

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

MESTRADO EM BIOQUÍMICA

Raquel Siebra Paes Barreto

Purificação e Caracterização Parcial de uma Lectina da Entrecasca da

***Caesalpinia ferrea* var. *leiostachya* Benth**

Recife

2007

Raquel Siebra Paes Barreto

Purificação e Caracterização Parcial de uma Lectina da entrecasca da

***Caesalpinia ferrea* var. *leiostachya* Benth**

**Dissertação apresentada ao Programa de
Mestrado em Bioquímica da Universidade
Federal de Pernambuco como requisito
parcial para a obtenção do título de Mestre
em Bioquímica.**

Orientadora: Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia

Co-orientadora: Profa. Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho

Co-orientadora: Profa. Dra. Russolina Benedeta Zingali

Recife

2007

Barreto, Raquel Siebra Paes

Purificação e caracterização parcial de uma lectina da
entrecasca da *Caesalpinia ferrea* var. *leiostachya* Benth. – Recife:
A Autora, 2007.

55 folhas : il.

Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – UFPE. CCB.

1. Lectinas 2 *Caesalpinia ferrea* I. Título.

574
577.112

CDD (22.ed.)
CDU (2.ed.)

UFPE
CCB - 2007 - 055

Ata da defesa de dissertação da Mestranda **Raquel Siebra Paes Barreto**, realizada em 28 de fevereiro de 2007, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Às 14:15 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 **Raquel Siebra Paes Barreto**, aluna do Curso de Mestrado em Bioquímica/CCB/UFPE. Iniciando os trabalhos a Profa. Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima, Coordenadora do Curso supra citado, fez a apresentação da aluna, de sua orientadora, Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia, de seus Co-Orientadores Profa. Dra. Russolina Bendeta Zingali, do Instituto de Bioquímica Médica/UFRJ, e a profa. Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho, do Depto. de Bioquímica/UFPE, e da Banca Examinadora composta pelos professores doutores: Maria Tereza dos Santos Correia, na qualidade de Presidente, Vera Lúcia de Menezes Lima, Patrícia Maria Guedes Paiva, os três do Depto. de Bioquímica, e a Profa. Dra. Adriana Carla Cavalcante Malta Argolo, Pesquisadora do CCB/UFPE e Professora do CEFET. Após as apresentações, a Sra. Presidente convidou a aluna para a apresentação de sua dissertação intitulada: **"Purificação e caracterização parcial de uma lectina da entrecasca da *Caesalpinia férrea* var. *Leiostachya Benth*"**, e informou que de acordo com o Regimento Interno do Curso, a candidata 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 a explanação e comentários acerca do tema em 40 (quarenta) minutos. Após a apresentação da mestranda, a Sra. Presidente concedeu um intervalo de 10 minutos. Reiniciando os trabalhos, 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. Patrícia Maria Guedes Paiva, e finalmente para a Profa. Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima, 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.

Vera Lucia M. Lima.
Patrícia M. Guedes Paiva
Tereza Correia
Adriana Carla C. M. Argolo.

**Dedico a meus amados pais Winston e
Altina, a meus irmãos e a Flávio.**

**Agradeço pelo amor, estímulo e
confiança.**

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	1
1. 1 Lectinas	1
1. 1. 1 Generalidades	1
1. 1. 2 Classificação	2
1. 1. 3 Lectinas de Leguminosas	3
1. 1. 4 Lectinas de entrecascas	3
1. 1. 5 Purificação de lectina	4
1. 1. 6 Caracterização de lectinas	6
1. 1. 7 Aplicações de lectinas	9
1. 2 <i>Caesalpinia ferrea</i>	10
2. OBJETIVOS	11
2.1 OBJETIVO GERAL	11
2. 2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	12
4. Artigo: Purification and Partial Characterization of a Lectin from <i>Caesalpinia ferrea</i> Bark	26
5. CONCLUSÕES	52
6. ANEXO	53

AGRADECIMENTOS

A Deus pelas bênçãos recebidas durante toda a minha vida.

À Professora Doutora Maria Tereza dos Santos Correia pela orientação científica, oportunidade, dedicação, confiança e estímulo constantes na execução deste projeto.

À Professora Doutora Russolina Benedeta Zingali pela atenção e colaboração científica essencial para a realização deste trabalho.

A todos que fazem o Laboratório de Glicoproteínas da Universidade Federal de Pernambuco, pelo auxílio em todos os momentos solicitados. Em especial à Maria, Roberto e Neila.

A todos os técnicos do Laboratório de Proteoma da Universidade Federal do Rio de Janeiro pela colaboração e apoio constantes.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Bioquímica da UFPE, pelos ensinamentos proporcionados e constante ajuda. Em especial à Neide, Miron e Djalma.

Aos meus colegas de Mestrado Lucíola, Paula, Cynthia, Fernanda, Juliene, Fabrício, Humberto e Ian pela colaboração e convívio amigo

A minhas amigas do Rio, Renata e Nathalia, pela ajuda, companhia e amizade sempre dispensadas.

A minha querida amiga irmã Marcela pelo carinho, confiança, respeito, disponibilidade e amor que foram construídos durante esse período.

A minhas pacientes pela compreensão e apoio sempre presentes.

A minha segunda mãe, Deda, pela apoio, presença e carinho.

A minhas cunhadas e cunhado pelo estímulo e admiração.

A meus irmãos pela amizade, união e presença em minha vida.

A Flávius pela companhia, estímulo, respeito e amor constantes.

A meus amados pais, Winston e Altina, pela orientação, carinho e amor incondicionais.

A todos aqueles que direta ou indiretamente me auxiliaram na execução deste projeto.

RESUMO

As lectinas são proteínas ou glicoproteínas que se ligam reversivelmente a carboidratos com diferentes graus de seletividade, são encontradas em uma variedade de organismos e estão envolvidas em numerosos processos celulares. Neste trabalho foi avaliada a presença de lectina na entrecasca da *Caesalpinia ferrea* var. *leiostachya* Benth (CfeBL), planta com ampla distribuição no Brasil e conhecida vulgarmente como pau-ferro. Extrato bruto da entrecasca da *C. ferrea* foi obtido em NaCl 0,15 M. Este extrato foi submetido a fracionamento com sulfato de amônio (F 0-80%, F80) e ensaios de atividade hemaglutinante (AH) com diferentes tipos de eritrócitos. A fração F80 foi cromatografada em uma coluna de quitina que foi eluída, respectivamente, com NaCl 0,15M e ácido acético 1 M; CfeBL foi eluída com ácido acético 1M. A AH da CfeBL foi, então, avaliada em presença de íons divalentes (Ca^{++} , Mg^{++}), diferentes valores de pH (2- 12), por carboidratos, glicoproteínas e ensaios da estabilidade térmica em diferentes temperaturas (30 – 100 °C, por 30 minutos). A massa molecular da proteína nativa foi determinada usando uma coluna de Superdex 75-30 cm. Amostras da CfeBL foram submetidas a SDS-PAGE em condições desnaturantes e redutoras. Eletroforese bidimensional foi realizada para a verificação do ponto isoelétrico (pI) e massa molecular. O grau de fluorescência da CfeBL foi determinado através do espectrômetro de fluorescência. Eritrócitos de coelho foram usados para avaliação da AH. A AH da CfeBL não sofreu alteração em presença de íons nem em diferentes valores de pH. A CfeBL continuou ativa após aquecimento à 100 °C, foi parcialmente inibida pelo carboidrato N-acetil-D-glicosamina e as glicoproteínas fetuína, soro de coelho, azocaseína, caseína, ovoalbumina, soro fetal, tiroglobulina e peroxidase não inibiram a AH da CfeBL. A CfeBL apresentou duas bandas por SDS-PAGE e o sistema Superdex 75-30 cm revelou dois picos protéicos com 19 e 15 KDa. Na eletroforese 2D a massa molecular estimada foi de 20 e 15 KDa e o pI de 4,53 e 5,14. Não foi observado crescimento de bactérias gram-positivas ou negativas em amostras de CfeBL. Uma lectina, CfeBL, específica para N-acetil-D-glicosamina, estável em diferentes temperaturas e variações de pH, foi obtida da entrecasca de *C. ferrea* por cromatografia de afinidade em quitina, com potencial atividade antimicrobiana.

Palavras-Chave: *Caesalpinia férrea*, Lectina, Lectina - Caracterização, Lectina - Purificação

ABSTRACT

The lectins are proteins or glycoproteins that reversibly bind carbohydrates with different selectivity degrees, they are found in a variety of organisms and they are involved in numerous cellular processes. In this work the presence of a lectin was evaluated in the bark of *Caesalpinia ferrea* var. *leiostachya* Benth (CfeBL), plant with wide distribution in Brazil and known commonly as pau-ferro. *C. ferrea* bark crude extract was obtained in 0.15 M NaCl. This extract was submitted to ammonium sulphate fractionation (F 0-80%, F80) and to hemagglutinating activity (HA) with different types of erythrocytes. The fraction F80 was chromatographed in a chitin column that was washed, respectively, with 0.15 M NaCl and 1.0 M acetic acid 1 M; CfeBL was eluted with 1.0 M acetic acid. HA of CfeBL was evaluated in presence of divalent ions (Ca^{++} , Mg^{++}), different pH values (2 - 12), by carbohydrates, glycoproteins and thermal stability assay in different temperatures (30 - 100 °C, for 30 minutes). The molecular mass of the native protein was determined using a Superdex 75-30 cm column. Samples of CfeBL were submitted to SDS-PAGE under denaturated and reduced conditions. Bidimensional electrophoresis was accomplished for the isoelectric point (pI) and molecular mass determinations. The CfeBL fluorescence degree was determined through fluorescence spectrometer. Rabbit erythrocyte were used for HA evaluation. The CfeBL HA was not altered in presence of ions nor in different pH values. CfeBL maintained its activity after heating to 100 °C, it was partially inhibited by the carbohydrate N-acetyl-D-glucosamine and the glycoproteins fetuin, rabbit serum, azocasein, casein, ovoalbumine, fetal serum, thyroglobuline and peroxidase did not inhibit CfeBL HA. CfeBL presented two bands by SDS-PAGE and the Superdex 75-30 cm system revealed two proteic picks with 19 and 15 KDa. By bidimensional electrophoresis the estimated molecular mass was 20 and 15 KDa and the pI was 4.53 and 5.14. Growth of gram-positive or negative bacteria was not observed in CfeBL samples. A lectin, CfeBL, specific for N-acetyl-D-glucosamine, stable in different temperatures and pH variations, was obtained from *C. ferrea* bark by chitin chromatography, with potential antimicrobial activity.

Key-Words: *Caesalpinia ferrea*, Lectin, Lectin - Characterization, Lectin - Purification

1 INTRODUÇÃO

1.1 LECTINAS

1.1.1 Generalidades

Stilmark, em 1888, foi quem primeiro relatou sobre lectina, através de estudos sobre a toxicidade do extrato de *Ricinus communis* (mamona). Neste, ele observou a presença de uma proteína (ricina) que tinha a capacidade de aglutinar eritrócitos (KENNEDY et al., 1995; VASCONCELOS e OLIVEIRA, 2004). Subseqüentemente, em 1889, Hellin obteve o mesmo resultado de hemaglutinação do extrato tóxico de *Abrus precatorius* (jequiriti), chamando a proteína de abrina (SHARON e LIS, 1991). Essas descobertas imediatamente atraíram a atenção de novos pesquisadores. Um maior interesse se deu a partir de 1960, pela verificação de que algumas lectinas promovem estimulação mitogênica de linfócitos e inibição do crescimento de células tumorais (LIS e SHARON, 1986). O interesse crescente por estas proteínas se dá até hoje, onde são valiosos instrumentos em diversas áreas de pesquisas.

O termo lectina (originado do latim “lectus”, que significa selecionado, escolhido) foi proposto por BOYD e SHAPLEIGH (1954) para designar o grupo de proteínas que têm a habilidade de reconhecer especificamente carboidratos (WITITSUWANNAKUL et al., 1997; VASCONCELOS e OLIVEIRA, 2004). As lectinas são proteínas ou glicoproteínas que possuem pelo menos um sítio de ligação a carboidratos ou derivados (aminoaçúcares, alquilaçúcares, etc.), não apresentam atividade catalítica nem características estruturais imunológicas (GHOSH et al., 1999; SHARON e LIS, 2001; VASCONCELOS e OLIVEIRA, 2004; RITTIDACH, 2006; SUN et al., 2006), e que se ligam reversivelmente a mono ou oligossacarídeos específicos (PEUMANS e VAN DAMME, 1998; VAN DAMME et al., 2004; WONG et al., 2006; SUN et al., 2006).

A natureza não imune das lectinas é um fator que é utilizado para distingui-las de anticorpos anticarboidratos que aglutinam células. As estruturas das lectinas diferem entre si quanto à composição aminoacídica, requerimentos de metais, peso molecular e estrutura tridimensional enquanto que os anticorpos são estruturalmente similares (MOREIRA et al., 1998).

O reconhecimento das lectinas aos carboidratos livres ou conjugados a superfícies celulares se dá através de sítios de ligação que tendem a estar na superfície da molécula protéica (GOLDSTEIN, 2002; CHUMKHUNTHOD et al., 2006). A hidrofobicidade é a principal força de interação; pontes de hidrogênio e interações de van der Waals entre o açúcar e a proteína também contribuem para a seletividade da ligação (Lis e Sharon, 2002; Vasconcelos & Oliveira, 2004). Pequenas alterações na estrutura da proteína podem levar a modificações na orientação do carboidrato ligado a ela, portanto, altera a especificidade da lectina (Ng et al., 1996). Detalhados estudos de lectinas demonstraram que elas são um vasto e heterogêneo grupo de proteínas que diferem fortemente quanto à especificidade aos carboidratos, estrutura molecular e atividade biológica (Van Damme et al., 1996).

1.1.2 Classificação

Vários critérios são utilizados para classificar as lectinas. Quanto à especificidade, que é definida em função do monossacarídeo que mais eficazmente inibe a atividade lectínica (KENNEDY, 1995), elas podem ser classificadas em grupos: glicose, manose, fucose, galactose/N-acetilgalactosamina, N-acetilglicosamina, ácido siálico, e glicanos complexos (PEUMANS e VAN DAMME, 1998a; VASCONCELOS e OLIVEIRA, 2004).

Quanto à sua estrutura molecular, as lectinas podem ser classificadas em: merolectinas, aquelas que apresentam apenas um grupo ligante para carboidrato, geralmente são pequenas, incapazes de aglutinar células, devido à natureza monovalente; hololectinas, as que apresentam dois ou mais ligantes homólogos para carboidratos ou derivados e, portanto, são capazes de aglutinar células e precipitar glicoconjugados; quimerolectinas, as que possuem sítios ligantes distintos, com especificidade para diferentes moléculas de açúcar (GRUBHOFFER et al., 1997; VASCONCELOS e OLIVEIRA, 2004). A maioria das lectinas de plantas são hololectinas, comportando-se como hemaglutininas. Peumans e Van Damme (1998), mais recentemente, sugeriram a introdução de mais uma classe de lectinas, as superlectinas, um tipo especial das quimerolectinas. Elas são proteínas com pelo menos dois sítios de ligação a carboidratos, estruturalmente diferentes, reconhecendo, assim, carboidratos distintos (VASCONCELOS e OLIVEIRA, 2004).

1.1.3 Lectinas de Leguminosas

As lectinas possuem ampla e variada distribuição na natureza podendo ser encontradas em microorganismos (SUSEELAN et al., 2002; BHOWAL et al., 2005), nos seres pluricelulares animais (YE e NG, 2000; SUSEELAN et al., 2002; ZHONG et al., 2005) e vegetais (COELHO e SILVA, 2000; SUSEELAN et al., 2002; BÖCKELMANN et al., 2004; SULTAN et al., 2005). As plantas são a principal fonte de lectinas na natureza, servindo como material para a purificação dessas moléculas (SUN et al., 2006). Na família das leguminosas, as lectinas têm sido detectadas em mais de 600 espécies e variedades, tendo sido purificadas em aproximadamente 70 destas (YAMASHITA et al., 1992; VAN DAMME et al., 2000; NAEEM et al., 2001; SAITO et al., 2001). As lectinas são particularmente abundantes em sementes de leguminosas, chegando a constituir até 10% da proteína total (SPILATRO et al., 1996). Porém tem crescido o interesse por lectinas presentes em tecidos vegetativos como folhas (COELHO e SILVA, 2000; RATANAPO et al., 2001), entrecasca (SPILATRO et al., 1996; VAN DAMME et al., 1997a,b; WITITSUWANNAKUL et al., 1998) e raízes (NAEEM et al., 2001).

1.1.4 Lectinas de entrecasca

Algumas evidências enfatizam uma grande semelhança entre as clássicas proteínas de armazenamento em sementes e suas homólogas funcionais em tecidos de entrecasca. As proteínas de armazenamento de entrecasca estão sujeitas a um rigoroso controle evolucionário. Além disso, as composições aminoacídicas das proteínas de armazenamento da entrecasca e das sementes assemelham-se fortemente; e todas as proteínas de armazenamento de entrecasca estudadas acumulam-se em células parenquimais depositadas em organelas similares aos corpos protéicos das sementes. Conclui-se que ambas as proteínas apresentam funções fisiológicas semelhantes na planta. As lectinas de entrecasca de *S. nigra*, *R. pseudoacacia* e *S. japonica* são consideradas verdadeiras proteínas de armazenamento, baseando-se na sua quantidade, flutuação sazonal e localização (VAN DAMME et al., 1995).

1.1.5 Purificação de lectina

A detecção da presença de lectinas em uma fonte biológica é realizada através de ensaio de hemaglutinação (SHARON e LIS, 2001), o que consiste em diluições sucessivas da lectina, que determina a capacidade de um extrato aglutinar eritrócitos de sangue humano ou de outras espécies (CORREIA e COELHO, 1995; KABIR, 1998; COELHO e SILVA, 2000). Para aumentar a sensibilidade dos eritrócitos a lectina estes podem ser tratados enzimaticamente (BANERJEE et al., 2004; BRANCO et al., 2004) ou quimicamente (COELHO e SILVA, 2000; GAIDAMASVILI et al., 2002). Para assegurar a presença de lectinas numa amostra, são necessários ensaios subsequentes de inibição da atividade hemaglutinante (AH) utilizando uma solução de carboidratos (CORREIA e COELHO, 1995; SHARON e LIS, 2001). Isso se faz necessário, pois a aglutinação de eritrócitos pode ser simulada por outros compostos como os taninos (NEVES et al., 1997; RÜDIGER, 1998).

As lectinas são purificadas com base em características como tamanho molecular, solubilidade, carga elétrica e afinidade específica de ligação a carboidratos. Em geral, a primeira etapa no processo de isolamento de lectinas de plantas é a extração dessas proteínas em solução salina (KAWAGISHI et al., 2001; KONOZY et al., 2003) ou solução tampão (OLIVEIRA et al., 2002; TRIGUEROS et al., 2003). Tal solução é misturada ao triturado do vegetal de forma a constituir um extrato com concentração determinada. Sob agitação constante, temperatura estabelecida e período de tempo determinado a amostra protéica é extraída e filtrada; e o extrato sobrenadante é centrifugado para obtenção do extrato bruto, livre do triturado. Posteriormente, para uma purificação parcial, utiliza-se, na maioria das vezes, a precipitação protéica por fracionamento salino com sulfato de amônio (COELHO e SILVA, 2000; ELIFIO et al., 2000) que se baseia no princípio de que a solubilidade da maioria das proteínas é diminuída em altas concentrações de sais. Esse efeito é chamado "salting-out" e, o sulfato de amônio é muito utilizado para este fim. Em geral, as lectinas podem ser parcialmente purificadas por este processo, uma vez que o sal retira a camada de solvatação existente ao redor das proteínas fazendo com que as mesmas precipitem (COELHO e SILVA, 2000). As lectinas parcialmente purificadas são, então, submetidas ao processo de diálise em membranas semipermeáveis, método que se baseia na separação de moléculas por diferenças de peso molecular. As proteínas ficam retidas enquanto que moléculas menores, como carboidratos ou sais, presentes na amostra passam para a solução solvente (KABIR et al., 1998).

Técnicas cromatográficas convencionais são igualmente empregadas com o objetivo de purificar as proteínas e podem ser: de afinidade (NAEEN et al., 2001), de exclusão molecular (KARASAKI et al., 2001; REGO et al., 2002), de troca iônica, entre outras (WANG et al., 2003). A cromatografia de afinidade é a técnica mais utilizada atualmente para a purificação de lectinas, e foi desenvolvida por Cuatrecasas et al. (1968). Baseia-se na propriedade das lectinas se ligarem específica e reversivelmente a carboidratos (KENNEDY et al., 1995). Essa propriedade possibilita o emprego da cromatografia de afinidade como etapa determinante no processo de purificação de lectinas (PAIVA e COELHO, 1992; NOMURA et al., 1998; PADMA et al., 1999; COELHO e SILVA, 2000; RATANAPO et al., 2001; PAJIC et al., 2002). Diferentes matrizes são escolhidas de acordo com a especificidade da lectina por carboidratos (TASUMI et al., 2004; GERLACH et al., 2005), a qual é definida através de ensaios de inibição da AH utilizando monossacarídeos ou carboidratos complexos. Nesta técnica, a proteína de interesse ficará seletiva e especificamente ligada ao ligante (matriz), enquanto outras substâncias passarão através da coluna. A proteína ligada pode, então, ser recuperada na sua forma pura através da modificação das condições de eluição (BAYNES e DOMINICZAK, 2000; YE e NG, 2002; HELMHOLZ et al., 2003). Alguns desses suportes já são disponíveis comercialmente, assim, lectinas específicas para N-acetil-D-glicosamina, e seus oligossacarídeos, ou derivados de quitina, por exemplo, podem ter quitina como matriz de afinidade (SHIBUYA et al., 1986; STOEVA et al., 2001; TRINDADE et al., 2006). Ainda algumas matrizes de afinidade têm sido preparadas por acoplamento de carboidratos ou glicoproteínas a diferentes suportes (OOI et al., 2004, CHUMKHUNTHOD et al., 2006).

A cromatografia por troca iônica separa as proteínas em função de sua carga. A fase estacionária é altamente carregada e por ela passam moléculas (proteínas) com cargas de sinais contrários que são seletivamente adsorvidas. As moléculas adsorvidas podem então ser eluídas, pela utilização de outros íons, com o mesmo tipo de carga, porém com maior força de interação com a fase estacionária. Na cromatografia de filtração em gel ou exclusão molecular as moléculas são separadas através do tamanho. A mistura protéica passa através de uma coluna contendo esferas de gel cujos poros possuem intervalos de tamanhos relativamente estreitos. As moléculas maiores que não penetram nos poros do gel são eluídas primeiro, enquanto que as moléculas de tamanhos menores capazes de penetrar no gel vão passar lentamente, de modo que a separação é de ordem decrescente de massa molar (HEU et al., 1995). Este tipo de cromatografia é usado tanto para obter preparações protéicas homogêneas (BEZERRA et al., 2001), como para definir a massa molar da proteína nativa (KAWAGISHI et

al., 2001).

Estas cromatografias podem ser usadas em técnicas de alta resolução para purificação de lectinas em sistemas como cromatografia líquida de rápida resolução (FPLC do inglês, Fast Protein Liquid Chromatography) utilizando cromatografia de troca iônica sobre coluna de Mono Q ou Mono S (MO et al., 1993, CHUNG et al., 2001), bem como, exclusão molecular (JIMBO et al., 2000). Ainda, cromatografia líquida de alta pressão (HPLC, do inglês, High Pressure Liquid Chromatography) utilizada para estimar massas moleculares de lectinas purificadas (FETON-NAVARRO et al., 2003, TASUMI et al., 2004), fracionar proteínas (SUZUKI et al., 1990) e também para separar fragmentos peptídicos, obtidos por digestão com endoproteínases de lectinas purificadas (KUSUI et al., 1991).

1.1.6 Caracterização de lectinas

Após a purificação dá-se início à caracterização estrutural das lectinas. O ensaio de hemaglutinação, utilizado para detecção das lectinas, é útil para caracterizá-las quanto à especificidade a eritrócitos humanos e/ou aos de animais. Ensaio de inibição por carboidratos e/ou glicoconjugados são também excelentes meios de caracterização lectínica pois promovem a descoberta da especificidade de ligação a carboidratos (NAGAI et al., 1999) a mono, di ou oligossacarídeos e quanto à capacidade de interação da lectina a outras moléculas como glicoproteínas, glicolípídeos ou polissacarídeos (GUPTA e SRIVASTAVA, 1998; MOREIRA et al., 1998; YAMAGUCHI et al., 1998; MACHUKA et al., 1999) contribuindo para a determinação do suporte de afinidade ideal para a sua purificação.

A avaliação da atividade biológica da lectina na presença de íons metálicos é outra etapa importante da caracterização pois algumas lectinas necessitam desses íons para promover sua atividade biológica (SAMPAIO et al., 1998a; MACHUKA et al., 1999). O teste de temperatura para determinação da estabilidade protéica constitui outro passo na caracterização pois algumas lectinas são termossensíveis e outras termoestáveis, o que significa que tais proteínas têm sua atividade biológica otimizada em determinadas temperaturas e ausente em temperaturas desfavoráveis à manutenção da estrutura nativa (CORREIA e COELHO, 1995). A estabilidade da atividade lectínica em função de diferentes valores de pH também deve ser avaliada, uma vez que estas devem ser mantidas em soluções que apresentem condições ideais à sua utilização, em condições nativas, nos diferentes

experimentos à que podem ser submetidas (MACHUKA et al., 1999).

Técnicas eletroforéticas que servem para indicar a natureza ácida ou básica de uma lectina, assim como para determinar sua estrutura quanto ao número de subunidades, peso molecular, pureza (REGO et al., 2002) ou ainda para caracterizá-la como uma glicoproteína (COELHO e SILVA, 2000) são importantes na caracterização lectínica. Os métodos eletroforéticos baseiam-se no princípio de que uma molécula com carga elétrica líquida mover-se-á em um campo elétrico. A velocidade de migração de uma proteína depende da intensidade do campo, da carga líquida da proteína e do coeficiente de atrito. As separações eletroforéticas são quase sempre feitas em gel, onde os de poliacrilamida são os escolhidos por serem quimicamente inertes e porque o tamanho dos seus poros pode ser controlado (STRYER, 2004).

Outra forma de caracterizar as proteínas é através de gel bidimensional (2D) que é produzido por eletroforese, baseado em uma combinação de duas propriedades intrínsecas e independentes de cada proteína, tais como estado de cargas e massa molecular. Em uma primeira dimensão, as proteínas são separadas pela sua capacidade de protonação, através de seu ponto isoelétrico (pI), e, em uma segunda dimensão, pelo seu tamanho, através de sua massa molecular relativa (Mr). Na primeira dimensão, utiliza-se a técnica de focalização isoelétrica (IEF) de uma solução da mistura protéica com agentes desnaturantes não-carregados em uma tira de gel de poliacrilamida. Na segunda dimensão, a separação por peso molecular é realizada por eletroforese em um gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (CHROMY et al., 2004; QUALTIERI et al., 2007).

A eletroforese 2D é hoje a principal técnica de separação de proteínas utilizada antes da aplicação da amostra no espectrômetro de massa. Sua vantagem em relação a outras tecnologias é a capacidade de separar com alta resolução um grande número de proteínas de uma amostra complexa e a possibilidade de se fazer análises de expressão gênica por meio de comparação dos padrões protéicos (QUALTIERI et al., 2007; SIZOVA et al., 2007).

Proteínas com pesos moleculares muito altos ou muito baixos, porém, não são bem separadas nas eletroforeses 2D. Além disso, proteínas com um pequeno número de cópias dentro da célula, como as proteínas sinalizadoras, não são reveladas pelos métodos convencionais de coloração, tais como nitrato de prata e azul brilhante de comassie. Com base nestas dificuldades, algumas estratégias para se identificar um maior número de proteínas foram propostas: o pré-fracionamento das amostras, a utilização de tiras com faixas estreitas de pH, além de técnicas de coloração específicas (GÖRG et al., 2000; HERBERT et al., 2001).

A eletroforese bidimensional consiste de cinco etapas principais. A primeira é a preparação da amostra. O melhor método de extração, precipitação e solubilização das proteínas varia de uma amostra para outra e deve ser estabelecido para cada caso em particular (HERBERT, 1999). Apesar disso, alguns passos essenciais devem ser seguidos: as proteínas devem ser parcialmente purificadas, completamente solubilizadas, desagregadas, desnaturadas e reduzidas. A segunda é a focalização isoeletrica (primeira dimensão) onde o ponto isoeletrico de uma proteína é determinado. Uma vez submetidas a um campo elétrico, as proteínas migrarão até encontrar uma faixa de pH referente ao seu pI e neste ponto ficarão com carga total neutra (BERKELMAN e STENSTED, 1998). A terceira etapa é a eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (segunda dimensão) que separa as proteínas por seu peso molecular na presença de SDS. A quarta etapa é a detecção de proteínas por técnicas analíticas avançadas de detecção e identificação. Após esta detecção as proteínas são, então, identificadas por espectrômetros de massa e analisadas por digitalização e análise de imagem. Atualmente, estão disponíveis no mercado diversos *softwares* que podem oferecer aos pesquisadores um método automático, prático e estatisticamente seguro para análise comparativa dos géis 2D.

Em bioquímica e biologia molecular uma das técnicas espectroscópicas mais utilizadas é a espectroscopia de fluorescência. A fluorescência não é um método quantitativo e os resultados são em geral apresentados como fluorescências relativas ou unidades arbitrárias. Dados de fluorescência são geralmente apresentados como espectros de emissão, gráfico de intensidade de fluorescência (unidades arbitrárias) *versus* comprimento de onda (nanômetros) ou números de ondas (cm^{-1}).

A interação da luz com a matéria tem sido largamente empregada na física, na química e em ciências biológicas (CRONEY et al., 2001). Em bioquímica e biologia molecular, a espectroscopia de fluorescência vem sendo utilizada em: detecção de espécies reativas do oxigênio (GOMES, FERNANDES e LIMA, 2005); análises de sequência de ácidos nucleicos (DAVIES et al., 2006); identificação celular (FARRUGGIA et al., 2006); imunoenaios (SIN et al., 2006). Apesar de não fornecer informação detalhada sobre a estrutura de uma proteína, a fluorescência é bastante difundida devido à sua sensibilidade (Weiss, 1999) e à capacidade de detectar mudanças nas propriedades dinâmicas e estruturais das mesmas (Ge, Tolosa e Rao, 2004).

1.1.7 Aplicações de lectinas

As lectinas apresentam uma área ampla e variada de aplicabilidade podendo ser valiosas em processos biotecnológicos, nas áreas de pesquisa médica, biológica, farmacológica e bioquímica. Devido às suas propriedades peculiares, principalmente a sua especificidade de ligação a carboidratos, as lectinas têm sido ferramentas poderosas em estudos citoquímicos e histoquímico (CHUMKHUNTHOD et al., 2006), para detecção, isolamento e estudos estruturais de oligossacarídeos e glicoconjugados, fracionamento de células (BONNEIL et al., 2004) e como moléculas bioadesivas na liberação de drogas (GABOR et al., 2001; WONG et al., 2006). Devido ao fato de algumas lectinas possuírem habilidade para mediar mucoadesão, citoadesão e citoinvasão de drogas (GABOR et al., 2004), essas moléculas têm sido associadas a nanopartículas e exploradas quanto a sua utilização em sistemas de liberação de drogas. (RODRIGUES et al., 2003).

As lectinas também podem ser usadas para explorar superfícies celulares, ligando-se à porção carboidrato de glicoproteínas ou glicolipídeos que se projeta na célula (BAKALOVA e OHBA, 2002) e, portanto, para diagnóstico em processos de desenvolvimento, diferenciação e transformação neoplásica (Sharon e Lis, 2001; Leite et al., 2005). Vários trabalhos mostraram também que determinadas bactérias produzem lectinas específicas para certos carboidratos, e fazem uso das mesmas para se aderir ao tecido hospedeiro como primeiro passo em um processo infeccioso. Ao submeter o organismo infectado com a bactéria a injeções de carboidratos, a colonização é reduzida devido à diminuição de sua adesão ao tecido (RUDIGER et al., 2000; LEITE et al., 2005 ; BONNEIL et al., 2004).

Em estudos mais recentes com lectinas foram observadas: apoptoses induzidas em tumores de células humanas (KARASAKI et al., 2001; GAIDAMASHVILI e STATEN, 2006), indução da síntese de proteínas específicas como enzimas e citocinas (GAIDAMASHVILI e STATEN, 2006), aglutinação de células bacterianas (GAIDAMASHVILI et al., 2002; TASUMI et al., 2004), atividade mitogênica (WONG et al., 2006), atividade antiinflamatória (CHUMKHUNTHOD et al., 2006), atividade antimicrobiana. Além de contribuições importantes para o prognóstico e diagnóstico do câncer (KABIR et al., 1998; WONG et al., 2006), para distinguir o câncer de próstata e a hiperplasia benigna neste órgão (BASU et al., 2003), para caracterizar e avaliar o padrão de ligação em tecidos humanos de mama transformados (BELTRÃO et al., 1998) e para a caracterização de patologias cerebrais, como a hidrocefalia fetal humana (ULFIG et al., 2003).

1.2 *Caesalpinia ferrea*

A *Caesalpinia ferrea* var. *leiostachya* Benth é uma planta pertencente à família Leguminosae, do gênero *Caesalpinioideae*, e variação *leiostachya*; é distribuída extensamente nas regiões do norte e do nordeste do Brasil, principalmente na caatinga nordestina (NAKAMURA et al., 2002; www.uefs.br/sitientibus).

É uma espécie economicamente importante por ter multiplicidade de usos. A madeira, de cerne muito duro, dá origem ao nome popular da espécie (pau-ferro) e é empregada na construção civil. Na medicina popular, tem grande utilidade: a decocção da madeira é anticatarral e cicatrizante; a casca é descongestionante, depurativa, adstringente e é usada para tratamento de diabetes; as raízes são febrífugas, antidiarréicas e são usadas como agente antipirético; o fruto é usado para o tratamento de diabetes, tosse, contusões, ferimentos e apresenta propriedades béquicas e a entrecasca é usada para enterocolite e diarreia (PENNA, 1946; LEWIS, 1987; CARVALHO et al., 1995; NAKAMURA et al., 2002; UEDA et al., 2001). O pau ferro também apresenta atividade antibacteriana, antifúngica, anti-helmíntica, antiúlcera, expectorante, antiinflamatória, assim como propriedades analgésicas (CARVALHO et al., 1996; RUDIGER et al., 2000; NAKAMURA et al., 2002).

A importância e multiplicidade de usos da *C. ferrea* justifica o estudo com os diferentes tecidos desta planta para a avaliação e obtenção de moléculas bioativas. Lectinas com importantes aplicações biotecnológicas têm sido isoladas, purificadas. Apesar de vários trabalhos indicarem que extratos dos diferentes tecidos são empregados em medicina popular, não existe relatos na literatura acerca de lectinas isoladas de entrecasca de *C. ferrea*.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Isolar, purificar e caracterizar parcialmente uma lectina de entrecasca de *Caesalpinia ferrea* var. *leiostachya* Benth.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter um extrato da entrecasca de *C. ferrea* com atividade lectínica;
- Purificar parcialmente uma lectina da entrecasca de *C. ferrea* por precipitação com sulfato de amônio;
- Purificar a lectina da entrecasca de *C. ferrea* (CfeBL) por cromatografia de afinidade utilizando quitina como matriz de afinidade;
- Avaliar a atividade hemaglutinante da CfeBL em presença de diferentes eritrócitos, carboidratos, glicoproteínas, íons, valores de pH e temperaturas;
- Caracterizar CfeBL por SDS-PAGE, eletroforese bidimensional e espectroscopia de fluorescência;
- Avaliar crescimento de bactérias gram-positivas ou gram-negativas em amostra de CfeBL.

3. REFERÊNCIAS

- BAKALOVA, R.; OHBA, H. Purification of normal lymphocytes from leukemic T-cells by lectin-affinity adsorbents- correlation with lectin-cell binding. **Cancer Letters**, v. 192, 59 - 65, 2003.
- BANERJEE, S., CHAKI, S., BHOWAL, J., CHATTERJEE, B. P. Mucin binding mitogenic lectin from freshwater Indian gastropod *Belamya bengalensis*: purification and molecular characterization. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 421, 125-134, 2004.
- BASU, P.S., MAJHI, R., BATABYAL, S.K. Lectin and serum- PSA intraction as a screening test for prostate cancer. **Clinical Biochemistry**, v. 36, p. 373-376, 2003.
- BELTRÃO E. I. C., CORREIA, M. T. S., FIGUEREDO-SILVA, J. E COELHO, L. C.B. B. Binding evaluation of isoform 1 from *Cratylia mollis* lectin to mammary human tissues. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 74, p. 125-134, 1998.
- BERKELMAN, T., STENSTED, T. 2-D electrophoresis using immobilized pH gradients: principles and methods. **Edition AC, Amersham Biosciences Inc.**, v. 80, p. 6429-60, 1998.
- BEZERRA , R. S.; SANTOS, J.F.; PAIVA, P. M. G.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B.; VIEIRA, V. L. A; CARVALHOJR, L. B. Partial purification and characterization of a thermostable trypsin from pylory caeca of tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Journal of Food Biochemistry**, v. 25, p. 199 - 210, 2001.
- BHOWAL, J., GUHA, A.K., CHATTERJEE, B.P. Purification and molecular characterization of a sialic acid specific lectin from the phytopathogenic fungus *Macrophomina phaseolina*. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 1973-1982, 2005.
- BONNEIL, E.,YOUNG, N.M., LIS, H., SHARON, N.,THIBAUT, P. Probing genetic variation and glycoform distribution in lectins of the Erythrina genus by mass spectrometry. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 426, p. 241–249, 2004.

BRANCO, A. T.; BERNABÉ, R. B.; FERREIRA, B. S.; OLIVEIRA, M. V. V.; GARCIA, A. B.; SOUZA-FILHO, G. A. Expression and purification recombinant SALT lectin from rice (*Oryza sativa* L.). **Protein expression & Purification**, 33, 34-38, 2004.

CARVALHO, J. C. T.; TEXEIRA, J. R. M.; SOUZA, P. J. C.; BASTOS, J. K.; DOS SANTOS FILHO, D.; SARTI, S.J. Preliminary studies of analgasic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v.53, p. 175 -178, 1996.

CHROMY, B.A., PERKINS, J., HEIDBRINK, J.L., GONZALES, A.D., MURPHY, G.A., FITCH, J.P., McCUTCHEN-MALONEY, S.L. Proteomic characterization of host response to *Yersinia pestis* and near neighbors . **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 320, n. 2, p. 474-479, 2004.

CHUMKHUNTHOD, P., RODTONG, S., LAMBERT, S.J., FORDHAM-SKELTON, A.P., RIZKALLAH, P.J., WILKINSON, M.C., REYNOLDS, C.D. 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.

CHUNG, J.J.; RATNAPALA, L.A.; COOKE, I.M.; YANAYIHARA, A. A. Partial purification and characterization of a hemolysin (CAH1) from Hawaiian box jellyfish (*Carybdea alata*) venom. **Toxicon** 39, 981-990, 2001.

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

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

CRONEY, J. C.; JAMESON, D. M.; LEARMONTH, R. P. Fluorescence spectroscopy in biochemistry: teaching basic principles with visual demonstrations. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 29, p. 60-65, 2001.

DAVIES, H.; DICKS, E.; STEPHENS, P.; COX, C.; TEAGUE, J.; GREENMAN, C.; BIGNELL, G.; O'MEARA, S.; EDKINS, S.; PARKER, A.; STEVENS, C.; MENZIES, A.; BLOW, M.; BOTTOMLEY, B.; DRONSFIELD, M.; FUTREAL, P. A.; STRATTON, M. R.; WOOSTER, R. High throughput DNA sequence variant detection by conformation sensitive capillary electrophoresis and automated peak comparison. **Genomics**, Article in Press, Corrected Proof, 2006.

ELIFIO, S.L., DA SILVA, M.C.C., IACOMINI, M. *et al.* A lectin from the lichenized basidiomycete *Dictyonema glabratum*. **New Phytology**, v. 148, n. 2, p. 327-334, 2000.

FARRUGGIA, G.; IOTTI, S.; PRODI, L.; MONTALTI, M.; ZACCHERONI, N.; SAVAGE, P. B.; TRAPANI, V.; SALE, P.; WOLF, F. I. 8-Hydroxyquinoline Derivatives as Fluorescent Sensors for Magnesium in Living Cells. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, p. 344-350, 2006.

FETON-NAVARRO, B.; ARREGUÍN-L, B.; GARCÁ-HERNÁNDEZ, E.; HEIMER, E. AGUILAR, M. B.; RODRÍGUEZ-A, C.; ARREGUÍN-ESPINOSA, R. Purification and structural characterization of lectins from the cnidarian *Bunodeopsis antillienis*. **Toxicon**, v. 43, p. 525 - 532, 2003.

FREIRE, M. G.; GOMES, V. M.; CORSINI, R. E.; MACHADO, O. L. T.; DE SIMONI, S. G.; NOVELLO, J. C.; MARANGONI, S.; MACEDO, M. L. R. Isolation and partial characterization of a novel lectin from *Talisia esculenta* seeds that interferes with fungal growth. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, p. 61 - 68, 2002.

GABOR, F., BOGNER, E., WEISSENBOECK, A., WIRTH, M. The lectin–cell interaction and its implications to intestinal lectin-mediated drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 4, 3, p. 459-480, 2004.

GABOR, F.; KLAUSEGGER, V.; WIRTH, M. Antibacterial and molluscicidal activities of the essential oil of *Crhrysanthemum viscidhirtum*. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 221, p. 35 - 47, 2001.

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

GAIDAMASHVILI, M., STANDEN, J.V. Prostaglandin inhibitory activity by lectin-like proteins from South African medicinal plants. **South African Journal of Botany**, v. 72, p. 661–663, 2006.

GE, X.; TOLOSA, L.; RAO, G. Dual-labeled glucose binding protein for ratiometric measurement of glucose. **Analytical Chemistry**, v. 76, p. 1403-1410, 2004.

GERLACH, D., SCHLOTT, B., ZAHRINGER, U., SCHMIDT, K-H. N-acetyl-D-galactosamina/N-acetyl-D-glucosamine – Recognize Lectins from the Snail *Cepaea hortensi*: purification, cloning anda expression in *E. coli*. *Immunology and Medical Microbiology*, 43, 223-232, 2005.

GHOSH, S.; MANJUMDER, M.; MANJUMDER, S.; GANGULY, N.; CHATTERJEE, B.P. Saracin: A lectin from *Saraca indica* seeds integument induces apoptosis in human t-lymphocytes. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 371, 163-68, 1999.

GÖRG, A., OBERMAIER, C., BOGUTH, G., HARDER, A., WILDGRUBER, R., WEISS, W. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. **Electrophoresis**, v. 21, p. 1037-1053, 2000.

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

GUPTA, N., SRIVASTAVA, P.S. Purification and characterization of a lectin from seeds and cotyledonary callus of *Zizyphus maurutiana*. **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 552-556, 1998.

HELMHOLZ, H., CARTELLIERI, S., HE, L., THIESEN, P., NIEMEYER, B. Process Development in Affinity Separation of Glycoconjugates with Lectins as Ligands. **Journal of Chromatography**, 1006, 127-135, 2003.

HERBERT, B.R. Advances in protein solubilisation for two-dimensional electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 20, p. 660-663, 1999.

HERBERT, B.R., HARRY, J.L., PACKER, N.H., GOOLEY, A.A., PENDERSEN, S.K., WILLIAMS, K.L. What place for polyacrylamide in proteomics? **Trends in Biotechnology**, v. 19 (Supplement), p.3-9, 2001.

HEU, M. S.; KIM, H. R.; PYEUN, J. H. Comparison of trypsin and chymotrypsin from the viscera of anchovy, *Engraulis japonica*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 112 (B), n. 3, p. 557 - 567, 1995.

JIE-SUN, LEI-WANG, BAOJIE-WANG, ZHENYU-GUO, MEI-LIU, KEYONG-JIANG, ZUOYONG-LUO. Purification and characterisation of a natural Lectin from the serum of the shrimp *Litopenaeus vannamei*, **Fish & Shellfish Immunology**, 2006.

JIMBO, M.; YANOHARA, T.; KOIKE, K.; SAKAI, R.; MURAMOTO, K.; KAMIYA, H. The D-galactose-binding lectin of the octocoral *Sinularia lochmodes*: characterization and possible relationship to the symbiotic dinoflagellates. **Comparative Biochemistry and Physiology**. V. 125 (B), p. 227 - 236, 2000.

KABIR, S.; DAAR, A.S. The composition and properties of jacalin, a lectin of diverse applications obtained from the jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seed. **Immunological Investigation** 23, 167-188, 1994.

KARASAKI, Y. TSUKAMOTO; S. MIZUSAKI; K. SUGIURA; T. GOTOH, S. A garlic lectin exerted an antitumor activity and induced apoptosis in human tumor cells. **Food Research international**, v..34, p. 7 - 13, 2001.

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

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

KONOZY, E.H.E.; BERNARDES, E.S.; ROSA, C.; FACA, V.; LEWIS JOEL GREENE, L.J.; WARD, R.J.W. Isolation, purification, and physicochemical characterization of a D-galactose-binding lectin from seeds of *Erythrina speciosa*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 410, p. 222-229, 2003.

KUSUI, K.; YAMAMOTO, K.; KONAMI, Y.; OSAWA, T. cDNA cloning and expression of *Bauhinia purpurea* lectin. **Journal of Biochemistry** **109**, 899-903, 1991.

LEITE, Y.F.M.M., SILVA, L.M.C.M., AMORIM, R.C.N., FREIRE, E.A., JORGE, D.M.M., GRANGEIRO, T.B., BENEVIDES, N.M.B. Purification of a lectin from the marine red alga *Gracilaria ornate* and its effect on the development of the cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1724, p. 137 – 145, 2005.

LEWIS, G. P. *Legumes of Bahia*, Royal Botanic Garden, Kew, Inglaterra: p. 369, 1987.

LIMA, E. C.; CURY, A. E.; FISCHMAN, O. G.; GIESHRECHT, A. M.; PAULO, O.G. Atividade antifungica de extratos de plantas medicinais sobre *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton* isolados de pacientes com dermatofitoses. **13th Brazilian Symposium in Medicinal Plants. Ceara, Brazil**, 1994.

LIS, H.; SHARON,N. Biological properties of lectins. In: **The Lectins: Properties, Funtions and Aplications in Biology and Medicine**. London: Academic Press, p. 265-285, 1986.

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

MO, H.; VAN DAMME, E. J. M. ; PEUMANS, W. J. ; GOLDSTEIN, I. J. Purification and characterization of a monnose-specific lectin from shallot (*Allium ascalonicum*) bulbs. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 306, n. 2, p. 431-438, 1993.

MOREIRA, R.A., CASTELO-BRANCO, C.C., MONTEIRO, A.C.O., TAVARES,R.O., BELTRAMINI, L.M. Isolation and characterization of a lectin from *Artocarpus incisa* L. seeds. **Phytochemistry**, v.47, p. 1183-1188, 1998.

NAEEN, A.; KHAN,R. H.; VIKRAM, H. AKIF, M. Purification of *Cajanus cajan* root lectin and its interaction with rhizobial lipopolysaccharide as studied by different spectroscopic techniques. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 396, n 1, p. 99-105, 2001.

NAGAI, T., KAWABATA, S., SHISHIKURA, F., SUGITA, H. Purification, characterization and amino acid sequence of a embryonic lectin in perivitelline fluid of the horseshoe crab. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 37672-78, 1999.

NAKAMURA E. LS.; KUROSAKI, F.; ARISAWA, M.; MUKAINAKA, T.; TAKAYASU, J.; OKUDA M.; TOKUDA, H. NISHINO, H. PASTORE JR, F. Cancer chemopreventive effects of constituents of *Caesalpinia ferrea* and related compounds. **Cancer Letters**, v.177, p. 119 - 124, 2002.

NEVES, V.A.; LOURENÇO, E.J.; SILVA, M.A. Effect of lentil tannins on albumin hydrolysis by trypsin. **Ciências e Tecnologia dos Alimentos**, v. 17, n.3, p. 208-212, 1997.

NG, K.K.S., DRICKAMER, K., WEIS,I. Structural analysis of monosaccharides recognition by rat liver mannose-binding protein. **Journal Biological Chemistry**, v. 271, p. 663 - 667, 1996.

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 Research Communications**, v. 314, p. 988-993, 2004.

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

OLIVEIRA, J.T.A., MELO, V.M.M., CÂMARA, M.F.L., VASCONCELOS, I.M., BELTRAMINI, L.M., MACHADO, O.L.T., GOMES, V.M., PEREIRA, S.P., FERNANDES, C.F., NUNES, E.P., CAPISTRANO, G.G.G., MONTEIRO-MOREIRA, A.C.O. Purification and physicochemical characterization of a cotyledonary lectin from *Luetzelbugia auriculate*. **Phytochemistry**, v. 61, p. 301-310, 2002.

OOI, L.S., SUN, S. S., WANG, H., OOI, V. E. New mannose-binding lectin isolated from the rhizome of *Sarsaparilla Smilax glabra* Roxb. (Liliaceae). **J Agric Food Chem.**, v. 6, p. 6091-6095, 2004.

PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. B. B. Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (amaratu bean). **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 36, p. 113. 1992.

PAJIC, I., KLJAJIC, Z., DOGOVIC, N., SLADIC, D., JURANIC, Z., GASIC, M.J. A novel lectin from sponge *Haliclona cratera*: isolations, characterization and biological activity. Comparative Biochemistry and Biological activity. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 132, 213-221, 2002.

PENNA, J. F. M. *Dicionário brasileiro de plantas medicinais*. 3. ed. Rio de Janeiro: Komos, 1946.

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

PIO CORRÊA, M. *Dicionário das plantas úteis do Brasil*. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, p. 687, 1984.

QUALTIERI, A., PERA, M.L., URSO, E., BONO, F., VALENTINO, P., SCORNAIENCHI, M.C., QUATTRONE, A. Two-dimensional gel electrophoresis of peripheral nerve proteins: Optimized sample preparation. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 159, n. 1, p. 125-133, 2007.

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

REGO, E.J.L., CARVALHO, D.D., MARANGONI, S., OLIVEIRA, B., NOVELLO, J.C. Lectins from seeds of *Crotalaria pallida* (smooth rattlebox). **Phytochemistry**, v.60, p.441-446, 2002.

RITTIDACH, W.;PAIJIT, N.; UTARABHAND, P. Purification and characterization of a lectin from the banana shrimp *Fenneropenaeus merguiensis* hemolymph. **Biochimica et Biophysica Acta**, 2006.

RODRIGUES, J.S., SANTOS-MAGALHÃES, N.S., COELHO, L.C.B.B., COUVREUR, P., PONCHEL, G., GREF, R. Novel core (polyester)-shell (polysaccharide) nanoparticles: protein loading and surface modification with lectins. **Journal of Controlled Release**, v. 92, p. 103-112, 2003.

RÜDGER H. Plant lectins-more than just tools for glycoscientists: occurrence, structure, and possible functions of plant lectins. **Acta Anatomica (Basel)**, v. 7, p. 1 - 12, 1998.

RUDIGER, H.; SIEBERT, H. C.; SOLIS, D.; JIMÉNEZ-BARBERO, J.; ROMERO, A.; VON DER LEITH, C. W.; DIAZ-MARINO, T.; GABIUS, H. J. Medicinal chemistry based on the sugar code: fundamentals of lectinology and experimental strategies with lectins as targets. **Current Medical Chemistry**, v. 7, p. 389 - 416, 2000.

SAMPAIO, A.H., ROGERS, D.J., BARWELL, C.J. A galactose-specific lectin from the red marine alga *Ptilota filicina*. **Phytochemistry**, v. 48, n. 5, p. 765-769, 1998.

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

SHARON, N.; LIS, H. The structural basis for carbohydrate recognition by lectins. The Molecular Immunology of Complex Carbohydrates-2. **Taiwan; Kuwer Academic/Plenum Publishers**, 1 - 19, 2001.

SHIBUYA, A. Childhood hypoplastic anemia with sugar chain anomaly of red cell membranes. **Pediatrics International: Official Journal of the Japan Pediatric Society**, 43, 597-604, 2001.

SIN, K. K.; CHAN, C. P.; PANG, T. H.; SEYDACK, M.; RENNEBERG, R. A highly sensitive fluorescent immunoassay based on avidin-labeled nanocrystals. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Jan, p. 1-7, 2006.

SIZOVA, D., CHARBAUT, E., DELALANDE, F., POIRIER, F., HIGH, A.A., PARKER, F., DORSSELAER, A.V., DUCHESNE, M., DIU-HERCEND, A. Proteomic analysis of brain tissue from an Alzheimer's disease mouse model by two-dimensional difference gel electrophoresis. **Neurobiology of Aging**, v. 28, n. 3, p. 357-370, 2007.

SPILATRO, S.R.; COCHRAN, G.R.; WALKER, R.E.; CABLISH, K.L.; BITTNER, C.C. Characterization of a new lectin of soybean vegetative tissues. **Plant Physiology**, 110, 825-834, 1996.

STOEVA, S., FRANZ, M., WACKER, R., KRAUSPENHAAR, R., GUTHÖHRLEIN, E., MIKHAILOV, A., BETZEL, C., VOELTER, W. Primary Structure, Isoforms, and Molecular Modeling of a Chitin-Binding Mistletoe Lectin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 392, 23-31, 2001.

SULTAN, N.A.M., KENOTH, R., SWAMY, M.J. Purification, physicochemical characterization, saccharide specificity, and chemical modification of a Gal/GalNAc specific lectin from the seeds of *Trichosanthes dioica*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 432, p. 212–221, 2004.

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

SUZUKI, T.; TAKASHI, T.; FURUKOHRI, T.; KAWAMURA, K.; NAKAUCHI, M. A calcium-dependent galactose-binding lectin from the tunicate *Polyandrocarpa misakiensis*. **J. Biol. Chem.** v. 265, p. 1274-1281, 1990.

TASUMI, S.; YANG, W-J.; USAMI, T.; TSUTSUI, S.; OHIRA, T.; KAWAZOE, I.; WILDER, M. N.; AIDA, K.; SUZUKI, Y. Characteristics and primary structure of galactin in the skin mucus of the Japanese eel, *Anguilla japonica*. **Developmental Comparative Immunology**, v. 28, p. 325 - 335, 2004.

TRIGUEROS, V., LOUGARRE, A., ALI-AHMED, D., RAHBÉ, Y., GUILLOT, J., CHAVANT, L., FOURNIER, D., PAQUEREAU, L. *Xerocomus chrysenteron* lectin: identification of a new pesticidal protein. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1621, p. 292-298, 2003.

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

UEDA, H., TACHIBANA, Y., MORIYASU, M., KAWANISHI, K. Aldose reductase inhibitors from the fruits of *Caesalpinia ferrea* Mart. **Phytomedicine**, v. 8, p. 377-381, 2001.

ULFIG, N., BOHL, J., NEUDORFER, F., REZAIE, P. Brain macrophages and microglia in human fetal hydrocephalus. **Brain & Development**, Article in Press, 2003.

VAN DAMME, E.J.M., ASTROUL, C.H., BARRE, A., ROUGE, P., PEUMANS, W.J. Cloning and characterization of a monocot mannose-binding lectin from *Crocus vernus* (family Iridaceae). **European Journal of Biochemistry**, v. 267, p. 5067-5077, 2000.

VAN DAMME, E. J. M.; BARRE, A. ; ROUGÉ, P. ; LEUVEN, F. V.; PEUMANS, W. J. The NeuAc (α -2,6)-GalNAc-binding lectin from elderberry (*Sambucus nigra*) bark type-2 ribosome-inactivating protein with an unusual specificity and structure. **European Journal of Biochemistry**, v. 235, p. 128 - 137, 1996.

VAN DAMME, E.J.M., BARRE, A., BEMER, V., ROUGÉ, P., VAN LEUVEN, F., PEUMANS, W.J. A lectin and a lectin-related protein are the two most prominent proteins in the bark of yellow (*Cladastis lutea*). **Plant Molecular Biology**, v. 29, p. 579-598, 1995.

VAN DAMME, E.J.M.; BARRE, A.; ROUGE, P.; PEUMANS, W.J. Cytoplasmic/nuclear plant lectins: a new story. **TRENDS in Plant Science**. v.9, n.10, 2004.

VASCONCELOS & OLIVEIRA. Antinutritional properties of plant lectins: a review. **Toxicon**, v.44: 385-403, 2004.

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

WEIS, W.I. e CRICKMER, K. Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. **Annual Review in Biochemistry**, v. 65, p. 441-73, 1996.

WEISS, S. Fluorescence spectroscopy of single molecules. **Science**, v. 283, p. 1676-1683, 1999.

WITITSUWANNAKU, R.; WITITSUWANNAKUL, D.; SAKULBORIRUG, C. A Lectin from the bark of the Rubber Tree (*Hevea Brasiliensis*). **Phytochemistry**, v. 47, n. 2, p.183-187, 1998.

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

YAMAGUSHI,M. JIMBO, M., SAKAI, R., MURAMOTO, K., KAMIYA, H. Purification and characterization of *Microcystis aeruginosa* (freshwater cyanobacterium) lectin. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v. 119, p. 593-597, 1998.

YAMASHITA, K., OHKURA, T., UMETSU, K., SUZUKI, T. Purification and Characterization of a Fuc 21→ 2Galβ1→ and Gal Nac β1→ Specific Lectin in Root Tubes of *Trichosanthes japonica*. **Journal Biology Chemistry**. v. 267, p. 25414-22, 1992.

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

YE, X.Y., NG, T.B. Purification and characterization of glycolactin, a novel glycoprotein from bovine milk. **Life Science**, v. 66, p. 1177-1186, 2000.

ZHONG, S.R., JIN, Y., WU, J.B., CHEN, R.Q., JIA, Y.H., WANG, W.Y., XIONG, Y.L., ZHANG,Y. Characterization and molecular cloning of dabocetin, a potent antiplatelet C-type lectin-like protein from *Daboia russellii siamensis* venom. **Toxicon**, v. 47, p. 104-112, 2006.

www.uefs.br/sitientibus

www.napie.com.br

www.aromastropicais.hpg.ig.com.br

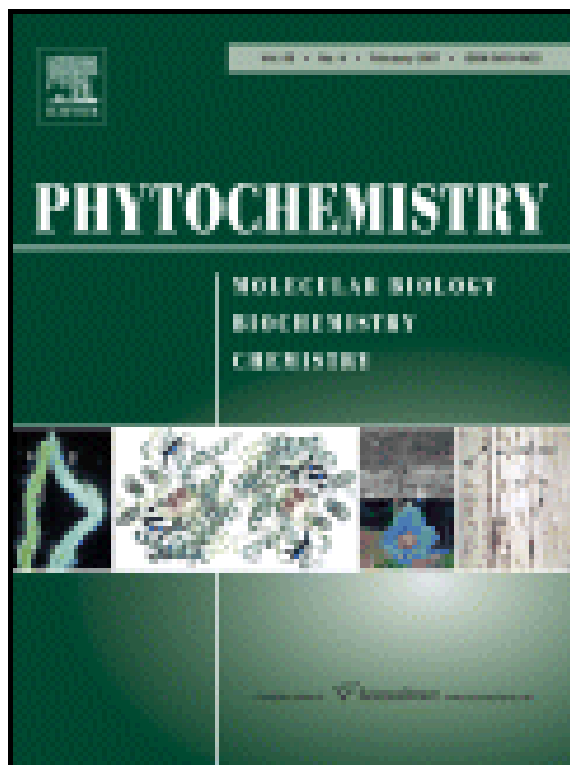
www.herbario.com.br

www.santosflora.com.br

www.vidal.fr

4 ARTIGO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO *Phytochemistry*

**PURIFICATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION
OF A LECTIN FROM *Caesalpinia ferrea* BARK**



Purification and partial characterization of a lectin from *Caesalpinia ferrea* bark

Paes-Barreto, R.S.^a, Ximenes, N.C.A.^a, Coelho, L.C.B.B.^a, Zingali, B.R.^b and
Correia, M. T. S.^{a*}

^aDepartamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, 50,670-420, Recife, Brasil. ^bInstituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Av Bauhinia 400, CCS bloco E, 42,21941-590 Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

*Corresponding author: Tel: +55-81-2126.8540; Fax: +55-81-3271.8354; E-mail address: terezacorreia@hotmail.com

Abstract

In this work the presence of a lectin was evaluated in the bark of *Caesalpinia ferrea* var. *leiostachya* Benth (CfeBL), plant with wide distribution in Brazil and known commonly as pau-ferro. *C. ferrea* bark crude extract was obtained in 0.15 M NaCl. This extract was submitted to ammonium sulphate fractionation (F 0-80%, F80) and to hemagglutinating activity (HA) with different types of erythrocytes. The fraction F80 was chromatographed in a chitin column that was washed, respectively, with 0.15 M NaCl and 1.0 M acetic acid 1 M; CfeBL was eluted with 1.0 M acetic acid. Rabbit erythrocyte were used for HA evaluation. The CfeBL HA was not altered in presence of ions nor in different pH values. CfeBL maintained its activity after heating to 100 °C, it was partially inhibited by the carbohydrate N-acetyl-D-glucosamine and the glycoproteins fetuin, rabbit serum, azocasein, casein, ovoalbumine, fetal serum, thyroglobuline and peroxidase did not inhibit CfeBL HA. CfeBL presented two bands by SDS-PAGE and the Superdex 75-30 cm system revealed two proteic picks with 19 and 15 KDa. CfeBL showed two peak of fluorescence through fluorescence spectrometer corresponding to the two proteic peaks. By bidimensional electrophoresis the estimated molecular mass was 20 and 15 KDa and the pI was 4.53 and 5.14. Growth of gram-positive or negative bacteria was not observed in CfeBL samples. A lectin, CfeBL, specific for N-acetyl-D-glucosamine, stable in different temperatures and pH variations, was obtained from *C. ferrea* bark by chitin chromatography, with potential antimicrobial activity.

Keywords: *Caesalpinia ferrea*, Lectin, Lectin Characterization, Lectin Purification.

Introduction

Lectins are proteins or glycoproteins that possess at least a carbohydrate or derivative carbohydrates (amino glycosides, alkyl glycosides etc) binding sites. They neither present catalytic activity nor immunological structural characteristics (Sharon and Lis, 2001; Jie-Sun et al., 2006) and they bind reversibly to specific mono- or oligosaccharides (Van Damme et al., 2004; Wong et al., 2006; Jie-Sun et al., 2006). The lectins are wide distributed in the nature and can be found in microorganisms (Bhowal et al., 2005), in pluricellular animals (Zhong et al., 2006) and in vegetables (Sultan et al., 2004), however, the plants are the main lectin sources for the purification of these molecules (Jie-Sun et al., 2006).

The lectins present a wide and varied area of applicability could be valuable in biotechnological processes, in the areas of research medical, biological, pharmacological and biochemistry. Due to your peculiar properties, mainly your carbohydrate specificity binding, the lectins have been powerful tools in cytochemistry and histochemistry studies (Chumkhunthod et al., 2006), for detection, isolation and structural studies of oligosaccharides and glycoconjugates, division of cells (Bonneil et al., 2004) and as molecules bioadesivas in the liberation of drugs (Gabor et al., 2001; Wong et al., 2006). The lectins can also be used to explore cellular surfaces, binding to the carbohydrate portion of glycoproteins or glycolipids that are projected in the cell (Bakalova & Ohba, 2003) and, therefore, for diagnosis in processes of development, differentiation and neoplastic transformation (Sharon and Lis, 2001; Leite et al., 2005).

Despite having the same tertiary structural fold at monomeric level, lectins exhibit considerable variation in their patterns of assembly into dimers and tetramers arising from small alterations sequence variations (Prabu et al., 1999), making these proteins also of interest to analyse the details of protein–protein interaction (Loris et al., 1998). The specific properties of proteins can only be understood once a deep knowledge of the structure-function

relationship is obtained from chemical or physical sources. One of the most active fields of research in this context has been the use of the optical properties of different chromophores to get information about protein conformations and elementary stages of their interactions (Demchenko, 1986). In particular, the aminoacid tryptophan has been the standard probe of protein structure and dynamics (Saviotti, 1974), especially due to its efficient emission properties, in fluorescence.

Caesalpinia ferrea var. *leiostachya* Benth is a plant belonging to the leguminosae family, of the Caesalpinioideae genera, and is specie economically important for having multiplicity of uses.

This work describes the extraction, purification and partial characterization of a lectin from *Caesalpinia ferrea* bark (CfeBL).

Results and Discussion

Extracts of different *C. ferrea* tissues are popularly used and they present several pharmacological activities (Penna, 1964; Pio Corrêa, 1984; Lewis, 1987). Studies with aqueous extracts of the *C. ferrea* fruit demonstrated antiinflammatory and analgesic activities, supporting like this the folkloric use of this plant in some diseases (Carvalho et al., 1996). The purification of lectins from extracts of several leguminous has been of great interest for the explanation and the knowledge of this class of proteins. The crescent interests in to isolate and to purify lectins of this plant is due to your mentioned activities in the aqueous extracts of the fruit (Carvalho et al., 1996) and to your antifungal and antitumor activities demonstrated in assays with alcoholic extracts (Lima et al., 1994; Nakamura et al., 2002).

Preliminary inhibition assay with carbohydrates indicated that N-acetyl-D-glucosamine just inhibited AH of the fraction (F80), therefore, chitin was selected as choice

support for affinity chromatography that presented two main picks. However, just the adsorbed proteins corresponded to the second pick obtained by acetic acid elution (CfeBL) presented HA (Figure 1) with a protein concentration of 0.50 mg/ml by Lowry method (Lowry et al, 1951). Elution with 0.5 M acetic acid was also used to eluted and efficiently purify the *Goderna lucidum* lectin when 135-Toyopearl support was used (Kawagishi et al., 1997). Affinity chromatography is a technique that presents advantages in relation to other conventional methods and it represented a mark in the lectins isolation allowing to obtain them purified through a minimum number of stages and with high yield (Millstone et al., 2000). This purification stage obtained a CfeBL yield of 8 mg of lectin in 7 g of *C. ferrea* bark flour. Similar result were obtained in the purification of other lectins that use chitin as affinity support, *Talisia sculenta* lectin yield 5 mg of lectin in 10 g of seeds (Freire et al., 2002) and the soybean agglutinin yield 44 mg of the pure lectin in 50 g of the seed flour (Franco- Fragas, et al., 2002).

As well as the crude extract and F80, CfeBL agglutinated rabbit and human (A, B, AB and O) erythrocytes (Figure 2). CfeBL agglutinated preferentially rabbit erythrocytes and the human blood types AB and O. Several lectins demonstrate a preference in agglutinating one more type of human or of a certain animal erythrocytes as the *Sphenostyler stenocarpa* lectin that demonstrated high agglutination of the human blood type O (Machuka et al., 1999), the *Hevea brasiliensis* lectin that preferentially agglutinated rabbit erythrocytes (Wititsuwannaku et al., 1998) and *T. esculenta* lectin, that demonstrated preference for the human blood type AB (Freire et al., 2002). The HA of CfeBL was only inhibited by N-acetyl-D-glucosamine (Figure 3), none of the tested glycoproteins inhibited the activity of CfeBL, similar result was obtained for the lectin from *Bauhinia monandra* leaf (Coelho and Silva, 2000)

The HA of CfeBL was unaffected by pH variation from 2.0 to 11.0 (Figure 4) and it was not shown dependent of ions Mg^{++} and Ca^{++} (Figure 5) and staying activate after 30 minutes to 100 °C, demonstrating the stability of the pure lectin. Differently from CfeBL, the *T. escunlenta* lectin was stimulated by the ion Ca^{++} (Freire et al., 2002) but the isolectin 1 of the lectin from *Cratylia mollis* seeds (Cramoll 1) did not show ion dependence and stayed active after heating by 80 °C for 30 minutes or after stock for at least 10 years (Correia and Coelho, 1995). Ngai and Ng (2004) demonstrated that the lectin of *Gonoderma capense* was unaffected after incubation to 100 °C for 60 minutes and the activity was only lost when the time of incubation was of 150 minutes.

When CfeBL was chromatographed on a Superdex 75 column two peaks of proteins were obtained, with 19 and 15 KDa (Figure 6), respectively; the fluorimetric analysis showed two proteic peaks with fluorescence, correspondent to the two peaks obtained at 280 nm (Figure 6 and 7). By SDS-PAGE under denaturated and reduced conditions CfeBL showed two proteic bands with relative molecular mass of 14 and 20 KDa (Figure 8). Similar results were obtained for the *Grifola frondosa* lectin (Kawagishi, 2001). The gels obtained after the second dimension of the bidimensional electrophoresis demonstrated the presence of two small spots with isoelectric points (pI) of 4.53 and 5.14 and with molecular masses of 20.28 KDa and 15.54 KDa, respectively (Figure 9).

The ability of plant agglutinins to bind human bacteria and inhibit their motility and/or growth has not been related to their physiological activities. Nevertheless, the fact that agglutinins were mostly isolated from storage parts of plants, also, suggests their possible contribution to plant defense mechanisms (Gaidamashivili and Staden, 2002). Characterized antifungal lectins like hevein from *Hevea brasiliensis* (4.7 kDa), *Urtica dioica* lectin (8.5 kDa) and *Gastrodia elata* lectin (10 kDa) are small proteins (Parijs et al., 1991; Parijs et al., 1992; Xu et al., 1998). Chrispeels and Raikhel (1991) suggested that these small chitin-

binding proteins cross-linked chitin preventing cell expansion at the tip of the growing hyphae of fungi. This binding could slow down the hyphae growth as the first line of an integrated defense mechanism. Growth of gram-positive or negative bacteria was not observed in CfeBL samples, showed its potential antimicrobial activity.

In this paper, a thermostable *C. ferrea* bark lectin (CfeBL) that recognized chitin was purified in milligram quantities by one reproducible affinity chromatographic step using a cheap eluent solution (acetic acid) with high protein yield.

Experimental

Collected material

The *C. ferrea* bark was collected in the city of Recife, state of Pernambuco, northeast of Brazil.

Isolation and Partial purification of C. ferrea bark extract

C. ferrea bark was washed with distilled water, dry at room temperature and triturated to powder in a multiprocessor. With the triturated material a suspension was made to 10% (p/v) in 0.15 M NaCl that was submitted to a moderate shaking by 16 h at 4 °C. The extract was filtered in a gauze, centrifuged (10.000 x g) for 15 minutes and the supernatant carefully retired (crude extract), that was stored at -20 °C.

The crude extract was submitted to a 80% ammonium sulphate fractionation (F80) by adding the salt and submitted to agitation (4 h) at room temperature (25 °C). After centrifugation the precipitate obtained was resuspended with 0.15 M NaCl and dialysed with distilled water followed 0.15 M NaCl.

Hemagglutinating activity and inhibition assays

Sample of human erythrocytes (A, B, AB and O) and rabbit erythrocytes were obtained as described by Bukantz et al. (1946), and treated with glutaraldehyde according to Bing et al. (1967). The hemagglutinating activity (HA) was evaluated in 96-well microtiter plates and at each well 50 μ l of 0.15 M NaCl was added, soon after, 50 μ l of sample were placed in the second well of a horizontal array, being proceeded successive dilutions. After this procedure 50 μ l of treated erythrocytes were added and HA was defined according to Correia and Coelho (1995). The HA corresponded to the last sample dilution showing HA different from the control, and the specific HA (SHA) corresponded to the HA divided by the protein concentration. The protein concentration was accomplished in agreement with the method of Lowry et al. (1951). Inhibition AH assays were accomplished using the carbohydrates (glucose, mannose, galactose, fucose, N-acetyl-D-glucosamine, sucrose and lactose) and the glycoproteins (fetuín, rabbit serum, azocasein, casein, ovoalbumine, fetal serum, thyroglobuline, peroxidase) as described by Coelho and Silva (2000).

Lectin purification

A sample of F80 (10 mg/1 ml) was applied on a chitin column (5.0 x 1.5 cm) with a flow rate of 20 ml/h. Proteins of each fraction (2 ml) were measured by absorbance at 280 nm. Unbound proteins were washed with 0.15 M NaCl and adsorbed proteins were eluted with 1.0 M acetic acid. Fractions with high activity, eluted with acetic acid were bulked, dialyzed with 0.15 M NaCl (CfePL) and stored at -20 °C.

Effect of pH, temperature and metal ions on hemagglutinating activity

The effects of pH and temperature on HA were evaluated by incubating CfeBL samples (1 ml) at different pH values (2 – 11) for 1 h at room temperature (25 °C) or at 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 and 100 °C for 30 minutes. The effect of Mg^{2+} and Ca^{2+} was performed with incubation (15 minutes) of a solution (1 ml) containing either metal ions $CaCl_2$ and $MgCl_2$ (5, 10 and 20 mM) in 0.15 M NaCl and CfeBL preparation without previous demetallization. An aliquot (50 μ l) of the mixture was distributed in microtiter plate 96-well and the HA was proceeded.

Polyacrylamide gel electrophoresis

SDS-PAGE was performed in polyacrylamide 12.5% (p/v) with 0.1% (p/v) of SDS in agreement with the method of Laemmli (1970). The molecular weight of the purified lectin was defined using proteins standard marker, electrophoresis marker LMW-SDS (Armershan - Pharmacia Biotech) that consists of phosphorylase b (97 KDa), bovine serum albumin (66 KDa), ovoalbumine (45 KDa), carbonic anhydrase (30 KDa), trypsin (20.1 KDa) and D-lactoalbumina (14.4 KDa). After the electrophoresis the gel was stained with 0.02% (w/v) Coomassie Brilliant Blue in 10% (v/v) acetic acid, for 16 h.

The preparation of proteic samples to be separate by bidimensional (2D) electrophoresis is one of the steps that can influence, in decisive way, the final results. In order to get a compatible sample with the 2D electrophoresis the sample of CfeBL (100 μ g) was liophylised, concentrated and resuspended in 100 μ l of Milli-Q plus water. The process of precipitation of CfeBL was accomplished through the protocol of Clean-up 2-D, developed by Amersham-Biosciences. To proceed the isoelectric focalization the lectin sample was

previously solubilized in denatured non-ionic solution, that allows the separation of the proteins conforms your pI. This solution is composed by 9 M of urea (to denature the protein), 15 mM of Dithiotreitol (DTT, an agent reducer to avoid protein oxidations), Triton X-100 (non-ionic detergent to solubilize protein) and 0,5% of ampholites (Pharmalytes 3-10 of Amersham-Biosciences to facilitate the isoelectric focalization). After the sample solubilization, the separation was proceeded in the 2D electrophoresis first dimension using the IPGphor system. Ribbons of IPG (immobilized pH gel) obtained commercially in the dehydrated form with strip (7 cm) of pH range 4.0 to the 7.0. The strip was placed in sarcomeres with the surface of the gel turned down and, soon after, 2 ml of mineral oil (Drystrip Cover Fluid) were applied to avoid the urea crystallization. The necessary time for the ribbon rehydratations is of, at least, 10 hours and it should be accomplished at room temperature (Berkelman and Stensted, 1998). The rehydrated ribbon was equilibrated for twice (15 minutes each) before running the second dimension (SDS-PAGE). The first equilibrate was made with 1% DTT and the second with 2.5% iodoacetamide. Later to that treatment the ribbon was applied in the top of a 12.5% SDS-PAGE and sealed with agarose gel for the accomplishment of the second dimension electrophoresis, through which each polypeptide chain migrates in function of your molecular mass. Once finished the second dimension, the 2D electrophoresis separate proteins were visualized through colloidal Coomassie (G-250) stained protocol.

Fluorescence spectroscopy

The fluorescence, typically, happens in aromatic molecules that present groups denominated fluorophorus fluorescent. The fluorophorus are divided in two general classes: intrinsic (when they happen naturally) and extrinsic (those that are added a sample to obtain

the wanted ghastly property). The amino acids that contribute to the protein fluorescence are tryptophan, tyrosine and phenylalanine. The tryptophan dominates the spectrum, because your quantum yield is very superior to the tyrosine and of the phenylalanine, mainly in proteins.

A CfeBL sample (2 ml) of was excited by radiation of short wavelength and the absorption of the sample fluorimetric measurement was in long wavelengths.

References

- Bakalova, R.; Ohba, H. , 2003. Purification of normal lymphocytes from leukemic T-cells by lectin-affinity adsorbents- correlation with lectin-cell binding. *Cancer Letters*, 192, 59 - 65.
- Berkelman, T., Stensted, T., 1998. 2-D electrophoresis using immobilized pH gradients: principles and methods. Edition AC, Amersham Biosciences Inc., 80, 6429-60.
- Bhowal, J., Guha, A.K., Chatterjee, B.P. , 2005. Purification and molecular characterization of a sialic acid specific lectin from the phytopathogenic fungus *Macrophomina phaseolina*. *Carbohydrate Research*, 340, 1973-1982.
- Bonneil, E.,Young, N.M., Lis, H., Sharon, N.,Thibault, P. , 2004. Probing genetic variation and glycoform distribution in lectins of the *Erythrina* genus by mass spectrometry. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 426, 241–249.
- Carvalho, J. C. T., Texeira, J. R. M., Souza, P. J. C., Bastos, J. K., Dos Santos Filho, D., Sarti, S.J., 1996. Preliminary studies of analgasic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 53, 175 -178.

- Chumkhunthod, P., Rodtong, S., Lambert, S.J., Fordham-Skelton, A.P., Rizkallah, P.J., Wilkinson, M.C., Reynolds, C.D., 2006. Purification and characterization of an N-acetyl-D-galactosamine-specific lectin from the edible mushroom *Schizophyllum commune*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1760, 326–332.
- Correia, M.T.S., Coelho, L. C. B. B., 1995. Purification of glucose/ mannose specific lectin, Isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart (camaratu bean). *Applied Biochemistry and Biotechnonology*, 55, 261 - 273.
- Coelho, L.C.B.B., Silva, M. B. R., 2000. Simple method to purify milligram quantities of the galactose – specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*. *Phytochemical Analysis*, 11, 295 – 300.
- Demchenko, A.P., 1986. *Ultraviolet Spectroscopy of Proteins*, Springer-Verlag, Berlin.
- Franco-Fragas, L., Plá, A., Ferreira, F., Massaldi, H., Suárez, N., Batista-Vieira, F., 2002. Preparative purification of soybean agglutinin by affinity chromatography and its immobilization for polysaccharide isolation. *Journal of Chromatography A*, 1.
- Freire, M. G., Gomes, V. M., Corsini, R. E., Machado, O. L. T., De Simoni, S. G., Novello, J. C., Marangoni, S., Macedo, M. L. R., 2002. Isolation and partial characterization of a novel lectin from *Talisia esculenta* seeds that interferes with fungal growth. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40, 61 - 68.
- Gabor, F.; Klausegger, V.; Wirth, M. ., 2001. Antibacterial and molluscicidal activities of the essential oil of *Crhrysanthemum viscidhirtum*. *International Journal of Pharmaceutics*. 221, 35– 47.
- Gaidamashvili, M., Standen J. V., 2002. Interactin of lectin-like proteins of South African medicinal plants with *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*. *Journal of Ethnopharmacology*, 80, 131 - 135.

- Jie-Sun, Lei-Wang, Baojie-Wang, Zhenyu-Guo, Mei-Liu, Keyong-Jiang, Zuoyong-Luo., 2006. Purification and characterisation of a natural Lectin from the serum of the shrimp *Litopenaeus vannamei*, Fish & Shellfish Immunology.
- Kawagishi, H., Mitsunaga, SI., Yamawaki,M., Ido, M., Shimai, A., Kinoshita, T., Murata, T., Usui, T., Kimura, A., Chiba, S., 1997. A lectin from mycelia of fungus *Ganoderma lucidum*. Phytochemistry, 44, 7-10.
- Kawagishi, H.; Takagi, J.I.; Taira, T.; Murata, T.; Usu, T., 2001. Purification and characterization of a lectin from the mushroom *Mycoleptodonoides aitchisonii*. Phytochemistry, 56, 53±58.
- Leite, Y.F.M.M., Silva, L.M.C.M., Amorim, R.C.N., Freire, E.A., Jorge, D.M.M., Grangeiro, T.B., Benevides, N.M.B., 2005. Purification of a lectin from the marine red alga *Gracilaria ornate* and its effect on the development of the cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). Biochimica et Biophysica Acta, 1724, 137 – 145.
- Lewis, G. P., 1987. Legumes of Bahia, Royal Botanic Garden, Kew, Inglaterra: 369.
- Lima, E. C., Cury, A. E., Fischman, O. G., Gieshrecht, A. M., Paulo, O.G., 1994. Atividade antifungica de extratos de plantas medicinais sobre *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton* isolados de pacientes com dermatofitoses. 13th Brazilian Symposium in Medicinal Plants. Ceara, Brazil.
- Loris, R., Hamelryck, P., Bouckaert, J., Wyns, L., 1998. Legume lectin structure, Biochim. Biophys. Acta, 1383, 9-36.
- Machuka, J. S., Okeola, O.G., Els, J. M. V. D., Chrispeels, M. J., Leuven, F. V., Peumans, W. J., 1999. Isolation and partial characterization of galactose-specific lectins from African yam beans, *Sphenostyles stenocarpa* Harms. Phytochemistry, 51, 721 -728.

- Millstone, E., Lang, T., Naska, A., Eames, M., Barling, D., Zwanenberg, P.V., Trichopoulou, A., 2000. European Policy on Food Safety': Comments and suggestions on the White Paper on Food Safety. *Trends in Food Science & Technology*, 11, 458-466.
- Nakamura E. LS.; Kurosaki, F.; Arisawa, M.; Mukainaka, T.; Takayasu, J.; Okuda M.; Tokuda, H. Nishino, H. Pastore JR, F., 2002. Cancer chemopreventive effects of constituents of *Caesalpinia ferrea* and related compounds. *Cancer Letters*, 177, 119 – 124.
- Parijs, J. V., Broekaert, W. F., Goldstein, I. J., Peumans, W. J., 1991. Hevein: An anti-fungal protein from rubber-tree (*Havea brasiliensis*) latex, *Planta*, 183, 258 – 262.
- Parijs, J. V., Broekaert, W. F, Peumans, W. J., Geuns, J. M., Laere A. J. V., 1992. Effect of the lectin UDA (*Urtica dioica agglutinin*) on germination and cell wall formation of *Phycomyces blakesleeanus* Burgeff, *Archives of Microbiology*, 158, 19 – 25.
- Penna, J. F. M., 1964. *Dicionário brasileiro de plantas medicinais*. 3. ed. Rio de Janeiro: Komos.
- Pio Corrêa, M., 1984. *Dicionário das plantas úteis do Brasil*. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 687.
- Prabu, Suguma, K., Vijayan, M., 1999. Variability in quaternary association of proteins with the same tertiary fold: a case study and rationalization involving legume lectins, *Proteins: Structure, Function, and Genetics* 35, 58-69.
- Saviotti, L.C., Galley, W.C., 1974. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 71, 4154.
- Sharon, N., Lis, H., 2001. The structural basis for carbohydrate recognition by lectins. *The Molecular Immunology of Complex Carbohydrates-2*. Taiwan; Kuwer Academic Plenum Publishers, 1 - 19.
- Sultan, N.A.M., Kenoth, R., Swamy, M.J., 2004. Purification, physicochemical characterization, saccharide specificity, and chemical modification of a Gal/GalNAc specific lectin from

- the seeds of *Trichosanthes dioica*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 432, 212–221.
- Van Damme, E.J.M.; Barre, A.; Rouge, P.; Peumans, W.J., 2004. Cytoplasmic/nuclear plant lectins: a new story. TRENDS in Plant Science, 9, 10.
- Wititsuwannakul, R., Wititsuwannakul, D. and Skulborirug, C., 1998. Lectin from the bark of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*). Phytochemistry, 2 (47), 183-187.
- Wong, J.H.; Wong, C.C.T.; Ng, T.B., 2006. Purification and characterization of a galactose-specific lectin with mitogenic activity from pinto beans. Biochimica et Biophysica Acta, 1760, 808–813.
- Xu, Q., Liu, Y., Wang, X., Gu, H., Chen, Z., 1998. Purification and characterization of a novel anti-fungal protein from *Gastrodia elata*, Plant Physiology and Biochemistry, 36, 889 – 905.
- Zhong, S.R., Jin, Y., Wu, J.B., Chen, R.Q., Jia, Y.H., Wang, W.Y., Xiong, Y.L., Zhang, Y., 2006. Characterization and molecular cloning of dabocetin, a potent antiplatelet C-type lectin-like protein from *Daboia russellii siamensis* venom. Toxicon, 47, 104-112.

List of captions

Figure 1 - Elution pattern of F80 on a chitin column

A sample (10 mg of protein) was applied at flow rate of 20 ml/h and 2 ml fractions were collected. Arrows indicated elution with 0.15 M NaCl (1), followed by 1 M acetic acid (2).

Figure 2 - Hemagglutinating activity of CfeBL in presence of different erythrocytes

Figure 3 - Inhibition of hemagglutinating activity of CfeBL by N-acetyl-D-glucosamine

Log HA of CfeBL in 0.15 M NaCl with rabbit erythrocytes was 2.7.

Figure 4 - Hemagglutinating activity of CfeBL in presence of pH values

Log HA of CfeBL in 0.15 M NaCl with rabbit erythrocytes was 2.7.

Figure 5 - Hemagglutinating activity of CfeBL in presence of metal ions

Log HA of CfeBL in 0.15 M NaCl with rabbit erythrocytes was 2.7.

Figure 6 - Chromatography of CfeBL on a Superdex 75 column.

A sample (2 mg of protein) was applied at flow rate of 0.6 ml/min and 3 ml fractions were collected and developed with 0.5 M NaCl.

Figure 7 - Fluorescence spectroscopy of purified CfeBL

Figure 8 - SDS-PAGE of purified CfeBL under denatured and reduced conditions

Figure 9 - Bidimensional electrophoresis of purified CfeBL

Figure 1

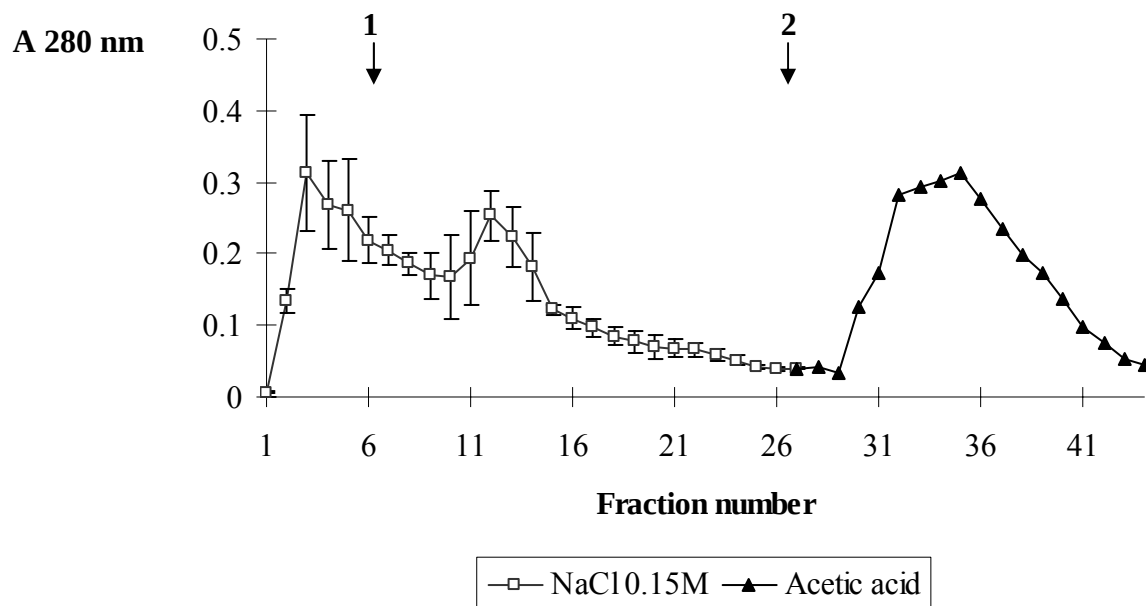


Figure 2

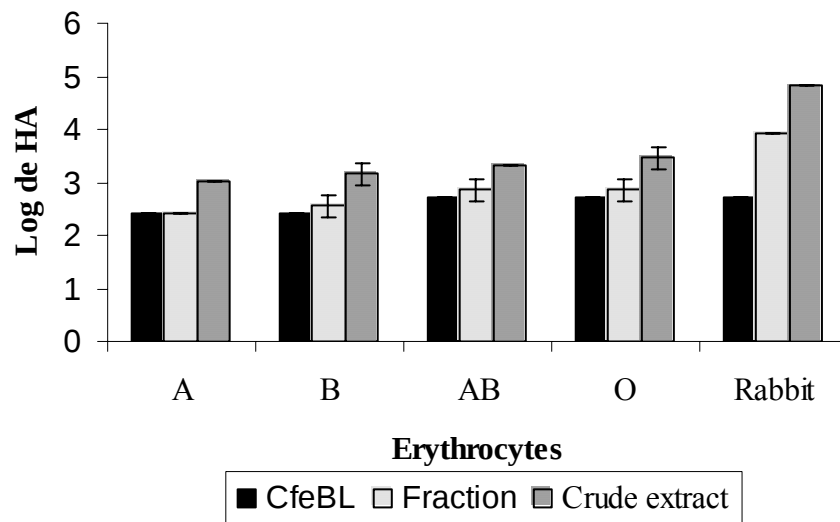


Figure 3

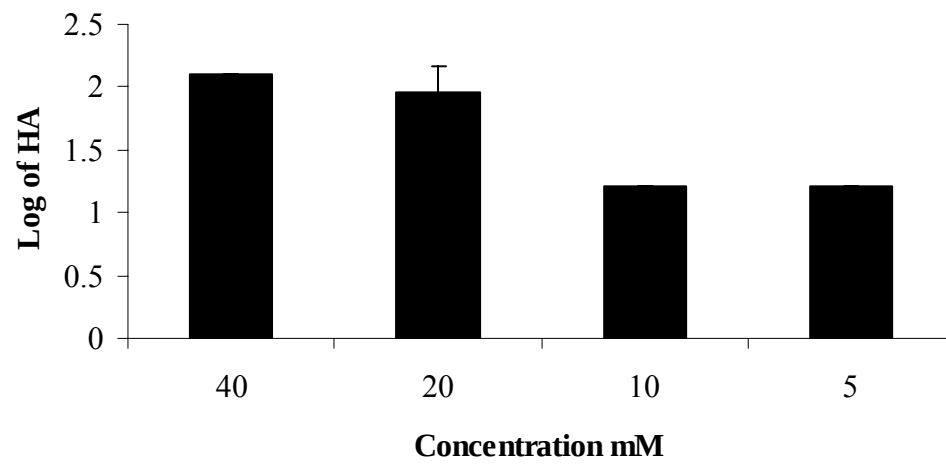


Figure 4

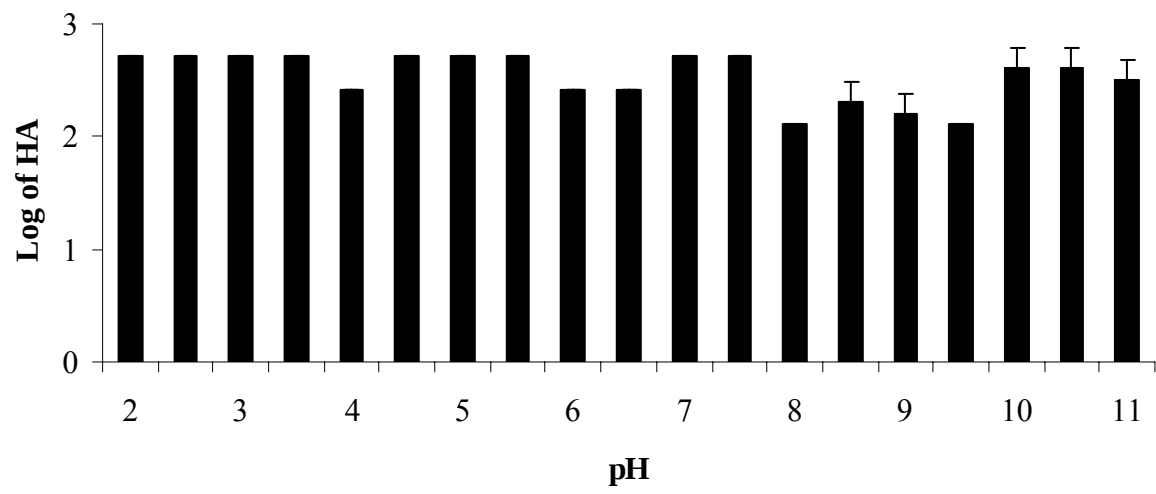


Figure 5

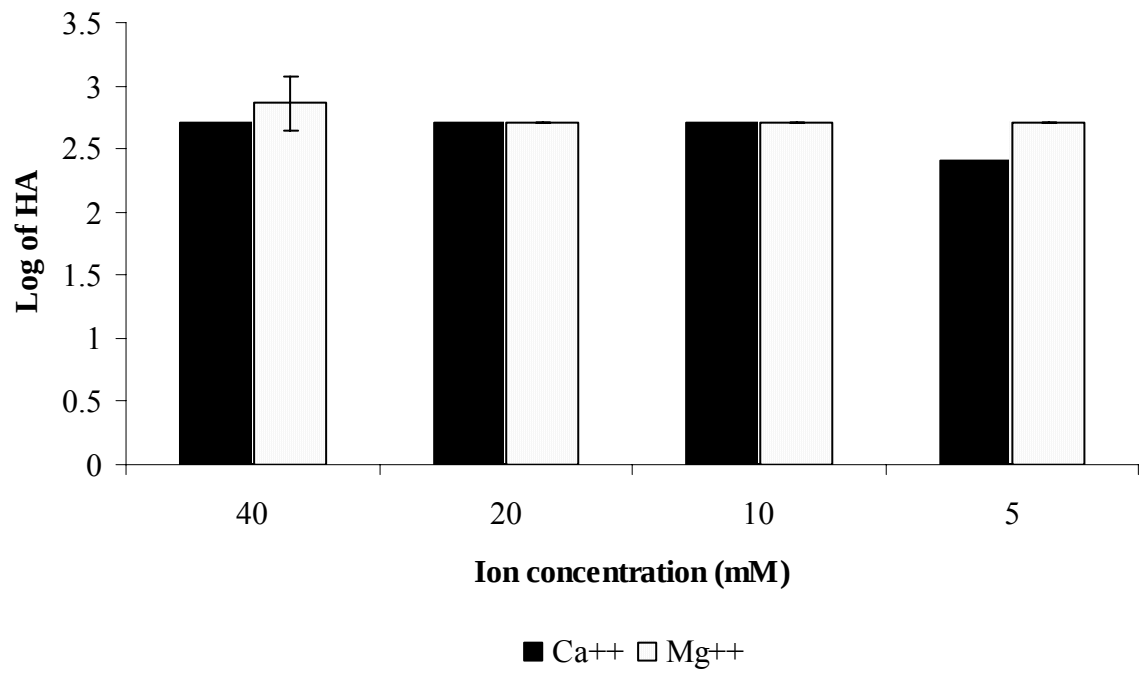


Figure 6

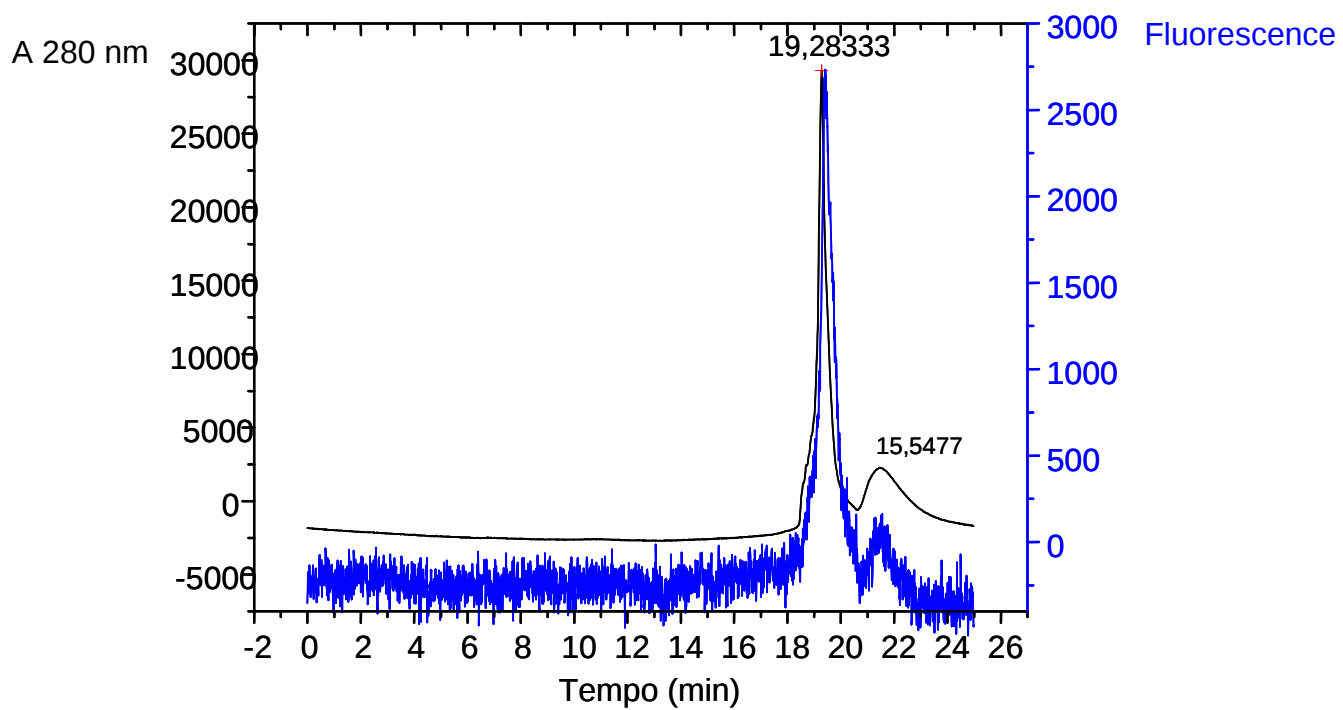


Figure 7

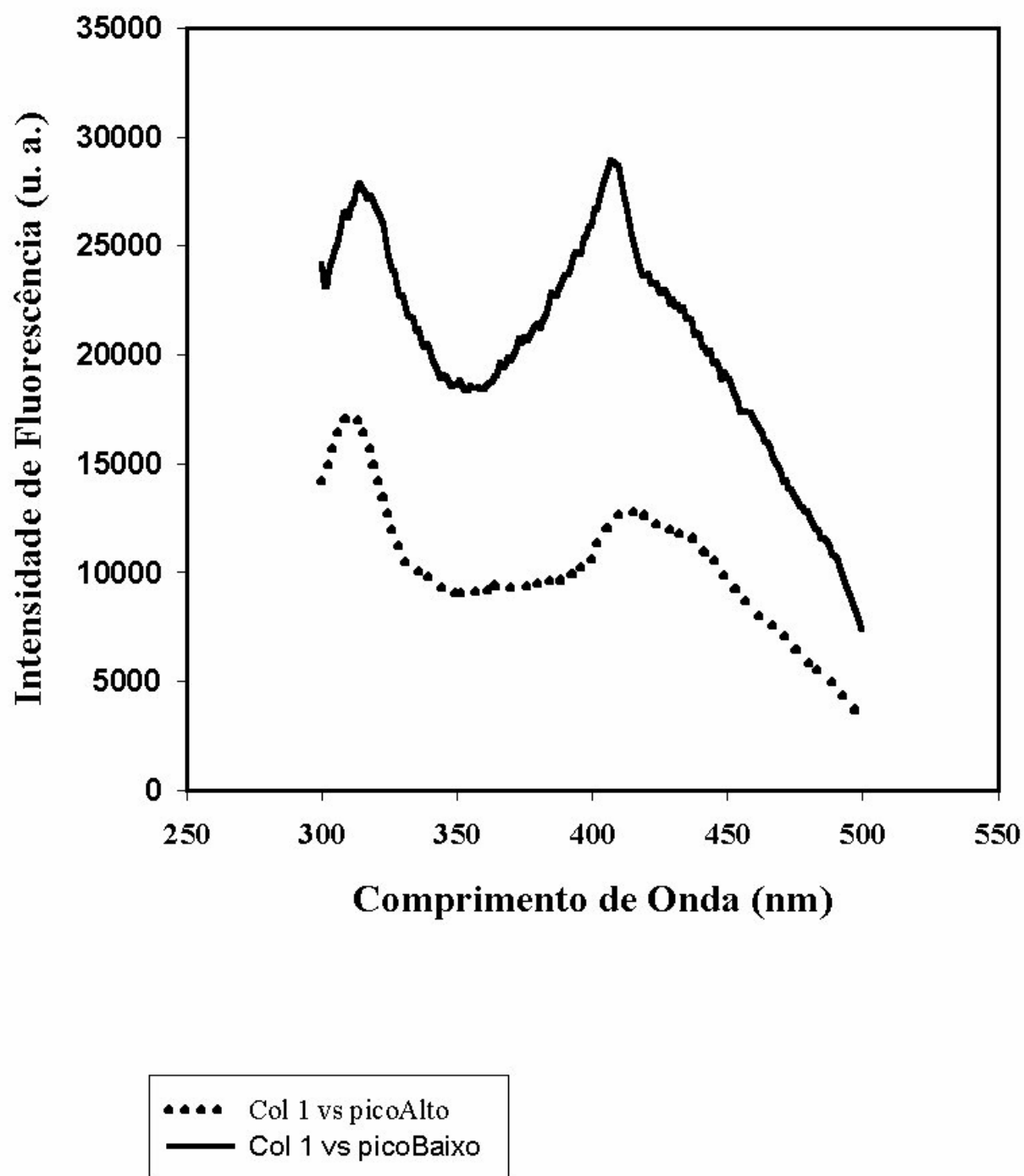
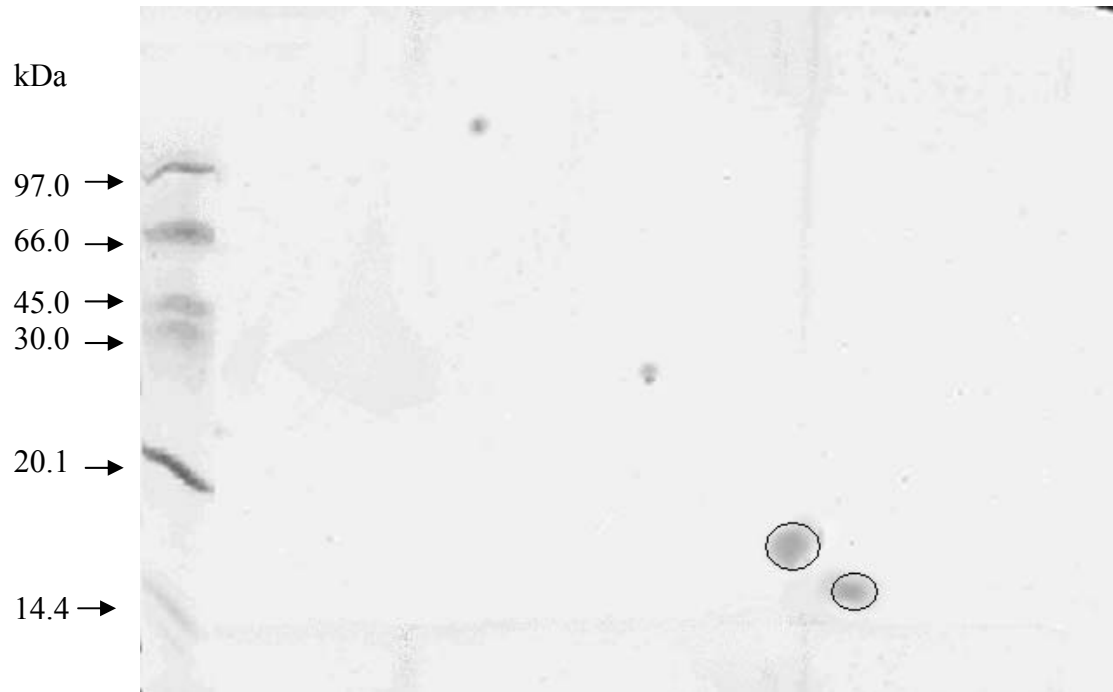


Figure 8



Figure 9



5 CONCLUSÕES

- As entrecascas de *C. ferrea* var. *leiostachya* Benth contêm uma proteína com atividade hemaglutinante (CfeBL);
- Cromatografia em coluna de quitina foi eficiente na obtenção de CfeBL com um alto rendimento em proteínas;
- CfeBL não é específica para eritrócitos humanos, apresenta elevada estabilidade térmica, não é estimulada pela presença de íons (Ca^{2+} e Mg^{2+}) e não é sensível a variações de pH;
- A atividade da lectina é parcialmente inibida pelo carboidrato N-acetilglicosamina, e não é alterada quando submetida às glicoproteínas azocaseína, tiroglobulina, ovoalbumina, caseína, peroxidase, fetuína e glicoproteínas de soros fetal e de coelho;
- CfeBL foi resolvida em dois picos protéicos de massa molecular de 19 e 15 KDa, respectivamente, por gel filtração em coluna de Superdex 75;
- Eletroforese em gel de poliacrilamida de CfeBL, em condições desnaturantes e redutoras apresenta duas banda de massas moleculares de ~ 20 e 14 KDa, similar as bandas correspondentes as duas frações obtidas na coluna de Superdex 75 ;
- Na coluna de Superdex 75 a CfeBL apresentou fluorescência em dois picos, sendo estes correspondentes aos picos de absorbância;
- CfeBL apresentou também dois picos de fluorescência na espectroscopia de fluorescência e dois "spots" na eletroforese bidimensional;

6 ANEXOS

6.1 Instruções para autores do periódico *Phytochemistry*

Guide for Authors

A PDF version of the 2004 Instructions to Authors, including all special characters.

Graphical abstract examples.

These notes are an abbreviated version of the full "Instructions to Authors" which are published in the first issue of each year. *Phytochemistry* covers research on all aspects of plant chemistry, plant biochemistry, plant molecular biology and chemical ecology. The journal is divided into the following sections: *Editorial Comment*, *Molecules of Interest*, *Review Articles*; *Protein Biochemistry*; *Molecular Genetics and Genomics*; *Metabolism*; *Ecological Biochemistry*; *Chemotaxonomy*; *Bioactive Products* and *Chemistry (including Macromolecules)*. In addition to the regular (primary) issues of the journal, there are special issues dedicated solely to *Structure Elucidation*.

Submission of Papers

Phytochemistry manuscripts can be submitted by mail (post) or online using the new electronic submission system.

Submission by mail:

Authors are requested to submit their original manuscript and figures with three other copies to the appropriate regional Editor:

UK, Africa, The Commonwealth and Rest of the World: Prof. G. P. Bolwell, School of Biological Sciences, Royal Holloway and Bedford New College, University of London, Egham Hill, Egham, Surrey TW20 OEX;

The Americas and East Asia: Professor N. G. Lewis, Institute of Biological Chemistry, Washington State University, Pullman, WA 99164-6340, USA;

Continental Europe and Russia: Professor D. Strack, Institut für Pflanzenbiochemie, Abt. Sekundärstoffwechsel, Weinberg 3, D-06120 Halle (Saale), Germany.

Authors must submit their fax number and e-mail address with their manuscript. The initial submission should consist of one original manuscript plus three other copies; after refereeing is complete and any necessary changes have been incorporated, the final (revised) copy should be furnished on floppy disk or CD with two paper copies. **The disk and the hard copy must match exactly.** Please label all disks with "Phytochemistry", your name, software, hardware used and file names with the correct extension (e.g. Fig1.cdx, tbl1-6.xls). Save text on a separate disk from the graphics, include the text and tables in one file, and provide graphics and structures in separate numbered files. 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.

Outlines for review articles should be sent directly to one of the three regional Editors listed above.

Online submission:

Manuscripts can be submitted using the online submission and review environment. Authors are required to go to the website and upload their article and its associated artwork. A PDF file is generated, and the reviewing process is carried out using that PDF. All correspondence between Editor and author is performed by e-mail. Authors are, however, legally obliged to sign and return a physical transfer of copyright form by conventional mail. In their electronic version, authors are requested to follow the guidelines for submitting disks. The submission site and full instructions can be found at <http://www.elsevier.com/locate/phytochem>. The paper should be submitted as a single file, prepared with a standard word-processor such as Microsoft Word, with embedded tables and graphics. Please note that any embedded graphics must also be submitted as separate, original files. The preferred formats for graphics files are tiff or postscript.

Types of Contributions

Full length articles; review articles; accelerated publications. Additionally, succinct papers on structure elucidation will be published in special issues.

Outlines for review articles should be sent directly to one of the three regional Editors listed above.

Manuscript Preparation

General: The manuscript is required to be written in English, with numbered pages, double-spaced, using 10 or 12 point font, and in a suitable word-processing format. Most formatting codes will be removed or replaced on processing your article. Please do not use options such as automatic word breaking, justified layout, double columns or automatic paragraph numbering (especially for numbered references). However do use bold face, italic, subscripts, superscripts etc. The corresponding author should be identified (include a Fax number and E-mail address). Full postal addresses must be given for all co-authors. Authors should consult a recent issue of the journal for style (e.g. the free online sample copy available at www.elsevier.com/locate/phytochem). An electronic copy of the paper should accompany the final version. The Editors reserve the right to adjust style to certain standards of uniformity. Authors should retain a copy of their manuscript since we cannot accept responsibility for damage or loss of papers. Original manuscripts are discarded one month after publication unless the Publisher is asked to return original material after use.

Abstracts: The abstract, distinct from the graphical abstract, should briefly describe the results obtained and conclusions reached and not the methods used or speculations on other matters. Authors must also supply a graphical abstract at the time that the paper is first submitted. The graphical abstract should summarize the content of the paper in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. The manuscript title, author(s), author(s) affiliation and address with the appropriate text and graphic should be supplied.

Text: Follow this order when typing manuscripts: Titles must be as brief as possible and should not exceed 10 words in length; Authors; Affiliations; Abstract; Keyword Index should comprise three to ten 'key words' or phrases which identify the most important subjects covered by the paper in the following order: name of plant species examined (Latin binomial), plant family, common epithet (where applicable), type of investigation, class of compound, compound(s); Main text; Acknowledgements; Appendix; References; Vitae; Figure Captions and then Tables. Do not import the Figures into your text. The corresponding author should be identified with an asterisk and footnote. All other footnotes (except for table footnotes) should be identified with superscript Arabic numbers. Within the body of the text the Introduction should give the minimum historical data needed to set the scene for the author's own investigation. Authors are advised to combine the Results and Discussion sections wherever possible and are asked to avoid undue speculation. The Discussion should not include a repetition of the results, but should indicate the conclusions reached. The Experimental should be concise and the extensive use of abbreviations is essential (see full 'Instructions to Authors').

References: All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. In the text refer to the author's name (without initials) and year of publication (e.g. "Since Peterson (1993) has shown that..." or "This is in agreement with results obtained later (Kramer, 1994)". For 2 authors, both authors are to be listed, with "and" separating the two authors. For more than two

authors, use the first author's surname followed by et al. The list of references should be arranged alphabetically by authors' names. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of authors' names and dates are exactly the same in the text as in the reference list. References should be given in the following form:

Cabello-Hurtado, F., Durst, F., Jorin, J. V., Werck-Reichhart, D. 1998. Coumarins in *Helianthus Tuberosus*: Characterization, induced accumulation and biosynthesis. *Phytochemistry* 49, 1029-1036. Mabry, T., Markham, K. R., Thomas, M. B., 1970. *The Systematic Identification of Flavonoids*. Springer Verlag, New York.

Harborne, J. B., 1999. Plant chemical ecology. In: Barton, D., Nakanishi, K., Meth-Cohn, O., (Eds.), *Comprehensive Natural Products Chemistry*, Vol. 8. Pergamon, Oxford, pp. 137-196.

Illustrations: All illustrations (including chemical structures) must be supplied camera-ready, for reproduction at single or double column width (83 mm or 176 mm, respectively). Please ensure that all illustrations within a paper are consistent in type and quality. Illustrations should be prepared with good contrast (black on a white background) and if produced by computer must be prepared at a resolution of 300 dpi or better. Photographs, charts and diagrams are all to be referred to as "Figure(s)" and should be numbered consecutively in the order to which they are referred. They should accompany the manuscript, but should not be included within the text. All illustrations must be labeled with the figure or scheme number and the corresponding author's name (either on the back if submitted on paper or with a clear file name if using online submission). All figures are to have a caption. Captions should be supplied on a separate page.

Line drawings: should be provided as carefully prepared black line drawings on a plain white background. All lettering, graph lines and points on graphs should be sufficiently large and bold to permit reproduction when the diagram has been reduced to a size suitable for inclusion in the journal. Photocopies are not suitable for reproduction. Do not use any type of shading on computer-generated illustrations.

Photographs: Original photographs must be supplied as they are to be reproduced (e.g. black and white or colour). If necessary, a scale should be marked on the photograph. Please note that photocopies of photographs are not acceptable.

Colour: Each article can have one colour page reproduced free of charge; a charge for additional colour figures will be made.

Colour on the web: Any colour figures supplied with the manuscript will be printed free-of-charge online, even if published in black & white in print.

Tables: Tables should be numbered consecutively and given a suitable caption and each table typed on a separate page. Footnotes to tables should be typed below the table and should be referred to by superscript lowercase letters. No vertical rules should be used. Tables should not duplicate results presented elsewhere in the manuscript, (e.g. in graphs).

Proofs

Proofs: One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author, to be checked for typesetting/editing. No changes in, or additions to, the accepted (and subsequently edited) manuscript will be allowed at this stage. Proofreading is solely your responsibility. A form with queries from the copyeditor may accompany your proofs. Please answer all queries and make any corrections or additions required within 48 hours of receipt.

As soon as proofs have been approved, they are published online as an "Article in Press" on the *Phytochemistry* page on ScienceDirect (www.sciencedirect.com). "Articles in Press" take full advantage of the enhanced ScienceDirect functionality, including the ability to be cited using their DOI article identifier. When the final article is assigned to an issue of the journal, the "Article in Press" version is removed and will appear in the associated journal issue.

Offprints

Twenty-five offprints will be supplied to the corresponding author free of charge. Additional offprints and copies of the issue can be ordered at a specially reduced rate using the order form sent to the corresponding author after the manuscript has been accepted. This order form should be returned promptly since the price of offprints ordered after publication is substantially higher and will incur a 50% surcharge.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to transfer copyright. This transfer will ensure the widest possible dissemination of information. A letter will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript. A form facilitating transfer of copyright will be provided.

If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier Science has preprinted forms for use by authors in these cases: contact ES Global Rights Department, P.O. Box 800, Oxford, OX5 1DX, UK; phone: (+44) 1865 843830, fax: (+44) 1865 853333, e-mail: permissions@elsevier.com