explanação e comentários acerca do tema em 45 (quarenta e cinco) minutos. Após a apresentação da mestranda, a Sra. Presidente convidou a Banca Examinadora para ocupar seus lugares e passou a palavra ao primeiro examinador, a Profa. Dra. Adriana Carla Cavalcante Malta Argolo, em seguida para a Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia e finalmente para a Profa. Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho, as quais agradeceram o convite, fizeram alguns comentários e sugestões. Ao final de suas respectivas arguições, as referidas professoras deram-se por satisfeitas. Em seguida, a Sra. Presidente usou da palavra para tecer alguns comentários, agradecer à Banca Examinadora e parabenizar a candidata. Finalmente, a sessão foi suspensa para proceder ao julgamento pela Banca Examinadora, a qual se reuniu na Secretaria do Curso. Após alguns comentários, a Banca decidiu, por unanimidade, conceder a menção **"Aprovada com Distinção"**. Nada mais havendo a tratar, lavrei a presente ata que vai assinada por mim, Secretário, e demais membros da Banca Examinadora. Recife, 28 de fevereiro de 2007.

por Milton de Queiroz

Patrícia M. Guedes Paiva
Tereza Correia
Adriana Carla C. M. Argolo
Luana C. B. Barroso Coelho

Ata da defesa de dissertação da Mestranda **Luciôla Abílio Diniz Melquíades de Medeiros Rolim**, realizada em 28 de fevereiro de 2007, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Às 09:15 minutos do dia 28 de fevereiro de 2007, foi aberto, no Auditório Prof. Marcionilo Lins - Depto. de Bioquímica/UFPE, o ato de defesa de dissertação da mestranda **Luciôla Abílio Diniz Melquíades de Medeiros Rolim**, aluna do Curso de Mestrado em Bioquímica/CCB/UFPE. Iniciando os trabalhos, a Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva, Vice-Coordenadora do Curso supra citado, fez a apresentação da aluna, de sua orientadora, ela própria, de sua Co-Orientadora Profa. Dra. Profa. Dra. Silvia Regina Batistuzzo de Medeiros, do Laboratório de Biologia Molecular e Genômica da UFRN, e da Banca Examinadora composta pelos professores doutores: Patrícia Maria Guedes Paiva, na qualidade de Presidente, Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho, Maria Tereza dos Santos Correia, os três do Depto. de Bioquímica, e Adriana Carla Cavalcante Malta Argolo, Pesquisadora do CCB/UFPE. Após as apresentações, a Sra. Presidente convidou a aluna para a apresentação de sua dissertação intitulada: **"Purificação da lectina de sementes de *Moringa oleifera* (WSMol) e avaliação da genotoxicidade"**, e informou que de acordo com o Regimento Interno do Curso, o candidato disporia de até 50 (cinquenta) minutos para apresentação do trabalho e o tempo de arguição para cada examinador, juntamente com o tempo gasto pela aluna para responder às perguntas seria de 30 (trinta) minutos. A aluna procedeu à explanação e comentários acerca do tema em 45 (quarenta e cinco) minutos. Após a apresentação da mestranda, a Sra. Presidente convidou a Banca Examinadora para ocupar seus lugares e passou a palavra ao primeiro examinador, a Profa. Dra. Adriana Carla Cavalcante Malta Argolo, em seguida para a Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia e finalmente para a Profa. Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho, as quais agradeceram o convite, fizeram alguns comentários e sugestões. Ao final de suas respectivas arguições, as referidas professoras deram-se por satisfeitas. Em seguida, a Sra. Presidente usou da palavra para tecer alguns comentários, agradecer à Banca Examinadora e parabenizar a candidata. Finalmente, a sessão foi suspensa para proceder ao julgamento pela Banca Examinadora, a qual se reuniu na Secretaria do Curso. Após alguns comentários, a Banca decidiu, por unanimidade, conceder a menção **"Aprovada com Distinção"**. Nada mais havendo a tratar, lavrei a presente ata que vai assinada por mim, Secretário, e demais membros da Banca Examinadora. Recife, 28 de fevereiro de 2007.

por Milton de Queiroz

Patrícia M. Guedes Paiva
Tereza Correia
Adriana Carla C. M. Argolo
Luana C. B. Barroso Coelho

AGRADECIMENTOS

- A Deus que está sempre presente em minha vida.
- À minha orientadora Professora Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva pelo inestimável apoio científico, incentivo, amizade e carinho.
- À Professora Dra. Silvia Regina Batistuzzo de Medeiros pela orientação nos testes de genotoxicidade e pelo gentil acolhimento no Laboratório de Biologia Molecular e Genômica (LBMG) e no Laboratório de mutagênese ambiental (LAMA).
- À Professora Dra. Luanna C. B. B. Coelho pelas sugestões e revisão do trabalho.
- À Maria Barbosa Reis pelo suporte técnico e prestimosidade indispensáveis para a realização deste trabalho.
- Aos amigos da turma de mestrado, em especial a Juliene, Raquel, Jayra, Cynthia e Fernanda, pelo companheirismo e convivência muito agradável.
- À grande família do Laboratório de Glicoproteínas pela união e solidariedade, especialmente a Roberto, Gyseli, Lidiane, Romero, Adriana, Andréa, Regina e Mariana, que sempre colaboraram de diferentes formas na realização desse trabalho.
- À Tiago, Cynthia e Fernando pela disponibilidade e colaboração na confecção dos gráficos e figuras.
- Ao apoio e colaboração do pessoal do LBMG, em especial a Herbert e Fernanda, fundamentais na realização dos experimentos de genotoxicidade/mutagenicidade, todo o meu carinho e reconhecimento.

- Aos amigos do LAMA, que contribuíram bastante para a realização do teste de Kado e *Allium cepa*, em especial a Jefferson e Jana Dara.
- Aos funcionários do departamento de bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco pela constante disponibilidade e simpatia, especialmente a Miron.
- Ao meu esposo, Jânio, o maior incentivador desse projeto, pela força transmitida nos momentos difíceis, o amor, o carinho e o entusiasmo. Todo o meu amor.
- Aos meus pais, Bosco e Lúcia, que sempre estiveram presentes em minha vida, como alicerce e exemplos de vida, acompanhando cada passo, dando equilíbrio e incentivo.
- Às minhas irmãs, Luanna e Layse Julia, minhas melhores amigas e companheiras de todas as horas que vibram comigo a cada conquista.
- À todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: <i>Moringa oleifera</i> , aspectos gerais. Folhas (A), vagem (B), vagem com sementes (C) e sementes (D).....	6
--	---

LISTA DE ABREVIATURA

AH	Atividade hemaglutinante
AHE	Atividade hemaglutinante específica
AS-PTA	Accesoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa
CFUs	Unidade formadora de colônia do inglês Colony-Forming Units.
DNA	Ácido desoxirribonucléico
IPA	Instituto de Pesquisa Agropecuária de Pernambuco
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida do inglês polyacrylamide gel electrophoresis
SDS	Dodecil sulfato de sódio
WSMoAC	Composto antioxidante de <i>Moringa oleifera</i> solúvel em água, do inglês Water Soluble <i>Moringa oleifera</i> antioxidant compound
WSMoL	Lectina de <i>Moringa oleifera</i> solúvel em água, do inglês Water Soluble <i>Moringa oleifera</i> lectin.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	I
LISTA DE FIGURAS.....	III
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IV
SUMÁRIO.....	V
RESUMO.....	VI
ABSTRACT.....	VII
1. Introdução.....	1
1.1 <i>Moringa. Oleifera</i>	1
1.2 Lectinas... ..	7
1.3 Genotoxicidade	11
2.0 Objetivos.....	17
2.1 Geral.....	17
2.2 Específicos.....	17
3.0 Referências.....	18
4.0 ARTIGO “<i>Moringa oleifera</i> seed lectin had coagulant property and was not a genotoxic agent, however extracts of seeds promoted micronucleus formation”.....	30
5.0 Conclusões	60
6.0 Anexos	61
6.1 Abstract apresentado em congresso.....	61
6.2 Certificado de Menção honrrrosa.....	62
6.3 Normas para publicação na Water Research.....	63

RESUMO

O trabalho reporta o isolamento e caracterização da lectina de sementes de *Moringa oleifera* (WSMoL). Seu efeito sobre a turbidez da água bem como o potencial genotóxico/mutagênico da água tratada com diferentes concentrações de sementes de *M. oleifera* (MoW1, MoW2, MoW3 and MoW4) ou WSMoL foram também discutidos. WSMoL, aglutinou diferentes eritrócitos, foi principalmente ativa em pH 6,5 a 7,5 e foi inibida por azocaseína. Cromatografia de gel filtração e perfis eletroforéticos revelaram WSMoL como uma proteína de 102 kDa constituída por subunidades de 5 kDa. Glicosilação não foi detectada. WSMoL apresentou propriedade coagulante similar ao sulfato de alumínio, o coagulante mais comumente usado. As preparações MoW e WSMoL foram negativas no teste de DNA plasmidial, no ensaio de transformação bacteriana e no ensaio *Salmonella typhimurium* usando TA97, TA98 e TA100 na presença ou ausência de metabolização hepática. MoW1 e MoW2 foram também negativas no ensaio *Allium cepa*, contudo formação de micronúcleos foi induzida por MoW3 e MoW4. Os resultados sugerem WSMoL como um componente ativo no processo de purificação da água pelas sementes. WSMoL não foi um agente genotóxico porém genotoxicidade was detected na água tratada com maior concentração de sementes. Este estudo é uma etapa positive no sentido da determinação do uso seguro de sementes de *M. oleifera* para o tratamento da água.

Key Words: *Moringa oleifera*, genotoxicidade, mutagenicidade.

ABSTRACT

The work reports the isolation and characterization of *Moringa oleifera* seed lectin (WSMoL). Its effects on water turbidity as well as genotoxic/mutagenic potential of water treated with different concentrations of *M. oleifera* seeds (MoW1, MoW2, MoW3 and MoW4) or WSMoL were also discussed. WSMoL, agglutinated different erythrocytes, was mainly active at pH 6.5 to 7.5 and inhibited by azocasein. Gel filtration chromatography and electrophoretic profiles revealed WSMoL as 102 kDa protein constituted by 5 kDa subunits. Glycosylation was not detected. WSMoL had coagulant property similar to the most commonly used coagulant aluminum sulfate. MoW preparations and WSMoL were negative in a cell-free plasmid DNA test, bacterial transformation assay and in *Salmonella typhimurium* assay using TA97, TA98 and TA100 at presence or absence of hepatic metabolism. MoW1 and MoW2 were also negative by *Allium cepa* assay however micronucleus formation was induced by MoW3 and MoW4. The results to suggest WSMoL is an active component in the water purification process by seeds. WSMoL was not a genotoxic agent but genotoxicity was detected in water treated with more concentration of seeds. This study is a positive step forward in determining the safe use of *M. oleifera* seeds for water treatment.

Key Words: *Moringa oleifera*, genotoxicity, mutagenicity.

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Moringa oleifera*

Moringa oleifera Lam pertence à família *Moringaceae*. Um gênero único com quatorze espécies conhecidas, sendo a *M. oleifera* (figura 1) a mais conhecida e utilizada de todas (JANH, 1988a). É uma planta tropical nativa do norte da Índia, largamente cultivada nos trópicos e encontrada em muitos países da África, Ásia e América do Sul (SUTHERLAND *et al.*, 1994). Ela cresce rapidamente, através de sementes e mudas, até em solos marginais, demanda pouca ou nenhuma atenção horticultural e possui uma resistência que permite a sua sobrevivência em períodos de seca prolongados (SUTHERLAND *et al.*, 1994). Bezerra *et al.* (2004) relataram que o peso da semente favoreceu a germinação e as sementes mais pesadas proporcionaram plântulas mais vigorosas.

Quase todas as partes da árvore possuem utilidade. As folhas da *M. oleifera* (figura 1B) são usadas como alimentos em alguns países (NDABIGENGESERE & NARASIAH, 1998), possuindo cerca de 23.000 UI de vitamina A sobressaindo-se entre olerícolas consagradas como brócolis, cenoura, couve, espinafre e alface, que possuem, respectivamente, 5.000; 3.700; 2.200; 1.900; 1.000 UI de vitamina A (SILVA & KERR, 1999) e para o tratamento de doenças infecciosas da pele, mucosa e trato respiratório (CÁCERES *et al.*, 1991). Algumas escolas de regiões carentes estão usando as folhas da moringa na merenda escolar como no Instituto de Permacultura da Bahia em Salvador (DELDUQ, 2000). Os frutos que correspondem a vagens com três faces (figura 1, C e D) possuem cerca de 50 cm de comprimento, contendo sementes em forma triangular,

com o miolo circundado por uma delicada casca alada (figura 1E) (ABDULKARIM *et al.*, 2005). Estudo realizado em coelhos sugere que os frutos têm ação hipolipidêmica, anti-aterosclerótica e promove redução do peso corpóreo (MEHTA *et al.*, 2003).

A semente de *M. oleifera* possui 40% do peso constituído por óleo que pode ser usado para cozinhar, na indústria de sabão e como base para cosméticos (SUTHERLAND *et al.*, 1994). O óleo da semente possui propriedades físicas e químicas equivalentes ao azeite de oliva e contém uma grande quantidade de tocoferóis (TSAKNIS *et al.*, 1999). As cascas de *M. oleifera* podem ser usadas para produzir carvão ativado a baixo custo e o processo possui viabilidade tecnológica (POLLARD *et al.*, 1995). A diferença na dosagem ideal entre sementes secas descascadas e com cascas sugere que a proteína ativa esta contida apenas no miolo, portanto sementes descascadas são mais apropriadas para o processo do que as não descascadas (NDABIGENGESERE & NARASIRAH, 1998; NDABIGENGESERE *et al.*, 1995).

Coagulação ou floculação seguido de sedimentação, filtração e desinfecção, geralmente com cloro, é usado mundialmente na indústria de tratamento da água antes da distribuição da água tratada para os consumidores. Durante o processo de desinfecção com cloro, o material orgânico pode agir como precursor de trihalometanos, que podem ser carcinogênicos (AWWA, 1990). Estudos sugerem que sementes de *M. oleifera* podem ser usadas no tratamento industrial da água apenas após a purificação adequada das proteínas ativas, tornando a preparação mais segura e estável para o tratamento da água.

Tem sido demonstrado que extratos de *M. oleifera* têm um largo efeito na remoção da turbidez (redução de 92-99%) e de microorganismos da água (JAHN, 1986; MUYIBI & EVINSON, 1995a; GHEBREMICHAEL *et al.*, 2005). Coagulantes naturais de origem vegetal ou mineral eram utilizados, no processo de tratamento da água, antes do advento

dos sais químicos, mas eles não estavam aptos a competir efetivamente pelo fato de sua efetividade e seu mecanismo de ação não serem bem entendidos cientificamente (NDABIGENGESERE & NARASIAH, 1998). O custo e os efeitos ambientais provocados pelos sais iônicos têm aumentado o interesse no uso de coagulantes orgânicos derivado de plantas, como as sementes de *M. oleifera*, em países em desenvolvimento (JAHN, 1986; MUYIBI & EVINSON, 1995). A técnica foi trazida da África para o Brasil em 1994 e está sendo difundida por organizações não governamentais nas regiões brasileiras. O uso como purificador da água vem sendo divulgado principalmente por entidades ligadas a AS-PTA - ASSESSORIA E SERVIÇOS A PROJETOS EM AGRICULTURA ALTERNATIVA, que publicou uma cartilha sobre o uso de sementes de *M. oleifera* para o tratamento da água baseado nos trabalhos da pesquisadora alemã Dra. Samia Ao Azharia Jahn.

Essa alternativa oferece vantagens em relação aos coagulantes inorgânicos ou polímeros orgânicos sintéticos que estão associados a processos patológicos em humanos (OKUDA *et al.*, 2001a) como a doença de Alzheimer e outras doenças similares relacionadas com problemas associados com o alumínio residual na água tratada (AWWA,1990). Além disso, produzem menos volume de lama comparado com água tratada com alumínio (NDABIGENGESERE & NARASIAH, 1998). A maior desvantagem no uso da *M. oleifera* para o tratamento da água é um significativo aumento do material orgânico (NDABIGENGESERE & NARASIAH, 1998; OKUDA *et al.*, 2001b), não podendo, por isso ser armazenada por mais de 24 horas (JAHN, 1988). Quando extrato bruto da água é estocado por períodos maiores que dois dias, pode ser desenvolvido odor desagradável devido à decomposição microbiana do material orgânico (NDABIGENGESERE & NARASIRAH,1998).

Para remover esse material orgânico pode ser usado adsorção com carbono ou, alternativamente, o coagulante ativo pode ser extraído das sementes e usado na forma pura ou semi-pura, reduzindo, assim, a quantidade total de material orgânico adicionado ao processo de tratamento. Foi observado que após retirar do óleo das sementes, o material residual ainda contém o coagulante ativo para o tratamento da água (SUTHERLAND *et al.*, 1994). Os resíduos sólidos podem ser usados como alimentos para animais e fertilizantes, enquanto a casca pode ser ativada e usada como adsorvente, sendo o coagulante produzido a custo extremamente baixo ou mesmo zero (GHEBREMICHAEL *et al.*, 2005).

As sementes de *M. oleifera* não afetam significativamente o pH, a condutividade e a alcalinidade da água tratada não havendo assim a necessidade de ajustes, já com o sulfato de alumínio é necessário acrescentar bicarbonato ou cal, o que aumenta o volume de material residual, o custo de tratamento, assim como ações corrosivas. No tratamento com *M. oleifera* não é necessário adicionar nenhuma outra substância química. Uma vantagem adicional no problema do material residual é o fato de todos os subprodutos da moringa serem organicamente biodegradáveis, logo a lama pode ser usada como fertilizante contanto que a água tratada não apresente metais pesados (NDABIGENGESERE & NARASIAH, 1998).

O extrato aquoso de sementes de moringa esta longe de ser puro. É uma solução consistindo principalmente de proteínas, lipídios e carboidratos. Uma série de experimentos foi realizada para caracterizar os agentes coagulantes e floculantes da mistura. A coagulação usando moringa é causada pela desestabilização dos colóides negativamente carregados por polieletrólitos catiônicos. O mecanismo predominante de coagulação parece ser adsorção e neutralização de cargas (NDABIGENGESERE *et al.*, 1995). Proteínas positivamente carregadas se ligam a partes da superfície de partículas

negativamente carregadas. Isso leva a formação de partes carregadas negativamente e positivamente nas superfícies das partículas. Devido à colisão das partículas, saturação interpartículas entre diferentes setores carregados, a formação de flocos acontecem (GASSENSCHNIDT *et al.*, 1995).

Estudos têm sido realizados com as proteínas das sementes de *M. oleifera*. GHEBREMICHAEL *et al.* (2005) detectou que o coagulante ativo não é uma proteína única, mas sim uma mistura de proteínas com características físicas similares. Foi demonstrado que uma proteína ativa da semente de *M. oleifera* é dimérica com massa molecular de 13 kDa e subunidades de aproximadamente 6.5 kDa. A proteína possui ponto isoelétrico entre 10 e 11, e tanto os monômeros quanto os dímeros apresentam atividade anticoagulante (NDABIGENGESERE *et al.*, 1995). Uma proteína floculante com massa molecular de aproximadamente 6.5 kDa e ponto isoelétrico acima de 10 foi também isolada das sementes (GASSENSCHMIDT *et al.*, 1995). OKUDA *et al.* (2001a,b) isolaram um coagulante ativo das sementes de *M. oleifera* em extrato salino e caracterizou esse composto como um polieletrólito com peso molecular em torno de 3 kDa, sendo mais eficaz na remoção da turbidez do que o coagulante extraído em água.

Compostos não protéicos foram isolados de sementes de moringa tostadas. Dentre eles 4(α -L-raminosiloxi)-fenilacetoneitrila, 4-hidroxifenilacetoneitrila e 4-hidroxifenilacetamida exibiram atividade mutagênica no teste de micronúcleo e em ensaio *in vivo* usando camundongo albino (VILLASENOR *et al.*, 1989). Os compostos são facilmente solúveis na água e ainda não foi determinado se os mesmos estão presentes em sementes não tostadas (NDABIGENGESERE & NARASIAH, 1998).

Santos *et al.* (2005) detectaram em extratos aquosos das sementes uma proteína com atividade lectínica, WSMoL, e uma atividade antioxidante, WSMoAC. A AH de WSMoL foi detectada com eritrócitos de coelho e inibida por frutose, tiroglobulina, pH 7.0 e aquecimento a 100°C.

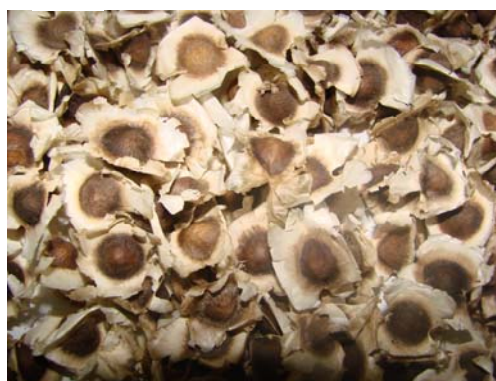
**D**

Figura 1: *Moringa oleifera*, aspectos gerais (A), folhas (B), folhas, flores e vagem (C), vagem exibindo as sementes (D) e sementes aladas (E).

1.2 Lectinas

A primeira descrição a respeito das lectinas foi feita por Peter Hermann Stillmark, em 1888 em sua tese de doutorado, onde isolou das folhas de *Ricinus communis*, a ricina, uma proteína altamente tóxica e que possuía a capacidade de aglutinar eritrócitos. Subsequentemente H. Helin demonstrou a presença de uma hemaglutinina tóxica, a abrina, em extrato de *Abrus precatorius*. Dessa forma, essa classe de proteínas, inicialmente, foi chamada de hemaglutininas ou fitoaglutininas, porque foram originalmente encontradas em extratos de plantas. Paul Erlich utilizou essas hemaglutininas, como modelos de antígenos para estudos imunológicos e conseguiu demonstrar em 1890 inúmeros princípios fundamentais da imunologia, como a especificidade da resposta de anticorpos, o fenômeno da memória imunológica e a transferência da imunidade humoral da mãe para os seus descendentes. Em 1919 James B. Sumner isolou a Concanavalina A da *Canavalia ensiformis*, sendo a primeira lectina pura a ser obtida. Em 1936 foi descoberta a especificidade das lectinas por carboidratos e em 1940 por grupos sanguíneos (SHARON & LIS, 2004). Devido à capacidade das aglutininas das plantas em distinguir eritrócitos dos grupos sanguíneos diferentes, em 1954, Boyde e Shapleigh propuseram o termo lectina, do latim *legere*, que significa reconhecer, escolher (SHARON, 2005).

Atualmente o termo lectina engloba todas as proteínas que possuem pelo menos um sítio não-catalítico capaz de ligar-se reversivelmente a mono e oligossacarídeos específicos (PEUMANS & VAN DAMME, 1996). Representam uma classe heterogênea de proteínas que variam amplamente em tamanho, estrutura, organização molecular, e constituição dos seus sítios de combinação (DRICKAMER, 1988). Suas características em comum são habilidade de se ligar reversivelmente a carboidratos específicos e aglutinar células

(SHARON, 1993). Precipitam polissacarídeos, glicoproteínas e glicolípídeos ligando-se aos açúcares específicos, atuando assim como um reconhecedor celular (SINGH *et al.*, 1999).

As lectinas estão amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em microorganismos, animais, plantas (NGAI & NG, 2004; SANTOS *et al.*, 2004; MOURA *et al.*, 2006; FENG *et al.*, 2006; CHUMKHUNTHOD *et al.*, 2006).

As plantas têm constituído o material de excelência para a obtenção de lectinas isoladas e caracterizadas, sendo a maioria proveniente de sementes de leguminosas (VATTUONE *et al.*, 2001).

Considerando a estrutura global das lectinas de plantas, elas podem ser subdivididas em quatro grupos principais: merolectinas possuem um único domínio de ligação a carboidratos; hololectinas compreendem todas as lectinas que possuem sítios de ligação a carboidratos di- ou multivalente; quimerolectinas proteínas que possuem além de um ou mais sítios de ligação a carboidratos, mais um domínio catalítico adicional ou com outra atividade independente e as superlectinas que também possuem ao menos dois domínios de ligação a carboidratos, mas diferem das hololectinas porque seus sítios são capazes de reconhecer carboidratos estruturalmente não relacionados (PEUMANS & VAN DAMME *et al.*, 1998).

Lectinas de plantas são também subdivididas em cinco grupos de acordo com o monossacarídeo pelo qual exibem maior especificidade: manose/glucose, galactose/N-acetilgalactosamina, N-acetilglicosamina, L-fucose, ácido siálico (SHARON & LIS, 1990).

A ligação da lectina com segmentos do carboidrato específico ocorre através de pontes de hidrogênio e interações de Van Der Waals (LIS & SHARON, 1998), e principalmente, interações hidrofóbicas (QUIOCHO, 1986). Os sítios de ligação a carboidrato de lectinas reconhecem e ligam carboidratos através de um mecanismo do tipo

chave e fechadura (KENNEDY *et al.*, 1995). Algumas lectinas também podem conter um segundo tipo de sítio de ligação que pode interagir com um ligante não carboidrato (SINGH *et al.*, 1999).

A presença de lectinas é detectada através de ensaios de hemaglutinação (SANTOS *et al.*, 2005) e a sua especificidade a carboidratos através de ensaios de inibição da atividade hemaglutinante (AH) com diferentes monossacarídeos, oligossacarídeos ou glicoproteínas (NGAI & NG, 2004) ou por ensaios de precipitação de moléculas glicídicas (SHARON & LIS, 1990). O ensaio de inibição da AH é um método indispensável para creditar à ação aglutinante a uma lectina.

Para purificar lectinas o passo inicial é o preparo de extratos salinos ou em solução tampão (KENNEDY *et al.*, 1995). Posteriormente, utiliza-se o fracionamento por *salting out*, onde comumente usa-se o sulfato de amônio $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$, a fim de se precipitar a proteína de interesse, seguido de diálise exaustiva (BASZKIN *et al.*, 2000). São utilizadas também técnicas cromatográficas convencionais como a cromatografia de troca iônica e gel filtração que se baseiam, respectivamente, na carga e no tamanho e forma das moléculas. A aplicação da cromatografia de afinidade é uma das técnicas mais poderosas para a purificação de lectinas. Esta técnica baseia-se na habilidade da proteína de se ligar a carboidratos de forma específica e reversível e a escolha da matriz de afinidade para a lectina é realizada de acordo com sua especificidade a carboidratos (COELHO & SILVA, 2000). A eluição da proteína da matriz de afinidade é feita bioespecificamente, usando o carboidrato ou não-bioespecificamente pela mudança do pH ou da força iônica (KENNEDY *et al.*, 1995).

Para a caracterização de lectinas, utiliza-se eletroforese em condições nativas para proteínas ácidas ou básicas a fim de se avaliar o grau de pureza (SANTOS *et al.*, 2005), e

eletroforese em presença de dodecil sulfato de sódio (SDS), que promove desnaturação protéica, para se estimar a massa molecular (CORREIA & COELHO, 1995).

As lectinas possuem uso significativo na elucidação da estrutura de carboidratos (KENNEDY *et al.*, 1995), são uma ferramenta inestimável para a detecção, isolamento e caracterização de glicoconjugados (LIMA *et al.*, 1997; PAIVA *et al.*, 2003), para histoquímica de células e tecidos (BELTRÃO *et al.*, 2003) e para avaliação das mudanças que ocorrem na superfície celular durante processos fisiológicos e patológicos desde a diferenciação celular até o câncer (MAZUMDAR *et al.*, 1993).

A ligação de lectinas à superfície celular dota as mesmas de diversas propriedades biológicas. A lectina isolada das sementes de *Cratylia mollis*, Cramoll 1,4, estimulou a proliferação de linfócitos humanos (MACIEL *et al.*, 2004) e encapsulada em lipossoma foi avaliada contra o sarcoma 180 (ANDRADE *et al.*, 2004). A BmoLL, lectina das folhas de *Bauhinia monandra*, tem potencial para ser usada como inseticida contra pragas que reduzem a produção agrícola (MACEDO *et al.*, 2006). As lectinas dos cogumelos *Armillaria lúteo-virens*, *Ganoderma capense* e *Schizophyllum commune* apresentaram atividade antiproliferativa contra células de tumor (NGAI & NG, 2004; CHUMKHUNTHOD *et al.*, 2006; FENG *et al.*, 2006). A lectina da esponja marinha *Cliona varians* apresentou atividade contra bactérias Gram positiva como *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* (MOURA *et al.*, 2006).

3.0 Genotoxicidade

Os efeitos genotóxicos e mutagênicos de muitos extratos vegetais têm sido estudados ao longo dos anos por pesquisadores preocupados com o uso indiscriminado de produtos naturais. Alertam para o fato da possibilidade desses produtos causarem danos ao material genético do usuário que podem levar a mutagênese e carcinogênese, além de outros efeitos tóxicos (CARVALHO *et al.*, 2003; GAZDA *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2006). A detecção e a avaliação de efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos dos componentes das plantas são de fundamental importância para minimizar os possíveis riscos desses agentes (VARANDA *et al.*, 2002).

Qualquer evento que induz dano à molécula de DNA pode ser considerado um agente genotóxico. Se esse dano é capaz de mudar a sequência de nucleotídeos da molécula de DNA, então ele é considerado mutagênico. Por outro lado, um agente citotóxico é qualquer substância ou agente físico que cause morte celular, que pode ser induzida por um dano ao DNA ou a outras moléculas como lipídeos e proteínas (EGITO *et al.*, 2004).

A mutagenicidade e a carcinogenicidade estão claramente correlacionadas. O câncer tem muitas causas, mas todas estas exercem seus efeitos em uma classe especial de genes do câncer ou proto-oncogenes. Vários tipos de eventos podem transformar um proto-oncogene em um oncogene, sendo a mutação o principal desses eventos (GRIFFITHS, 2000).

As mutações podem ser gênicas ou cromossômicas. Mutações gênicas são aquelas que ocorrem ao nível de gene, podendo afetar um único par de nucleotídeos ou mais pares de bases de um único gene, alterando ou não o polipeptídeo por ele codificado. Nessa classe estão as substituições de pares de bases, inserções e deleções (FRIEDBERG *et al.*,

1995). As lesões no DNA originam respostas celulares, designadas de reparo, que podem ser classificadas em: reversão direta do dano, excisão do dano e tolerância do dano (FRIEDBERG *et al.*, 1995). As mutações cromossômicas podem afetar vários genes. Essa classe se constitui por alterações tanto no número quanto na estrutura dos cromossomos (THERMAN & SUSMAN, 1996).

Vários testes têm sido utilizados para a avaliação do potencial genotóxico e/ou mutagênico de extratos vegetais, entre eles destacam-se o teste de kado (KADO *et al.*, 1983), o teste *in vitro* com DNA plasmidia, transformação bacteriana e o teste com *Allium cepa* (RANK, 2003).

Dentre os vários ensaios microbianos para avaliação da genotoxicidade, o mais comumente utilizado tem sido o teste desenvolvido por Ames *et al.* (1973) e modificado por Maron e Ames (1983). Esse teste avalia o potencial do composto químico ou misturas complexas de induzirem mutações no genoma de linhagens bacterianas mutantes (auxotróficas) revertendo-as para o estado selvagem. Para aumentar a sensibilidade do teste de Ames, Kado *et al.* (1983) desenvolveram uma metodologia baseada no aumento da quantidade de bactérias utilizadas no ensaio e na redução da quantidade de amostra utilizada.

O teste de Kado *et al.* (1983) utiliza as linhagens de *Salmonella typhimurium*, especialmente construídas para esse ensaio, que apresentam mutações pontuais específicas de vários tipos como transições, transversões e modificação do quadro de leitura, de modo que o evento mutacional de reversão permite estabelecer a frequência e o tipo de mutação ocorrido. A mutação leva à inativação de uma enzima da via biossintetizante da histidina (his) impedindo, portanto, seu crescimento em meio desprovido de tal aminoácido. Dessa forma, em meio mínimo, somente conseguirão crescer aquelas colônias que foram capazes

de reverter à mutação, passando, portanto, à condição selvagem, ou seja, sendo capaz de sintetizar a histidina (his^+).

Essas cepas também apresentam outras modificações genéticas que aumentam a sensibilidade do teste tais como a mutação no gene *rfa* que gera modificações na camada lipopolissacarídica da parede celular, aumentando a permeabilidade bacteriana a entrada de compostos e a mutação *uvrB* que torna as bactérias incapazes de reparar lesões no DNA por excisão de nucleotídeos. A deleção no gene *uvrB* estende-se até o gene da biotina, de modo que essas linhagens também são auxotróficas para esta vitamina (MARON & AMES, 1983). As linhagens mais utilizadas para avaliação de compostos mutagênicos são TA 97a e TA 98, que detectam deslocamento do quadro de leitura do DNA, e TA 100 que detecta substituição de pares de base no DNA (CETESB, 1991).

O teste de Kado também pode ser realizado com uma preparação de fígado de ratos pré-tratados com Aroclor 1254, a fração microssomal S9 (MARON & AMES, 1983). S9 induz a síntese de enzimas microssomais, simulando, assim, a metabolização hepática em um sistema *in vitro*, visando à detecção de substâncias pró-mutagênicas ou de metabólitos com essa potencialidade.

O teste *in vitro* com DNA plasmidial detecta agentes capazes de quebrar ligações fosfodiéster do DNA (CARVALHO *et al.*, 2003), através da análise da conformação plasmidial. Em virtude de se poder efetuar transformação bacteriana com o DNA plasmidial tratado, é também possível analisar se outras lesões que não quebras estão sendo geradas bem como obter informações a respeito da letalidade dessas lesões geradas no plasmídeo após tratamento com o agente mutagênico.

A eletrofose em gel de agarose é uma forma simples e rápida para se visualizar e separar fragmentos de DNA, valendo-se do fato dessa molécula apresentar carga negativa.

Para se avaliar as possíveis quebras no DNA, usa-se como parâmetro a forma e o tamanho do DNA plasmidial. O plasmídeo íntegro se apresenta sob a forma superenovelada (forma I), a qual migra rapidamente, colocando-se em uma posição mais distal em relação ao ponto de aplicação do DNA plasmidial no gel. Se o plasmídeo sofrer quebras em uma das fitas do seu DNA, ele assume a forma circular-relaxada (forma II), a qual, por expor uma maior superfície de contato, migra mais lentamente e se coloca em uma posição mais proximal em relação ao ponto de aplicação do DNA. Dessa forma, um aumento da forma II e correspondentes reduções da forma I indicam quebra na cadeia fosfodiéster. Em casos extremos, onde são geradas duas quebras na ligação fosfodiéster uma em cada fita de DNA, o plasmídeo assume a forma linear (forma III) que apesar de expor uma maior superfície de contato, é favorecida por sua conformação e migra mais rápido que a forma II, colocando-se em uma posição intermediária entre as formas I e II no gel de agarose. Com base nesses dados o perfil eletroforético no gel identifica os diferentes tipos de quebras que ocorreram na cadeia do DNA plasmidial.

A conversão de um genótipo em outro pela introdução de DNA exógeno é chamada de transformação. O DNA exógeno é incorporado ao cromossomo bacteriano por um processo de quebra e inserção (GRIFFITHS *et al.*, 2000). A maioria das espécies de bactérias, inclusive a *Escherichia coli*, incorpora apenas quantidades limitadas de DNA sob circunstâncias normais. Para transformar tais espécies eficientemente, as bactérias devem passar por alguma forma de tratamento físico e/ou químico que aumente as suas capacidades de captação de DNA. Células submetidas a esse tratamento são ditas competentes (BROWN, 2003).

Para a transformação bacteriana foi utilizada a linhagem bacteriana DH10B. Essa linhagem só

pode ser transformada por eletroporação e não por choque térmico (CALVIN & HANWALT, 1988; DOWER *et al.*, 1988). O vetor pBC foi derivado do pBluescript® II phagemid, sendo o gene que confere resistência a ampicilina trocado por um gene de resistência a cloranfenicol. Elas contêm também o gene lacZΔM15 que codifica parte da enzima β-galactosidase. Genes que não possuem inserto, não vão crescer como colônias azuis na linhagem de bactéria apropriada que contenha o gene lacZΔM15 como a *E. coli* DH10B. Caso não tenha inserto, a mesma linhagem irá crescer como colônias brancas, porque o inserto rompe a região que codifica o fragmento do gene LacZ (INVITROGEN,2003). Essa enzima é uma das várias enzimas envolvidas na quebra de lactose em glicose mais galactose. A clonagem com pBC envolve a seleção de transformantes em agar com cloranfenicol, seguida pela identificação de recombinantes com base na atividade de β-galactosidase.

A identificação da presença ou da ausência da β-galactosidase é realizada em um ensaio um pouco diferente, também catalisada pela enzima. Essa reação envolve um análogo da lactose, chamado de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β-D-galactopiranosídeo), o qual é degradado pela β-galactosidase em um produto que tem coloração azul-escuro. Se X-gal (mais um indutor da enzima, como o isopropiltiogalactosídeo, IPTG) for adicionado ao ágar juntamente com cloranfenicol, as colônias não-recombinantes, formada por células que sintetizam β-galactosidase, terão cor azul, enquanto as recombinantes, com o gene lacZ interrompido e incapazes de produzir β-

galactosidase, serão brancas. Esse sistema, chamado de seleção lac. Os genes bacteriano e plasmidial complementam-se um ao outro para produzirem uma molécula de β -galactosidase funcional. Os recombinantes são selecionados a partir do plaqueamento em agar contendo X-gal e IPTG (BROWN, 2003).

Outro ensaio biológico utiliza a cebola *Allium cepa*. As células mitóticas meristemáticas de raízes de plantas são células indicadoras apropriadas para a detecção de clastogenicidade dos poluentes ambientais, especialmente para o monitoramento dos contaminantes da água e do solo (MA *et al.*, 1995; RANK & NIELSON, 1997). Muitos pontos podem ser monitorados nessas células em rápida divisão, como aberrações cromossômicas, troca de cromátides irmãs e micronúcleo. A formação de micronúcleos é o mais freqüentemente usado, o mais efetivo e o mais simples indicador de dano ao DNA (MIGID *et al.*, 2007). Em geral, a introdução de micronúcleo em meristemas de raízes é a manifestação de quebra cromossômica ou distúrbio no processo mitótico devido a anormalidades no fuso (GROVER & KAUR, 1999). Células que portam micronúcleo são observadas em diferentes estágios do ciclo celular, embora a maioria dos micronúcleos seja encontrada em células em interfase ou prófase. Em geral o micronúcleo observado é sincrônico com a divisão do núcleo principal, mas em alguns casos esse sincronismo não está presente (FERNANDES *et al.*, 2007).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Purificar a lectina solúvel em água da semente de *Moringa oleifera* (WSMoL) e avaliar a genotoxicidade na água tratada com as sementes e da lectina isolada.

2.2 Objetivos específicos

- ↳ Purificar WSMoL através de métodos cromatográficos;
- ↳ Caracterizar bioquimicamente a lectina isolada;
- ↳ Determinar a propriedade coagulante de WSMoL
- ↳ Avaliar a genotoxicidade da WSMoL e da água tratada com *M. oleifera*, utilizando o teste de Kado, *in vitro* com DNA plasmidial, transformação bacteriana e *Allium cepa*.

3. REFERÊNCIAS

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

AMES, B. N.; McCANN, J.; YAMASAKI, E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with *Salmonella*/mammalian microsome mutagenesis test. **Mut. Res**, n. 31, 347-364, 1973.

ANDRADE, C. A. S.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B.; NASCIMENTO, S. C.; MAGALHÃES, N. S. S. Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 278, p. 435-445, 2004.

AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION (AWWA) Water quality and treatment; a handbook of community water supplies, **McGraw Hill Publishing Company**, 4th edition, New York, 1990

BASZKIN, A. BOISSONNADE, M., SANTOS-MAGALHAES, N. S., CARVALHO JR., L. B., CORREIA, M. T. S., COELHO, L. C. B. B. *Cratylia mollis* lectin at the air-aqueous solution interface: adsorption and lectin-lipid interactions. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 17 191-201, 2000.

BELTRÃO, E. I. C., MEDEIROS, P. L., RODRIGUES, O. G., FIGUEIREDO-SILVA, J., VALENÇA, M. M., COELHO, L. C. B. B., CARVALHO JR, L. B. *Parkia pendula* lectin as histochemistry marker for meningothelial tumor. **European Journal of Histochemistry**, v.47, p. 139-142, 2003.

BEZERRA, A. M. E.; MOMENTE, V. G.; FILHO, S. M. Germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas de moringa (*Moringa oleifera* Lam.) em função do peso da semente e do tipo de substrato. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.22, n.2, p.295-299, abril-junho 2004.

BROWN, T. A. Clonagem gênica e análise de DNA: uma introdução. 4^a ed. **Artmed**. 240p.

CACERES, A., CABRERA, O.; MORALES, O.; MOLLINEDO, P.; MENDIA, P. Pharmacological properties of *Moringa oleifera*. 1: Preliminary screening for antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 33, n.3, p.213-216, 1991.

CALVIN, N. M. and HANWALT, P. C. **J. Bacteriol.** 170, 2796, 1988.

CARVALHO, M. C. R. D.; BARCA, F. N. T. V.; AGNEZ-LIMA, L. F.; AND MEDEIROS, S. R.B. Evaluation of mutagenic activity in na extract of pepper tree stem bark (*Schinus terebinthifolius* Raddi). **Environmental and Molecular Mutagenegis**, v.42, 185-191, 2003.

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Teste de Kado- método do ensaio. Norma CETESB L5 241, São Paulo, 1991.

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***, 11, p. 295-300, 2000.

CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B. Purification of a Glucose/ Mannose Specific Lectin, Isoform 1, from Seeds of *Cratylia mollis* Mart. (Caramatu Bean). ***Applied Biochemistry and Biotechnology***, v. 55, p. 261-273, 1995.

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

DELDUQUE, M (2000) Moringa. ***GloboRural***, fascículo maio 2000, p. 89-91, 2000.

DOWER, W. J. *et al.* ***Nucl. Acids Research***, 16, 6127, 1988.

DRICKAMER, K. Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. ***J. Biol. Chem.*** 263, 9557-9560, 1988.

EGITO, L. C. M.; MEDEIROS, S. R. B.; MEDEIROS, M. G.; PRICE, J. C.; EGITO, S. T. Evaluation of the relationship of the molecular aggregation state of amphotericin B in medium to its genotoxic potencial. ***Journal of Pharmaceutical Sciences***, v. 93, n. 6, p. 1557-1565, 2004.

FENG, K et al. Isolation and characterization of a novel lectin from the mushroom *Armillaria luteo-virens*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 345, p. 1573-1578, 2006.

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C. AND MORALES, M. A. M. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. Pesticid Biochemistry and Physiology, doi:10.1016/j.pestbp.2006.12.003, article in press, 2007.

FRIEDBERG, E. C.; WALKER, G. C.; SIEDE, W. DNA repair and mutagenesis. **Washington: ASM Press**, v.1, p. 407-437, 1995.

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

GAZDA, V. E.; CARNEIRO, M. R. G.; BARBI, N. S.; PAUMGARTEN, F. J. R. Toxicological evaluation of ethanolic extract from *Chiocacca alba* roots. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 105, p.187-195, 2006.

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

GRIFFITHS, A. J. F.; MILLER, J. H.; SUZUKI, D. T.; LEWONTIN, R. C.; GELBART, W. M. Introdução à Genética, *Guanabara koogan*, 7^a ed., Rio de Janeiro, 2000

GROVER, I. S. & KAUR, S. Genotoxicity of wastewater samples from sewage and industrial effluent detected by the *Allium* root anaphase aberration and micronucleus assays. **Mutat. Res.** n. 426, p. 183-188, 1999.

INVITROGEN. Discover a start-studded cast of competent cells: for all your transformation – Catalogue of techniques. USA, 2003.

JANH, S. A. Proper use of African coagulants for rural water supply: Research in the Sudan and a guide for new projects. *Deutsche Gesellschaft für technische Zusammenarbeit* (German society for technical co-operation) (GTZ), Manual 191, Eschborn, 1986.

JANH, S. A. Chemotaxonomy of flocculating plant materials and their application for rural water purification in developing countries. *Acta Univ. Ups. Symb. Bot. Ups* XXVIII 3, 171-185, 1988a.

JANH, S. A. Using *Moringa oleifera* seeds as coagulants in developing countries. **J. Am. Wat. Wks. Ass.** 90, 43-50, 1988b.

KADO, N. Y.; LANGLEY, D.; EISENSTADT, E. A simple modification of the Salmonella liquid incubation assay. **Mut. Res.** n. 121, p. 25-32, 1983.

KENNEDY, J. F., PAIVA, P. M. G., CORREA, M.T.S., CAVALCANTI, M. S. M., COELHO, L.C.B.B. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydrate Polymers**, Great Yarmouth, v.26, n.3, p.219-230, 1995.

LIMA, V. L. M.; CORREIA, M. T. S.; CHACHINEL, Y. M. N.; SAMPAIO, C. A. M.; OWEN, J. S.; COELHO, L. C. B. B. Immobilized *Cratylia mollis* lectin as a potential matrix to isolate plasma glycoproteins, including lecithin-cholesterol acyltransferase. **Carbohydrate Polymers**, v. 33, p. 27-32, 1997.

LIS, H. & SHARON, N. Lectins: carbohydrate specific proteins that mediate cellular recognition. **Chem. Revs.** 98, 637-674, 1998.

MA, T. H.; XU, Z.; XU, C.; MCCONNELL, H.; RABAGO, E. V.; ARREOLA, G. A. ZHANG, H. The improved Allium/Vicia root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutat. Res.** n. 334, p. 185-195, 1995.

MACEDO, M. L. R.; FREIRE, M. G. M.; SILVA, M. B. R.; COELHO, L. C. B. B. (2006) Insecticidal activity of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotes subfasciatus* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part A, p. 13-25, 2006.

MACIEL, E. V. M.; FILHO, V.S.A.; NAKAZAWA, M.; GOMES, Y. M.; COELHO, L. C. B. B.; CORREIA, M. T. S.; (2003) Mitogenic activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes. **Biologicals**, v. 32, p. 57-60, 2004.

MARON, D. M.; AMES, B. N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. **Mut. Res**, n. 113, p. 173-215, 1983.

MAZUMDAR, S; SENGUPTA, S. K.; PARAM, R.; SINHA, S. N. Binding pattern of eight different lectins in healthy subjects and patients with dysplastic and malignant lesions of the oral cavity. **Int J Oral Maxillofac Surg**. v. 22, n. 5, 301-305, 1993.

METHA, L. K.; BALARAMAN, R.; AMIN, A. H.; BAFNA, P. A.; GULATI, O. D. (2003) Effects Of fruits of *Moringa Oleifera* on the lipid profile of normal and hypercholesterolaemic rabbits. **Journal or Etno-Pharmacology**, v.86, p.191-195, 2003.

MIGID, H. M. A.; AZAB, Y, A.; IBRAHIM, W. M. Use of plant genotoxicity bioassay for the evaluation of efficiency of algal biofilters in bioremediation of toxic industrial effluent. **Ecotoxicology and Enviromental Safety**, n. 66, p. 5764, 2007.

MOURA, R. M.; QUEIROZ, A. F. S.; FOOK, J. M. S. L. L.; DIAS, A. S. F., MONTEIRO, N. K. V.; RIBEIRO, J. K. C.; MOURA, G. E. D. D.; MACEDO, L. L. P.; SANTOS, E. A. AND SALES, M. P. CvL, a lectin from the marine sponge *Clione varians*: Isolation, characterization and its effects on pathogenic bacteria and Leishmania promastigotes. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part A, doi: 10.1016/j.cbpa.2006.08.028. *in press*, 2006.

MUYIBI, S. A. & EVISION, L. M.; Optimizing physical parameters affecting coagulation of turbid water with *Moringa oleifera* seeds, **Water Ressearch**, vol. 29, n. 12, p. 2689-2695, 1995.

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

NDABIGENGESERE, A., NARASIAH, K. S., TALBOT, B. G. Active agents and mechanism of coagulation of turbid waters using *Moringa oleifera*. **Water Research** 29, n°2, 703-710, 1995.

NGAI, P. H. K. & NG, T. B. A mushroom (*Ganoderma capense*) lectin with spectacular thermostability, potent mitogenic activity on splenocytes, and antiproliferative activity toward tumor cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, n. 314, p. 988-993, 2004.

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

OKUDA, T.; BAES, A. U.; NISHIJIMA, W. AND OKADA, M. Coagulation mechanism of salt solution-extracted active component in *Moringa oleifera* seeds. **Water Research**, 35 (3), 830-834, 2001b.

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

PEUMANS, W.J., VAN DAMME, E.J.M. Prevalence, biological activity and genetic manipulation of lectins in foods. ***Trends Food Science Technology***, Cambridge, v.7, n.4, p.132-138, 1996.

POLLARD, S. J. T.; THOMPSON, F. E. AND McCONNACHE, G. L. Microporous carbons from *Moringa Oleifera* husks for water purification in less developed countries. ***Water Research***, v.29, n.1, p. 337-347, 1995.

QUIOCHO, F. A. (1986) A. ***Rev. Biochem.*** 55, 287-315.

RANK, J; NIELSEN, M. H. *Allium cepa* anaphase-telophase root tip chromosome aberration assay on N-methyl-N-nitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide, and ethyl methanesulfonate. ***Mutation Research***, n. 390, p. 121-127, 1997.

RANK, J. The method of *Allium* anaphase-telophase chromosome aberration assay. ***Ekologija***, n. 1, 2003.

SANTOS, F.V; COLUS, I. M. S.; SILVA, M. A.; VILEGAS, W.; VARANDA, E. A. Assessment of DNA damage by extracts and fractions of *Strychnos pseudoquina*, a Brazilian medicinal plant with antiulcerogenic activity. ***Food and Chemical Toxicology***, n. 44, p. 1585-1589, 2006.

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

SANTOS, A.C.O., PEIXOTO, C.A., COELHO, L.C.B.B. Ultrastructural analysis and imunocytochemical localization of isolectins in *Cratylia mollis* seeds. **Micron**. v.35, p. 613-618, 2004.

SHARON, N.; LIS, H. History of llectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glicobiology**, v.14, n. 11, p. 53R-62R, 2004.

SHARON, N. Memories of a Sênior Scientist – A life with lectins. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 62, p. 1057-1062, 2005.

SHARON, N. Lectin-carbohydrate complexes of plants and animals: an atomic view. **Trends in Biochemical Science**, v.18, n. 6, p. 221-226,1993.

SHARON, N. and LIS, H. 'Legum Lectins – A large family of homologous proteins' in **FASEB J.** 4,3198-3208, 1990.

SILVA, A. R.; KERR, W. E. (1999) *Moringa: uma nova hortaliça para o Brasil*. Uberlândia: UFU/DIRIU, p 95.

SINGH, R. S., TIWARY, A. K., KENNEDY, J. F. (1999) Lectins: Sources, Activities and Applications. ***Critical Reviews in Biotechnology***, v. 19, n. 2, p.145-178, 1999.

SUTHERLAND, J. P.; FOLKARD, G.K.; MTAWALI, M. A.; GRANT, W. D. (1994) Moringa oleifera as a natural coagulant. ***Affordable water supply and sanitation***, 20th WEDC Conference, Colombo, Sri Lanka, p. 297-299, 1994.

THERMAN, E. E. & SUSMAN, M. Cromosomas humanos: estructura, comportamiento y efectos. 3^a ed. Ribeirão Preto: SBG, p. 335-337, ***Cromossomos***, 1996.

TSAKNIS, J., LALAS, S., GERGIS, V., DOURTOGLOU, V., SPILIOTIS, V. Characterization of *Moringa oleifera* variety Mbololo seed oil of Kenya. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry*** 47, 4495– 4499, 1999.

VARANDA, E. A.; POZETTI, G. L.; LOURENÇO, M. V.; VILEGAS, W.; RADDI, M. S. G. Genotoxicity of *Brosimum gaudichaudii* measured by the *Salmonella*/microsome assay and chromosomal aberrations in CHO cells. ***Journal of Ethnopharmacology***, v. 81, p. 257-264, 2002.

VATTUONE, M. A., PRADO, F. E., SAYAGO, J. E. & SAMPIETERO, A. R. ***Phytochemistry***, 30, 419-422, 2001.

VILLASENOR, I. M.; LIM-SYLIANCO, C. Y.; DAYRIT, F. Mutagens from roasted seeds of *Moringa oleifera* seeds. **Mutation Research/ Genetic toxicology**, v. 224(2), p. 209-212, 1989.

THERMAN, E. E. & SUSMAN, M. Cromosomas humanos: estructura, comportamiento y efectos. 3^a ed. Ribeirão Preto: SBG, p. 335-337, **Cromossomos**, 1996.

4. Artigo a ser submetido ao periódico Water Research

***Moringa oleifera* seed lectin had coagulant property and was not a genotoxic agent, however extracts of seeds promoted micronucleus formation.**

L.A.D.M.M. Rolim¹, M.F.S. Macedo², H.A.A.A.C.N. Sisenando², A.F.S. Santos¹,
L.C.B.B. Coelho¹, S.R.B. de Medeiros², P.M. G. Paiva^{1*}

¹Departamento de Bioquímica, CCB/UFPE, Av. Prof. Moraes Rego, S/N, Cidade Universitária, Recife-PE, 50670-420, Brasil. ²Laboratório de Biologia Molecular e Genômica, CCB/UFRN, Natal-RN, Brasil.

* Corresponding author: Tel./fax: +5508121268540.
e-mail address: ppaiva63@yahoo.com.br (P.M.G. Paiva).

Abstract

This paper reports the isolation and characterization of *Moringa oleifera* seed lectin (WSMoL). Its effects on water turbidity as well as genotoxic/mutagenic potential of water treated with different concentrations of *M. oleifera* seeds (MoW1, MoW2, MoW3 and MoW4) or WSMoL were also discussed. WSMoL, agglutinated different erythrocytes, was mainly active at pH 4.5 to 7.5 and inhibited by azocasein. Gel filtration chromatography and electrophoretic profiles revealed WSMoL as 102 kDa protein constituted by 5 kDa subunits. Glycosylation was not detected. WSMoL had coagulant property similar to the most commonly used coagulant aluminum sulfate. MoW preparations and WSMoL were negative in a cell-free plasmid DNA test, bacterial transformation assay and in *Salmonella typhimurium* assay using TA97, TA98 and TA100 at presence or absence of hepatic metabolism. MoW1 and MoW2 were also negative by *Allium cepa* assay however micronucleus formation was induced by MoW3 and MoW4. The results suggest WSMoL is an active component in the water purification process by seeds. WSMoL was not a genotoxic agent but genotoxicity was detected in water treated with more concentration of seeds. This study is a positive step forward in determining the safe use of *M. oleifera* seeds for water treatment.

Key Words: *Moringa oleifera*, lectin, coagulant property, genotoxicity, mutagenicity.

1. Introduction

Moringa oleifera Lam belongs to the family Moringaceae. Seeds are widely used in developing countries as a natural coagulant for water treatment. It can reduce in 92-99% the turbidity (Muyubi and Evinson, 1995) and the microbial population (Ghebremichael *et al.*, 2005). The major disadvantage in the use of *M. oleifera* for water treatment is a significant increase of organic material (Ndabigengesere and Narasiah, 1998; Okuda *et al.*, 2001b). The use of pure or semi-pure form of active coagulant component has been suggested for reducing the total amount of organic material added to the treatment process (Ghebremichael *et al.*, 2005).

Studies have demonstrated coagulant activity of cationic proteins isolated from *M. oleifera* seeds and Ghebremichael *et al.* (2005) suggested the involvement of protein mixture in the process. Monomeric or dimeric protein structures with molecular mass of 6.5 to 13 kDa and isoelectric point in the range of 9.6 to 11 have been described (Gassenschmidt *et al.*, 1995; Ndabigengesere *et al.*, 1995; Ghebremichael *et al.*, 2005).

Santos *et al.* (2005) detected the presence of a water soluble *M. oleifera* lectin (WSMoL) in water obtained after soaking intact seeds. Lectins are hemagglutinating proteins possessing carbohydrate binding sites (Peumans and Van Damme, 1996). The availability of a great number of lectins with distinct carbohydrate specificity makes these proteins tools in medical and biological research (Kennedy *et al.*, 1995).

Genotoxic and mutagenic effects have been reported in vegetable extracts. The indiscriminate consumes of such products by people has stimulated studies

that to evaluate cytotoxic, genotoxic or mutagenic effects of plant compounds aiming to minimize the possible risks of these agents (Varanda et al., 2002). Damage to the users' genetic material could lead to mutagenesis and carcinogenesis as well as other toxic effects (Carvalho et al., 2003; Gazda et al., 2006; Santos et al., 2006).

This paper reports upon the results of WSMoL isolation and its coagulant property. Another objective of the present study was to evaluate the DNA damage potential of WSMoL and of water treated with *M. oleifera* seeds. This water is used as a source of drinking water around the world. Thus its quality for assessment of genotoxic and mutagenic agents is important since plant compounds can have adverse health effects on human including damage to DNA.

2. Materials and Methods

2.1. Protein evaluation

The protein concentration was estimated in all samples according to Lowry et al. (1951) using bovine serum albumin ($31\text{-}500\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$) as standard. Absorbance at 280 nm was also measured.

2.2. Hemagglutinating activity (HA)

Hemagglutinating activity (HA) was evaluated according to Correia and Coelho (1995) using glutaraldehyde-treated rabbit or human erythrocytes (types A, AB and O). The HA was obtained by mixing a twofold serial dilution of samples (50 μl) in 0.15 M NaCl followed by the addition of a 2.5% (v/v) suspension of

erythrocytes (50 μ l), in microtiter plates (Kartell S. P. A., Italy) and incubation (45 min). Titer was defined as the lowest sample concentration, which showed hemagglutination. Specific HA (SHA) was calculated from the ratio of titer to protein concentration (mg ml^{-1}).

A HA inhibitory assay was performed by incubation (45 min) of lectin sample with 200 mM carbohydrates (N-acetylglucosamine, D(+)-fructose, D(+)-galactose, D(+)-glucose and raffinose) or 0.5 mg ml^{-1} glycoprotein solutions (azocasein, fetuin and ovalbumin), before rabbit erythrocyte suspension addition. HA was also evaluated at different temperatures (30-100°C, 15 min) and pH values (10 mM citrate phosphate buffer containing 0.15 M NaCl, pH 4.5, 5.0, 6.0, 6.5 or 10 mM sodium phosphate buffer containing 0.15 M NaCl, pH 7.0, 7.5 or 10mM Tris-HCl containing 0.15 M NaCl, pH 8.0, 8.5, 9.0, 9.5).

2.3. *M. oleifera* water (MoW)

Mature seeds from *M. oleifera* were collected in Recife city, State of Pernambuco, Brazil Northeast. Taxonomic identification was performed and voucher specimens were deposited under number 73,345 (IPA – Instituto de Pesquisas Agropecuárias de Pernambuco).

M. oleifera water was obtained according to protocol for treatment of turbid water used by people (Gerdes, 1996) except the filtration steps. Macerated shelled seeds (2.0 g) were added to distilled water (100 ml) and manual agitation (5 min) was made. Following, this *M. oleifera* suspension was through on filter paper and sterile millipore filter (0.20 μ m). The filtered suspension was then added to milli-Q

water to obtain *M. oleifera* waters (MoW) of concentration (g l^{-1}) 0.0125 (MoW1), 0.05 (MoW2), 0.2 (MoW3) and 0.8 (MoW4). MoW3 corresponds to concentration consumed by people.

2.4. Purification of WSMoL

Mature seeds were milled to a fine powder. The meal (10 g) was then homogenised in a magnetic stirrer (16 h at 4°C) with distilled water (100 ml), filtered through gauze and centrifuged at 3,000 $\times g$ (15 min). The supernatant, crude extract (CE), was taken as starting material. The initial SHA of CE was considered as the initial activity of the isolation procedure. The proteins in the CE were precipitated using ammonium sulphate (saturation of 60%) at 4°C under magnetic agitation (Green and Hughes, 1955). The sediment separated by centrifugation (0-60 fraction) was dissolved in 0.15 M NaCl. The 0-60 (80 mg of proteins) was applied onto a chitin column (23 $\times$ 0.75 cm) equilibrated with 0.15 M NaCl (0.3 ml min⁻¹ flow rate). After extensive washing with the equilibrium solution, elution was performed with 1.0 M acetic acid. Spectrophotometry at 280 nm was used to follow protein elution. Fractions with lectin activity (WSMoL) were pooled, dialysed against 0.15 M NaCl (6 h at 4°C). Purification was measured as the ratio between the SHA in the stage and SHA of CE. Yield was measured by the ratio of HA values.

2.5. Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)

SDS-PAGE was performed on 10% (w/v) gel according to the method described by Laemmli (1970) with or without β -mercaptoethanol. Peptide of WSMoL (100 μ g of protein) and solution of molecular mass standard constituted by four peptides with 6.5, 12.5, 21 and 29 kDa fragments (Q-BIOgene, USA) were stained with Coomassie Brilliant Blue. Glycoprotein staining was also performed with Schiff's reagent (Pharmacia Fine Chemicals, 1980). PAGE for native basic [7.5% (w/v) gel] and acidic [7.5% (w/v) gel] proteins was carried out according to the protocols of Reisfeld *et al.* (1962) and Davis (1964), respectively.

2.6. Gel filtration chromatography

WSMoL was chromatographed by gel filtration on a Hiprep 16/60 Sephacryl S-300 column (16 mm x 60 cm)/Äkta FPLC system (Amersham Pharmacia Biotech, Sweden) pre-equilibrated at 24 °C with 500 mM NaCl. Samples (2.0 ml containing 4 mg of protein) were injected and eluted (3.0 ml fraction) with 500 mM NaCl at a flow rate of 0.5 ml/min. Bovine serum albumin (66 kDa), fetuin (64 kDa), ovalbumin (45 kDa) and the trypsin inhibitor type III-O chicken (28 kDa) standards were similarly chromatographed.

2.7. Coagulation assay

Coagulation assay was performed according Ghebremichael *et al.* (2005). Initially, synthetic turbid water was prepared. Distilled water (1 L) was treated with kaolin clay (10 g), stirred for 30 min and allowed to settle for 24 h to achieve

complete hydration. Desired turbidity was obtained by dilution. Aliquot (0.3 ml) of WSMoL (1 mg ml⁻¹) or positive control (5% aluminium sulphate) was added to clay suspension (2.7 ml, 250-300 NTU, Nephelometric Turbidity Units). Samples were allowed to settle for 1 h at 27 °C. In order to reduce background effect, a sample volume of 900 µl from the top was transferred to the cuvette and absorbance measured at 500 nm using a UV-Visible spectrophotometer FEMTO 700 S corresponded to initial absorbance (time 0). Then, absorbance was determined every 5 min up to 60 min and to each 10 min up to 140 min. Reduction in absorbance relative to control defines coagulation activity. The assays were performed three times.

2.8. Kado test

Mutagenicity was measured according Kado *et al.* (1983) without and with addition of an extrinsic metabolic activation system, S9 mixture (Aroclor-induced rat liver S9 from Moltox), using *Salmonella typhimurium* TA97, TA98 and TA100. Aliquots (5 µl) of MoW1, MoW2, MoW3, MoW4 or WSMoL (0.0125, 0.05, 0.2 and 0.8 mg ml⁻¹) were analyzed. Before Kado test, cytotoxicity screening was performed with the TA98 strain using the same sample concentrations. The positive controls used in the assays performed without metabolic activation were: 4-nitroquinoline-*N*-oxide (0.5 µg per plate) for TA97 and TA98 and sodium azide (5 µg per plate) for TA 100. In the assays with metabolic activation, the positive control was 2-aminoanthracene (5 µg per plate) for all strains.

The bacteria/sample/top agar mixture was poured onto a Petri dish containing minimal agar (1.5% agar, Vogel-Bonner E medium, with 2% glucose). His⁺ revertants were counted after 66 h of incubation at 37° C. The test substance was considered mutagenic if the number of revertants was at least double spontaneous frequency. The assay was repeated three times.

2.9. Plasmid DNA test

Genotoxicity was evaluated by plasmid DNA assay. The pBC plasmid with cloranphenicol-resistance gen was used in the test. Plasmid (1 µg) was incubated (1 h at 37°C) with aliquots (20 µl) of MoW1, MoW2, MoW 3, MoW4 or WSMoL (0.0125, 0.05, 0.2 and 0.8 mg/ml). The assays included a negative control (supercoiled or form I plasmid) and a positive control (plasmid incubated with hydrogen peroxide by 30 min at 37°C following 30 min at 60°C). The treated plasmids were submitted to electrophoresis on 0.7% (w/v) agarose in 1x TBE buffer (90 mM Tris, 90 mM boric acid, 2 mM EDTA buffer, pH 7.0) and analyzed at UV light.

2.10. Bacterial transformation test

Competent bacteria *Escherichia coli* DH10B (F⁻ *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80/*lacZ* Δ .M15 Δ *lacX74 deoR recA1 endA1 ara Δ 139 Δ (*ara, leu*)7697 *galU galK* λ^- *rpL*(Str^R) *nupG tonA*) from Invitrogen (USA) were obtained according Sambrook *et al.* (1989). Plasmid pBC (2 µl) was incubated (1 h) with 48 µl of MoW1, MoW2, MoW3, MoW4 or WSMoL (0.0125, 0.05, 0.2 or 0.8 mg ml⁻¹) then 1 µl of each mixture (10 ng µl⁻¹) was mixed with DH10B (50 µl). Following,*

electroporation according to Gene Pulser electroprotocols (BIO-RAD) was performed to permit the insertion of plasmid DNA pretreated with *M. oleifera* samples in the bacteria. All of these procedures were carried out on ice. After *E. coli* electroporated was added to Lennox Broth (LB) medium and putted in shacker (200 rpm) for 1 h at 37°C. Then, aliquots were plated onto LB-agar containing 0.1% of cloranphenicol and 0.08% of X-Gal. Plates were incubated overnight at 37°C. A mean value of number of colony-forming units (CFUs) from each *M. oleifera* sample employed was obtained, and the transformation efficiency was expressed as the percentage of the maximal value (100%), attributed to the negative control. Value lowest that 50% to indicate cytotoxicity. The colonies were also observed in relation to its coloration for mutagenicity detection. Blue and white colors identify non-mutagenic and mutagenic effect, respectively. Negative (distilled and autoclaved water) and positive (1 µl of Bam HI endonuclease restriction enzyme, 5 µl of buffer for Bam HI and 40 µl distilled and autoclaved water) controls were used. This experiment was carried out in triplicate and the results presented are the mean average.

2.11. *Allium cepa* test

Allium cepa test was carried out according Rank (2003). *Allium cepa* onions bulbs were purchased from the local market in Natal city, Brazil. The yellow shallows and the dry parts inside the root primordial were removed before the test. Roots were initially exposed to distilled water (24 h at 27°C) following to MoW preparations (48 h at 27°C). The roots were then submitted to acid hydrolysis (1N

HCl at 60°C for 10 min) and incubated with Schiff's reactive (30 min at dark). Root tips were cut onto a slide for extraction of meristematic region. The negative control was performed only in distilled water. 5,000 cells were counted per treatment to observe the presence or not of micronucleus. Results were expressed as number of micronuclei per 1,000 cells.

2.12. Statistical analysis

The computer package GraphPad InStat, version 3.0 was used for statistical analysis. For Kado test, analysis of variance (ANOVA) and Dunnett test were utilized. For bacterial transformation and *Allium cepa* tests values were evaluated by analysis of variance (ANOVA) and Tukey test.

3. Results and discussion

The coagulant property of *M. oleifera* seeds has been indicated as an alternative process for water purification in Brazilian rural regions. The excellent seed availability, facility of methodology recommended and quality of water obtained have contributed for its acceptance by people. Additional advantage for *Moringa* use is the antimicrobial activity detected in seeds (Cáceres *et al.*, 1991).

Although *M. oleifera* seeds are efficient in water treatment, due to its usage has a major impact on the health of a large number of people it is important to characterize the seeds in relation to source of others bioactive compounds as well as their potential effect on DNA molecule. This paper to contribute for diagnosis of water treated with *M. oleifera*.

Santos *et al.* (2005) detected HA in extracts obtained by soaking of *M. oleifera* intact seeds and named WSMoL. This paper describes the protocol for lectin isolation. Water extract obtained using seeds powder presented SHA of 22 with rabbit erythrocytes. The extract proteins were then concentrated in the 0-60 ammonium sulphate fraction that was chromatographed on chitin column. WSMoL, adsorbed on matrix and eluted with acetic acid (Figure 1A), showed SHA of 2,985 corresponding to purification of 137 folds. Each chromatographic experiment yielded 3.4 mg of lectin.

The HA of WSMoL was inhibited by carbohydrates and glycoproteins and stable to pH and temperature (Table 1). Gel filtration chromatography profile showed unique peak of 102 kDa revealing the high native molecular mass of WSMoL. The high molecular mass led to low protein migration on 7.5% polyacrylamide gel for native acid protein. Protein band was not detected on PAGE for native basic protein. SDS-PAGE (Figure 1B) resolved WSMoL as a diffuse peptide band with molecular mass between 20 and 5 kDa. After treatment with reducing agent β -mercaptoethanol was detected a 5 kDa band. The peptides were not marked on gel by the glycoprotein staining procedure. Glycoproteins are identified by a magenta coloration (Moura *et al.*, 2006).

Comparison of results from gel filtration chromatography (native protein) with SDS-PAGE with and without disulfide bonds reducing agent indicates the molecular structure of WSMoL as multiple subunit aggregate maintained by non-covalent and covalent bonds. Thus, a possible structure of WSMoL may be a polypeptide constituted by arrangement of five 20 kDa peptides that were decomposed to four subunits of 5 kDa subunits. Oligomeric structure was similarly proposed for the lectin isolated from marine sponge *Cliona varians*, a 114 kDa protein constituted by 28 kDa subunits (Moura *et al.*, 2006). Generally, protein constituted by multiple subunits presents stability to pH and temperature variations (Chumkhunthod *et al.*, 2006) probably due to high number of forces that maintains the native structure.

Comparison of isolated WSMoL with HA before described (Santos *et al.*, 2005) reveals WSMoL similarly active with different erythrocytes and inhibited by carbohydrates and glycoproteins. However differences were

detected in relation to activity at pH 7 and after heating at 100 °C. Also, the developed purification approach resulted in most active lectin. The highest SHA detected by Santos *et al.* (2005) was 0.9. The purification process can have caused the differences searched since modification in protein activity has been described after chromatography procedures (Quiocho, 1986). Indeed, slight alterations in lectin structure may modify the protein activity (Ng *et al.*, 1996).

The coagulant property of *M. oleifera* seeds stimulated the evaluation of this activity in WSMoL. The clarification of synthetic turbid water was determined by measurement of absorbance at 500 nm during 140 min. Reducing of water absorbance was observed after WSMoL addition similar to promoted by coagulant aluminium sulphate (Figure 2). WSMoL was a fast-acting coagulant promoting decreasing of water turbidity after a few minutes. Kaolin water absorbance at absence of WSMoL and aluminium sulphate was maintained at the time investigated.

Studies have revealed the coagulant property of *M. oleifera* seeds is due to different compounds with this activity. Organic polyelectrolyte (Okuda *et al.*, 2001a) and proteins (Gassenschmidt *et al.*, 1995; Nadabengesere *et al.*, 1995; Ghebremichael *et al.*, 2005) were already identified. Coagulation mechanism of *M. oleifera* cationic proteins (isoelectric point at basic pH range) has been proposed to involve its interaction with particle negatively charged (Gassenschmidt *et al.*, 1995). However this mechanism was not suggested for 3 kDa polyelectrolyte. Adsorption and formation of insoluble matter was indicated due to its negative charge and low molecular weight (Okuda *et al.*, 2001b). WSMoL may contribute for

coagulant activity of seeds by charge interaction inducing the formation of interparticle bridging due to both its negative charge and high molecular mass.

To determine whether *M. oleifera* water (MoW) or WSMoL cause mutation the reverse mutagenesis test (Kado test) was made using *S. typhimurium*, strains TA97, TA98 and TA100 in the presence and absence of the S9 micrososome fraction (hepatic metabolization). Frameshift-type (TA97 and TA98) or for base pair substitution (TA100) mutagens were not detected. As shown in Table 2, the samples at different concentrations did not cause any increase in the number of his⁺ revertant colonies over double of the negative control values obtained for the 3 tester strains corresponding to mutagenic index < 2. The highest MoW or WSMoL concentration used in this work (0.8 g l⁻¹) is closely 4-fold higher than the dose used by people for water treatment (0.2 g l⁻¹). Even in this concentration negative results were obtained in the Kado test. The evaluation in a range of concentration was made because concentrated fractions of non-mutagenic plant presented mutagenic activity (Cardoso *et al.*, 2006). The Kado test has been used to evaluate water under the impact of genotoxic agents and enabled the detection of S9 activated frameshift mutagens (Cardozo *et al.*, 2006). Also, provided experimental evidence for the non-mutagenic (Marques *et al.*, 2003; Gazda *et al.*, 2006) or mutagenic (Santos *et al.*, 2006) effects of Brazilian medicinal plants.

The genotoxic potential of MoW or WSMoL was evaluated in a cell-free plasmid DNA test. The conformational changes in plasmid DNA treated with *M. oleifera* samples were analyzed through agarose gel electrophoresis. MoW1, 2 and 3 or WSMoL did not generate breaks in the phosphodiester bonds of DNA since changes in plasmid supercoiled form was not detected on gel (Figure 3A and 3B).

Plasmid treated with MoW4 did not migrate on gel (Figure 3A) probably due to its high molecular weight resulting of its complexion with MoW4 constituents. Interaction of plant compounds with DNA has been already described (Sengupta *et al.*, 2005; Giri *et al.*, 2006). Carvalho *et al.* (2003) using plasmid DNA test additionally to *S. typhimurium* DNA damage assay, detected interaction of compounds with DNA and suggested that the popular medicinal use of *Schinus terebinthifolius* extract as anti-inflammatory agent may present a health risk to humans.

Cytotoxicity of MoW samples and WSMoL was evaluated by bacterial transformation test (Figure 4). Bacterial survival percentages determined for MoW1, MoW2, MoW3 as well as WSMoL in all tested concentrations (0.0125, 0.05, 0.2 and 0.8 g l⁻¹) were higher than 50% indicating absence of cytotoxicity. MoW4 promoted the lowest bacterial survival percentage, 47% was detected. In this assay X-gal was used aiming to detect DNA alteration by colony coloration modification of blue for white. Only blue CFUs were observed indicating maintaining of bacteria ability to promote X-gal degradation. Thus mutagen agent was not detected in *M. oleifera* samples. The later results suggesting that the bacterial survival decrease in presence of MoW4 probably was not due to DNA damage. A hypothesis to explain the phenomenon may be increase in the membrane cell permeability induced by MoW4 constituents favoring the entry of molecules that leads to bacterial death similar to describe to *Aloe vera* extract (Paes-leme *et al.*, 2005). Indeed alteration of plasmid molecular weight was detected only after MoW4 treatment (Figure 3A).

Genotoxicity was evaluated by *A. cepa* test that detect alterations in the cells from meristematic regions of roots (Rank and Nielsen, 1997). MoW preparations and distilled water (negative control) were evaluated. It was observed that micronuclei were not detected with MoW1 and MoW2 induced micronucleus formation (0.6 ± 0.5) similar to negative control (0.6 ± 0.9). The number of micronucleus after MoW3 and MoW4 treatments was 2.4 ± 1.1 ($p < 0.05$) and 4.8 ± 1.3 ($p < 0.001$), respectively. Although, detection of micronuclei in negative control can be explained by spontaneous micronucleus formation (Fernandes *et al.*, 2007) in MoW2 this can be occurred or compounds present in MoW2 induced micronuclei formation. In fact, in most high concentrations of *M. oleifera* extracts significant increase of micronuclei was detected and additionally to this, a dose response effect was observed with Mow4 promoting more effect than MoW3.

It has been recommended to Brazilian rural people that according to grade of water turbidity the number of *M. oleifera* seeds used to promote effective coagulant effect can be increased. Mow3 and MoW4 promoted micronucleus formation in *A. cepa* test and since this plant assay has been considered as the most effective and the simplest indicator of DNA damage (Migid *et al.*, 2007) the number of seeds used for water treatment should be monitored.

4. Conclusions

The purpose of this study was the isolation of water soluble *M. oleifera* seed lectin (WSMoL), determination of its coagulant property and evaluation of potential genotoxic and mutagenic of water treated with *M. oleifera* seeds or WSMoL.

1. The results showed that seeds of *M. oleifera* were source of lectin. WSMoL is stable to pH and temperature, biochemical properties proper for its biotechnological utilization. The detected coagulant property of WSMoL suggests its involvement in the reduction of water turbidity. WSMoL was not genotoxic/mutagenic agent in the concentrations studied. This result is of interest due to its coagulant property. Antimicrobial activity of WSMoL is in development aiming to define its potential role in water treatment.

2. The mutagenicity/genotoxicity evaluations revealed that water obtained according to recommended for human consumption (MoW3) induced genotoxicity in the *in vivo* assay. The effect was highest in the more concentrated MoW4 and not detected in most diluted MoW1 and MoW2. In our opinion aiming to minimize risk for human health, treatment of turbid water with lesser seed concentration should be evaluated by its coagulant property. This study is a positive step forward in determining the safe use of *M. oleifera* seeds for water treatment.

Acknowledgements

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

References

Caceres, A., Cabrera, O.; Morales, O.; Mollinedo, P. and Mendia, P. (1991) Pharmacological properties of *Moringa oleifera*. 1: Preliminary screening for antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology* **33**(3), 213-216.

Cardoso, C. R. P.; Cólus, I. M. S.; Bernardi, C. C.; Sannomiya, M.; Vilegas, W. and Varanda, E. A. Mutagenic activity promoted by amentoflavone and methanolic extract of *Byrsonima crassa* Niedenzu. *Toxicology* **225**, 55-63.

Cardozo, T. R.; Rosa, D. P.; Feiden, I. R.; Rocha, J. A. V.; Oliveira, N. C. D. A.; Pereira, T. S.; Pastoriza, T. F.; Marques, D. M.; Lemos, C. T.; Terra, N. R. and Vargas, V. M. F. (2006) Genotoxicity and toxicity assessment in urban hydrographic basins. *Mutation Research* **603**, 83-96.

Carvalho, M. C. R. D.; Barca, F. N. T. V.; Agnez-Lima, L. F.; and Medeiros, S. R.B. (2003) Evaluation of mutagenic activity in na extract of pepper tree stem bark (*Schinus terebinthifolius* Raddi). *Environmental and Molecular Mutagenesis* **42**, 185-191.

Correia, M. T. S. and Coelho, L. C. B. B. (1995) Purification of a Glucose/ Mannose Specific Lectin, Isoform 1, from Seeds of *Cratylia mollis* Mart. (Caramatu Bean). *Applied Biochemistry and Biotechnology* **55**, 261-273.

Davis, B.J. (1964) Disc electrophoresis II: methods and application to human serum proteins. *Annals of the New York Academy of sciences* **121**, 404-427.

Fernandes, T. C. C.; Mazzeo, D. E. C. and Morales, M. A. M. (2007) Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. *Pesticid Biochemistry and Phisiology*, doi:10.1016/j.pestbp.2006.12.003, article in press.

Gassenschmidt, U.; Jany, K.D.; Tauscher, B. and Niebergall, H. (1995) Isolation and characterization of a flocculating protein from *Moringa oleifera* Lam. *Biochemistry Biophysical Acta* **1243**, 477-481.

Gazda, V. E.; Carneiro, M. R. G.; Barbi, N. S. and Paumgarten, F. J. R. (2006) Toxicological evaluation of ethanolic extract from *Chiocacca alba* roots. *Journal of Ethnopharmacology* **105**, 187-195.

Gerdes, G. (1997) *Como limpar e tratar água suja com sementes da moringa*. ESPLAR - Centro de Pesquisa e Assessoria, Fortaleza, **18** (Boletim Técnico).

Ghebremichael, K. A.; Gunaratna, K. R.; Henriksson H.; Brumer, H. and Dalhammar, G. (2005) A simple purification and activity assay of the coagulant protein from *Moringa oleifera* seed. *Water Research* **39**, 2338-2344.

Giri, P.; Hossain, M. and Kumar, G. S. (2006) Molecular Aspects on the specific interaction of cytotoxic plant alkaloid palmatine to poly(A). *International Journal of Biological Macromolecules* **39**, 210-231.

Green, A. A. and Hughes, W. L. (1955) Protein fraction on the basis of solubility in aqueous of salts and organic solvents. In Colowick, S. and Kaplan, N.- *Methods in Enzymology*. New York, Academic Press, 67-90.

Kado, N. Y.; Langley, D. and Eisenstadt, E. (1983) A simple modification of the Salmonella liquid incubation assay. *Mut. Res* **121**, 25-32.

Kennedy, J. F.; Paiva, P. M. G.; Correia, M.T.S.; Cavalcanti, M. S. M. and coelho, L.C.B.B. (1995) Lectins, versatile proteins of recognition: a review. *Carbohydrate Polymers*, Great Yarmouth, **26**(3), 219-230.

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Lowry, O. H.; Rousebrought, N. J. Farr, A. L. and Randal, R. J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* **193**, 265-275.

Moura, R. M.; Queiroz, A. F. S.; Fook, J. M. S. L. L.; Dias, A. S. F., Monteiro, N. K. V.; Ribeiro, J. K. C.; Moura, G. E. D. D.; Macedo, L. L. P.; Santos, E. A. and Sales, M. P. (2006) CvL, a lectin from the marine sponge *Clione varians*: Isolation,

characterization and its effects on pathogenic bacteria and *Leishmania* promastigotes. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, doi: 10.1016/j.cbpa.2006.08.028.

Muyibi, S. A. and Evinson, L. M. (1995) Optimizing physical parameters affecting coagulation of turbid water with *Moringa oleifera* seeds. *Water Research* **29**(12), 2689-2695.

Ndabigengesere, A. and Narasiah, K. S. (1998) Quality of water treated by coagulation using *Moringa oleifera* seeds. *Water Research* **32**, 781-791.

Ndabigengesere, A.; Narasiah, K. S. and Talbot, B. G. (1995) Active agents and mechanism of coagulation of turbid waters using *Moringa oleifera*. *Water Research* **29**(2), 703-710.

Ng, K. K. S.; Drickamer, K. and Weis, W. I. (1996) Structural analysis of monosaccharide recognition by rat liver mannose-binding protein. *J. Biol. Chem.* **271**, 663-674.

Okuda, T.; Baes, A. U.; Nishijima, W. and Okada, M. (2001b) Coagulation mechanism of salt solution-extracted active component in *Moringa oleifera* seeds. *Water Research*, **35** (3), 830-834.

Okuda, T.; Baes, A. U.; Nishijima, W.; Okada, M. (2001a) Isolation and characterization of coagulant extracted from *Moringa oleifera* seed by salt solution. *Water Research* **35**,. 405-410.

Paes-Leme, A. A.; Mota, E. S.; Mattos, J. C. P.; Dantas, F. J. S.; Bezerra, R. J. A. C. and Caldeira-de-Araujo, A. (2005) Assessment of *Aloe vera* (L.) genotoxic potencial of *Escherichia coli* and plasmid DNA. *Journal of Ethnopharmacology* **102**, 197-201.

Peumans, W.J., Van Damme, E.J.M.(1996) Prevalence, biological activity and genetic manipulation of lectins in foods. *Trends Food Science Technology*. Cambridge **7** (4), 132-138.

Pharmacia Fine Chemicals (1980) Polyacrylamide Electrophoresis; Laboratory Techniques. Pharmacia, Uppsala.

Quiocho, F. A. (1986) *A. Rev. Biochem.* **55**, 287-315.

Rank, J. (2003) The method of *Allium* anaphase-telophase chromosome aberration assay. *Ekologija*, **1**.

Rank, J. and Nielsen, M. H. (1997) *Allium cepa* anaphase-telophase root tip chromosome aberration assay on N-methyl-N-nitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide, and ethyl methanesulfonate. *Mutation Research* **390**, 121-127.

Reisfeld, R. A.; Lewis, U. J. and Williams, D. E. (1962) Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrilamide gels. *Nature* **195**, 281-283.

Sambrook, J.; Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning – a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press **1**, 2nd edition.

Santos, A. F. S.; Argolo, A. C. C.; Coelho, L. C. B. B. and Paiva, P. M. G. (2005) Detection of water soluble lectin and antioxidant component from *Moringa oleifera* seeds. *Water Research* **39**, 975-980.

Santos, F.V; Colus, I. M. S.; Silva, M. A.; Vilegas, W. and Varanda, E. A. (2006) Assessment of DNA damage by extracts and fractions of *Strychnos pseudoquina*, a Brazilian medicinal plant with antiulcerogenic activity. *Food and Chemical Toxicology* **44**, 1585-1589.

Sengupta, B.; Banerjee, A. and Sengupta, P. K. (2005) Interactions of plant flavonoid fisetin with macromolecular targets: Insights from fluorescence spectroscopic studies. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **80** (2), 79-86.

Varanda, E. A.; Pozetti, G. L.; Lourenço, M. V.; Vilegas, W.; Raddi, M. S. G. (2002) Genotoxicity of *Brosimum gaudichaudii* measured by the *Salmonella*/microsome assay and chromosomal aberrations in CHO cells. *Journal of Ethnopharmacology* **81**, 257-264.

Table 1.Characterization of WSMoL

Characteristic	Determination
SHA	Rabbit (2,985) Human types: A (746), AB and O (1,492)
SHA at inhibitors presence*	Carbohydrates (200 mM): galactose (1,492), glucose (0), fructose and N-acetylglucosamine (746), raffinose (0) Glycoproteins (0.5 mg ml ⁻¹): azocasein (12), ovalbumin (82), fetuin (2,985)
SHA at pH values*	4.5 (5,971), 5.0 and 6.0 (373), 6.5 to 7.5 (1,492), 8.0 to 9.5 (186)
SHA at temperature values*	30 to 80 °C (1,492), 90 and 100 °C (93)
Native molecular mass	102 kDa
Subunit molecular mass	20 kDa (SDS), 5 kDa (SDS + β mercaptoethanol)
Glycosylation	No detected

Specific hemagglutinating activity (SHA) was calculated from the ratio of titer to protein concentration (mg ml⁻¹). * HA assay using rabbit erythrocytes.

Table 2. Mutagenic activity expressed as the mean and standard deviation of the number of revertants/plate in bacterial strains TA97, TA98 and TA100 exposed to MoW and WSMoL at various concentrations, with (+S9) or without (-S9) metabolic activation.

MoW	TA 97		TA 98		TA 100	
(µg/plate)	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
NC	407 ±34 (1.0)	204±06 (1,0)	65±07 (1.0)	37±04 (1.0)	33±09 (1.0)	23±04 (1.0)
MoW1	294±29 (0.72)	232±11 (1.13)	53±02 (0.82)	51±05 (1.40)	37±03 (1.13)	20±03 (0.90)
MoW2	247±22 (0.61) *	261±24 (1.28)	43±12 (0.70)	47±05 (1.28)	31±03 (0.95)	23±02 (1.04)
MoW3	476±141 (1.17)	247±09 (1.21)	53±02 (0.81)	33±01 (0.89)	45±07 (1.38)	21±01 (0.93)
MoW4	374±38 (0.92)	172±06 (0.84)	50±11 (0.77)	39±08 (1.05)	36±05 (1.10)	19±04 (0.84)
PC	1955±67 (4.81) **	888±155 (4.35) **	325±129 (5.03) **	268±22 (7.32) **	1451±300 (44.52) **	172±19 (7.62) **
WSMoL						
(µg/plate)	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
NC	251±14 (1.0)	214 ±32 (1.0)	29±10 (1.0)	32±08 (1.0)	33±06 (1.0)	23±05 (1.0)
0.0125	186±08 (0.74)	263±55 (1.23)	41±02 (1.41)	30±07 (0.93)	22±02 (0.66)	22±05 (0.93)
0.05	207±08 (0.82)	257±04 (1.20)	34±06 (1.17)	32±01 (0.99)	39±08 (1.18)	34±09 (1.47)
0.2	159±25 (0.63)	304±29 (1.42)	39±08 (1.34)	32±02 (1.02)	41±06 (1.24)	18±03 (0.75)
0.8	182±06 (0.72)	275±67 (1.28)	32±10 (1.11)	30±08 (0.94)	49±06 (1.47)	18±02 (0.77)
PC	818±99 (3.26) **	888±155 (4.15) **	332±109 (11.55) **	168±42 (5.27) **	3277±515 (99.31) **	172±19 (7.33) **

NC: Negative control. PC: Positive control. The values in parenthesis are equal to mutagenic index. * = p< 0.05 ** = p< 0.01 (ANOVA + Dunnett test).

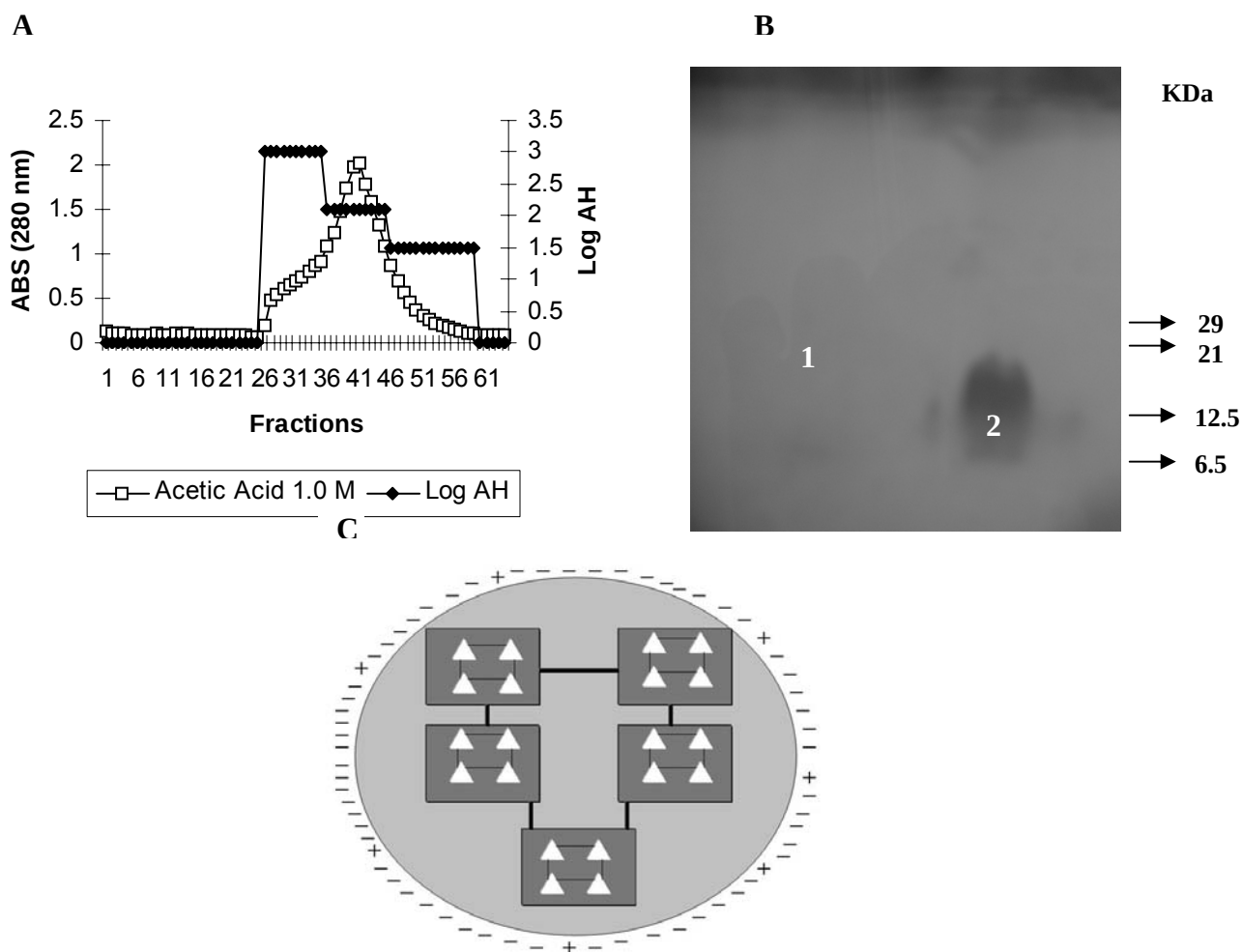
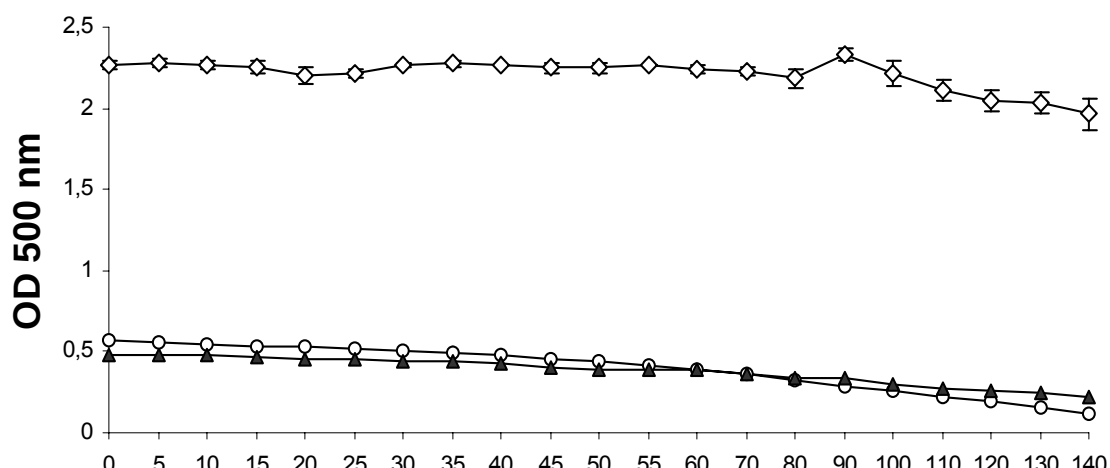


Fig. 1. (A) Purification of WSMoL on a chitin column (23.0 x 0.75 cm).

(B) SDS-PAGE (A) Sample of 0-60 % fraction (80 mg of protein) was applied to the column. Fractions of 2.0 ml were collected. Absorbance at 280 nm ($\square$) and HA ($\bullet$) are represented. (B) Polyacrylamide gel electrophoresis (10%) of WSMoL (50 μ g) β -mercapthoethanol treated (1).



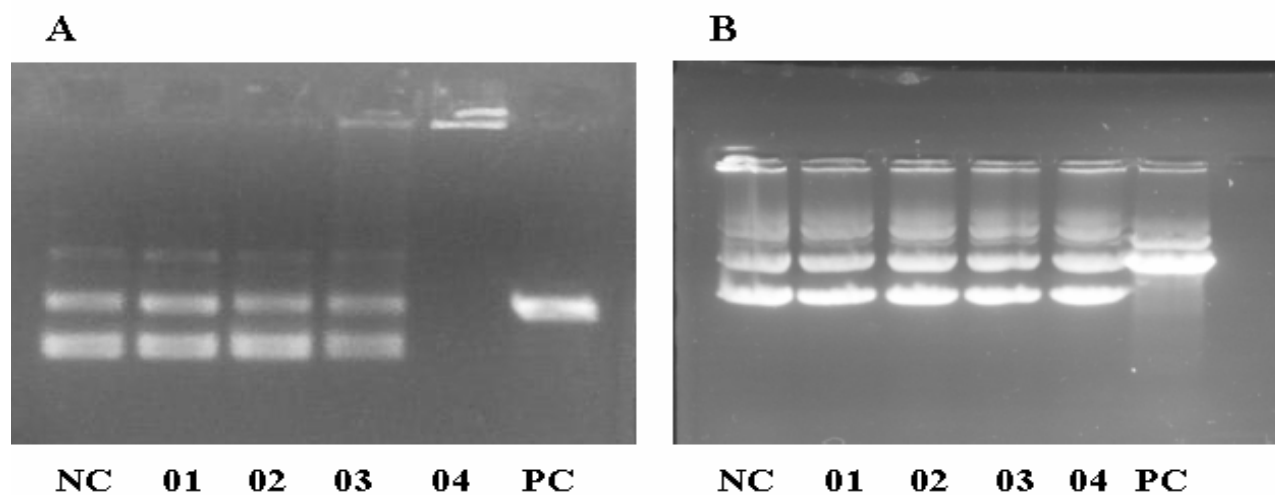


Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of plasmid DNA (pBC, 1 μ g). MoW samples (A): Mow1 (01), Mow2 (02), Mow3 (03) and Mow4 (04). WSMoL (B): 0.0125 (01), 0.05 (02), 0.2 (03) and 0.8 (04). Negative control, NC, Positive control, PC.

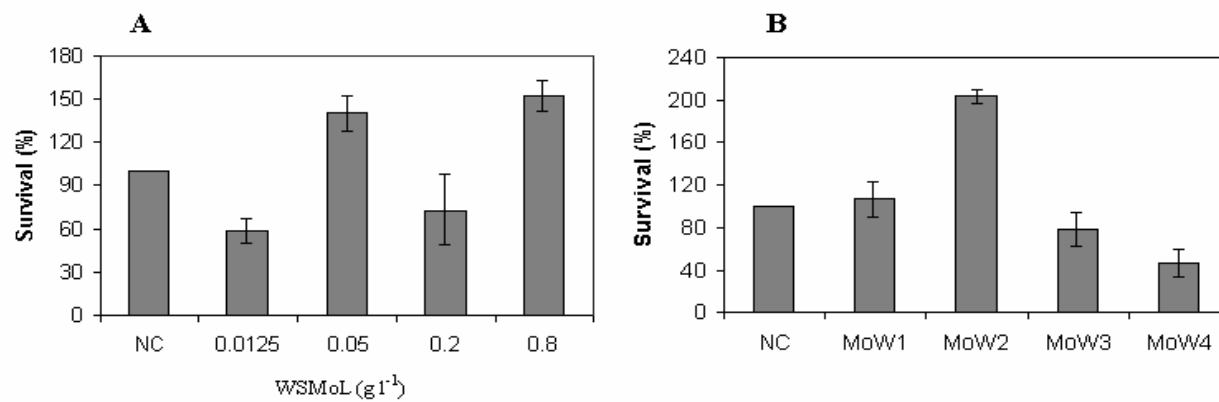


Fig. 4. Effect of WSMoL (A) and MoW samples (B) on the survival of *E. coli* DH10B. Each bar represents the mean $\pm$ S.D. of three experiments.

5. Conclusões

A finalidade do estudo foi o isolamento da lectina solúvel em água de sementes de *M. oleifera* (WSMoL), determinação de sua propriedade coagulante e avaliação do potencial genotóxico e mutagênico da água tratada com as sementes de *M. oleifera* ou WSMoL.

1. Os resultados mostraram que as sementes de *M. oleifera* foram fontes de lectina. WSMoL é estável a pH e temperatura, propriedades bioquímicas próprias para a sua utilização biotecnológica. A propriedade coagulante de WSMoL sugere o seu envolvimento na redução da turbidez da água. WSMoL não foi um agente genotóxico/mutagênico nas concentrações estudadas. Este resultado é de interesse devido a sua propriedade coagulante. Atividade antimicrobiana de WSMoL está sendo avaliada visando definir o seu papel potencial no tratamento da água.

2. As avaliações de mutagenicidade e genotoxicidade revelaram que a água obtida de acordo ao recomendado para consumo humano (MoW3) induziu genotoxicidade no ensaio *in vivo*. O efeito foi maior no mais concentrado MoW4 e não foi detectado nos mais diluídos MoW1 e MoW2. Visando minimizar riscos para

a saúde humana, tratamento de água com menor concentração de sementes devia ser avaliado em relação a sua atividade coagulante.

6. Anexos

6.1 Abstract apresentado em congresso

Abstract Apresentado a VIII Reunião Regional da SBBq e 3rd International Symposium in Biochemistry of Macromolecules and Biotechnology

EVALUATION OF GENOTOXIC AND MUTAGENIC POTENTIALS FROM WATER TREATED WITH *Moringa oleifera* SEED FLOUR

Lucíola A. D. M. M. Rolim¹, Márcia F. S. Macedo², Herbert A. A. C. N. Sisenando², Luana C. B. B. Coelho¹, Silvia R. Batistuzzo de Medeiros², Patrícia M. G. Paiva¹

¹Laboratório de Glicoproteínas, UFPE, Recife; ²Laboratório de Biologia Molecular e Genômica, UFRN, Natal.

Seed flour from *Moringa oleifera* is widely used in developing countries as a natural coagulant for water treatment. Lectin and antimicrobial activities were already detected in water treated with *M. oleifera* seeds. The aims of this work were to evaluate the genotoxic effect and mutagenic potential of water treated with *M. oleifera* seed flour according to established protocol. Aliquots of water containing 0.0125, 0.05, 0.2 or 0.8 µg of seed flour/µl were analyzed. Genotoxicity was evaluated by DNA plasmid assay. Mutagenicity was measured according to Kado test using *Salmonella typhimurium* TA97, TA98, TA100 and TA102. Plasmid DNA assay revealed by electrophoresis that there was no break of phosphodiester bonds in DNA molecule. Kado test did not show any mutational effect, by frameshift (TA97 and TA98) or base substitution (TA100 and TA102). These preliminary results indicated that water treated with *M. oleifera* seed flour was not genotoxic nor mutagenic in studied concentrations. However, other mutagenic assays must be performed with soluble active principles to guarantee the security to population of this water treatment.

Supported by: CNPq and CAPES.

Key Words: *Moringa oleifera*, genotoxicity, mutagenicity, Kado test, plasmid DNA.

6.2 Certificado de Menção honrosa

VIII Reunião Regional da SBBq
3rd International Symposium in Biochemistry of
Macromolecules and Biotechnology

Certificado

Certificamos que o trabalho

**EVALUATION OF GENOTOXIC AND MUTAGENIC POTENTIALS FROM
WATER TREATED WITH *Moringa oleifera* SEED FLOUR**

recebeu MENÇÃO HONROSA entre os 25 melhores painéis científicos na VIII Reunião Regional da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq, realizada em Natal, Rio Grande do Norte, no período de 6 a 8 de dezembro de 2006.

Natal, 8 de dezembro de 2006

Selma M. B. Jerônimo

Prof. Dr. Selma M. Bezerra Jerônimo
Presidente da VIII Reunião Regional - SBBq

Margarita A. Mavromatis

Margarita A. Mavromatis

1ª Secretária da VIII Reunião Regional - SBBq



Sociedade Brasileira de Bioquímica e
Biologia Molecular - SBBq

6.3 Normas para publicação na Water Research

WATER RESEARCH

A Journal of the International Water Association (IWA)
<http://www.iwapublishing.com//template.cfm?name=iwapwatres>

Guide for Authors

1. Submission

All manuscripts should be submitted electronically through Elsevier Editorial System (EES) which can be accessed at <http://ees.elsevier.com/wr>.

With the submitted manuscript authors should provide the names, addresses and e-mail addresses of four potential reviewers.

Submission of a paper implies that it has not been published previously, that it is not under consideration for publication elsewhere, and that if accepted it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the publisher.

2. Types of Contribution

Papers are published either as a Full Paper or a Review Paper. Comments on these papers are also welcome.

(a) A FULL PAPER is a contribution describing original research, including theoretical exposition, extensive data and in-depth critical evaluation, and is peer reviewed. The total length of a manuscript including figures, tables and references must not exceed 8000 words (40 pages).

(b) REVIEW PAPERS are encouraged, but the Editor-in-Chief must be consulted beforehand, in order to decide if the topic is relevant. Only critical review papers will be considered. The format and length of review papers are more flexible than for a full paper. Review papers are peer reviewed.

(c) COMMENTS on papers already published are welcome, subject to the criteria of interest, originality and the approval of the appropriate Editor. Comments can include extensions to, or criticisms of, those papers. They must provide arguments that are reasoned, and not presented in a confrontational fashion. They will be sent to the author of the original paper for reply, the outcome of which may be

publication in a future issue. Comments and Authors' Replies should not exceed 1200 words each and will be received until 4 months after publication. They will be accepted or rejected without corrections.

3. Paper Submission

- (a) All types of accepted submissions will have been peer reviewed.
- (b) Papers must be in English. Use professional help if English is not your mother tongue.
- (c) Manuscripts must be in double-spaced form with wide margins and line numbering. A font size of 12 pt is required. The corresponding author should be identified (include a Fax number and E-mail address). Full postal addresses (including e-mail addresses) must be given for all co-authors. Authors should consult a recent issue of the journal or the journal's website (<http://www.elsevier.com/locate/watres>) for style if possible. The Editors reserve the right to adjust style to certain standards of uniformity.
- (d) Multi-part papers are not to be considered.
- (e) Papers that are requested by the editors to be revised must be returned within 4 weeks or they will be regarded as withdrawn.
- (f) No page charges apply for Water Research.
- (g) The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail or, alternatively, 25 free paper offprints (additional copies can be ordered at current printing prices). The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use. Additional copies can be ordered at current printing prices.
- (h) Submitted papers should be accompanied by a list of 4 potential referees with names and addresses.

4. Content

All pages must be numbered consecutively. Words normally italicised must be typed in italics or underlined. A manuscript would normally include a title, abstract, key words, introduction, materials and methods, results, discussion, conclusions and references.

(a) Title page. The title page must state the names and full addresses of all authors. Telephone, fax and E-mail numbers must also be included for the corresponding author to whom proofs will be sent.

(b) Abstract. Authors are requested to ensure that abstracts for all types of contribution give concise factual information about the objectives of the work, the methods used, the results obtained and the conclusions reached. A suitable length is about 150 words.

(c) Key words. Authors must list immediately below the abstract up to 6 key words (not phrases) that identify the main points in their paper.

(d) Abbreviations and Notations. Nomenclature must be listed at the beginning of the paper and must conform to the system of standard SI units. Acronyms and abbreviations must be spelled out in full at their first occurrence in the text. Authors should consult - Notation for Use in the Description of Wastewater Treatment Processes', Water Res. 1987;(21)2:135-9.

(e) Conclusions. Papers must end with a listing of major conclusions, preferably in a list form.

(f) References. References to published literature must be cited **in the text** as follows:

Li and Gregory (2006) -The date of publication in parentheses after the authors' names. References must be listed together at the end of each paper and must not be given as footnotes. For other than review papers authors should aim to give no more than 20-30 recent, relevant references. They must be listed alphabetically starting with the surname of the first author, (year) followed by the title of the referenced paper and the full name of the periodical, as follows:

Li, G. and Gregory, J. (2006) Flocculation and sedimentation of high-turbidity waters. Water Research **25**(9), 1137-1143.

It is particularly requested that (i) authors' initials, (ii) the title of the paper, and (iii) the volume, part number and first and last page numbers are given for each reference.

References to books, reports and theses must be cited in the narrative. They must include the author(s), date of publication, title of book, editor(s) name(s) if applicable, page numbers, name of publisher, and place of publication. The abbreviation et al. may be used in the text. However, the names of all authors must be given in the list of references. Personal communications and other unpublished works must be included in the reference list, giving full contact details (name and address of communicator).

Personal communications must be cited in the text as, for example, Champney (2006).

References in languages other than English must be referred to by an English translation (with the original language indicated in parentheses).

Citing and listing of web references. As a minimum, the full URL should be given. Any further information, if known (author names, dates, reference to a source publication etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

(g) Illustrations and Tables. The total number of all illustrations and tables should not exceed 10. If illustrations need to take up more space than 2 printed pages in Water Research (1 page for shorter contributions) the number of words must be reduced accordingly. All illustrations must be clear and of good quality. Scale bars should be used instead of magnifications, as these change if the photograph is reduced. Tables and their headings must be typed on a separate sheet. Type must be clear and even across columns. Particular care must be taken with nomenclature and sub- and superscripts to ensure correct alignment. Horizontal and vertical lines must be inserted to define rows and columns, and column headings must be correctly aligned.

(h) Colour Illustrations: If, together with your accepted article, you submit usable colour figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in colour on the web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. For colour reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. For further information on the preparation of electronic artwork, please see  <http://authors.elsevier.com/artwork>.

(i) Supplementary data.

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

5. Proofs

Corrections to proofs must be restricted to printer's errors. Please check proofs carefully before return, because late corrections cannot be guaranteed for inclusion in the printed journal. Authors are particularly requested to return their corrected proofs to Elsevier as quickly as possible to maintain their place in the printing schedule.

6. Transfer of Copyright

Upon acceptance of a paper, authors will be asked to sign a Transfer of Copyright Agreement releasing copyright of the paper to Elsevier Ltd. Provision is made on the form for work performed for the United States Government (which is not subject to copyright restriction) and some United Kingdom Government work (which may be Crown Copyright).

Reprints The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail or, alternatively, 25 free paper offprints (additional copies can be ordered at current printing prices). The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use. Additional copies can be ordered at current printing prices.

Revised August 2004