

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Mestrado em Bioquímica

Purificação e Caracterização da Lectina da Vagem de
Caesalpinia ferrea (CfePL): Aplicação Biológica

Neila Caroline de Araújo Ximenes

Orientadora: Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia

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

Profa. Dra. Maria das Graças Carneiro da Cunha

Recife, 2004

Neila Caroline de Araújo Ximenes

Purificação e Caracterização da Lectina da Vagem de
Caesalpinia ferrea (CfePL): Aplicação Biológica

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

Aprovada por: Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia
Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto
Profa. Dra. Patrícia Guedes Paiva
Profa. Dra. Sandra Rodrigues Souza

Fevereiro/2004

**O temor do SENHOR é o princípio de Sabedoria,
e o conhecimento do Santo é prudência.
Pv. 9. 10**

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS

RESUMO

ABSTRACT

I. INTRODUÇÃO	1
I. 1 Lectinas	1
I. 1. 2 Purificação	3
I. 1. 3 Aplicações	5
I. 1. 4 Lectinas de Leguminosas	6
I. 1. 5 <i>Caesalpinia ferrea</i>	6
I. 2 Microrganismos	8
I. 2.1 Bactéria	8
I. 2. 2 Fungos	9
I. 3 Atividade Antimicrobiana	10
2. OBJETIVOS	12
2. 1 OBJETIVO GERAL	12
2. 2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	13
4. Artigo: Purification and Characterization of a <i>Caesalpinia ferrea</i> Thermostable Pod Lectin with Antimicrobial Activity	22
5. CONCLUSÕES	48
6. ANEXO	49

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, por Ele estar sempre comigo em todos os momentos, por ter me escolhido para servi-lo e por estar me ensinando a viver neste mundo.

À Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia pela confiança, suporte e orientação

À Profa. Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho pelo incentivo, atenção, otimismo, por seus ensinamentos e co-orientação.

À Profa. Dra. Maria das Graças Carneiro da Cunha pela confiança, oportunidade e co-orientação.

À Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva pela atenção, apoio e incentivo.

A Coordenação e professores do Mestrado em Bioquímica e aos funcionários do Departamento de Bioquímica.

Ao Miron e a Neide pela amizade dedicada e apoio.

À Maria Barbosa Reis, pela amizade, carinho, ensinamentos, otimismo, compreensão e por tudo.

Ao João Virgílio, pela amizade e ajuda técnica.

Aos que fazem parte do Laboratório de Glicoproteínas, pela amizade, carinho, troca de conhecimentos, em especial a minha amiga Michele Dalvina por sempre está comigo nas horas alegres e tristes desta caminhada científica.

Aos meus pais, Nelson e Carmelita por todo amor, carinho, educação, apoio e confiança em todos os momentos, por sempre acreditarem em mim e por me ensinarem que servir a Deus é mais importante do que tudo.

Aos meus irmãos Nielson, Neilson e Rodrigo, a minha cunhada Patrícia e minha Tia Mércia, por estarem sempre torcendo por mim e dispostos a me ajudarem.

Ao Paulo Luiz, pelo incentivo, compreensão, amizade e amor.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

RESUMO

Lectinas são proteínas que se ligam reversivelmente e especificamente a carboidratos. *Caesalpinia ferrea* é uma planta com ampla distribuição no Brasil, sendo utilizada em medicina popular. Este trabalho teve como objetivo a purificação e caracterização de lectina da vagem de *Caesalpinia ferrea* (CfePL). Extrato da vagem (E) em NaCl 0,15 M foi submetido a purificação parcial com carvão ativado seguido de precipitação com sulfato de amônio (0 – 80%, F80). A Atividade hemaglutinante (AH) de E e F80 foram avaliadas usando diferentes eritrócitos. F80 foi cromatografada em coluna de quitina e lavada com NaCl 0,15 M, seguido de NaCl 1M; CfePL foi eluída com ácido acético 1 M (pH 4,0). AH de CfePL foi avaliada em presença de soluções de íons (Ca^{2+} e Mg^{2+}), diferentes valores de pH (2 – 12), por carboidratos, glicoproteínas e tratamento com diferentes temperaturas (30° – 100°C, 30 min). A massa molecular da proteína nativa foi determinada pelo sistema ÄKTA FPLC usando a coluna Sephacryl S-300; Preparações de CfePL foram avaliadas por PAGE para proteínas nativas ácidas e básicas, bem como, em condições desnaturantes e redutoras. Atividade antimicrobiana de CfePL foi avaliada com amostras de bactérias Gram-positivas (5) e Gram-negativas (3) ou fungo (4). CfePL não apresentou especificidade para eritrócitos humanos, eritrócitos de coelho (512^{-1}) foram escolhidos para avaliação de AH. AH de CfePL foi estimulada por íons (65536^{-1}) e diferentes valores de pH, a melhor AH (2048^{-1}) foi obtida com tampão citrato-fosfato (pH 4,5, 5,0, 5,5) e fosfato de sódio (pH 7,5), sendo quase totalmente abolida em pH 9,0 (2^{-1}). CfePL continuou ativa após aquecimento à 100°C, foi parcialmente inibida pelos carboidratos (manose, frutose, N-acetilglicosamina, trealose, raminose, sacarose, galactose, fucose) e ovoalbumina, caseína, fetuína e glicoproteínas de soro de coelho, humano e fetal bovino. CfePL, uma proteína básica, apresentou uma banda principal por SDS-PAGE. Sistema ÄKTA FPLC revelou dois picos protéicos com 43 e 31 kDa. CfePL (1,5µg) inibiu o crescimento dos microrganismos testados; os melhores resultados (halo, 17 mm) foram com *Escherichia coli* e *Colletotrichum gloesporioides* e apresentou uma concentração mínima inibitória (CMI) de 10µg/ml frente a estes dois microrganismos. CfePL, purificada em quantidades de miligramas, foi um poderoso agente antimicrobiano de baixo custo, com amplo espectro de ação.

ABSTRACT

Lectins are proteins that bind specifically and reversibly to carbohydrates. *Caesalpinia ferrea* is a leguminous tree widely distributed in Brazil used in popular medicine. The aim of this work was the purification and characterization of *C. ferrea* pod lectin (CfePL). Pod extract (E) in 0.15 M NaCl was partially purified on activated charcoal followed by ammonium sulphate fractionation (0 – 80%, F80). Hemagglutinating activity (HA) of E and F80 were evaluated using different erythrocytes. F80 was chromatographed on chitin column and washed with 0.15 M NaCl followed by 1 M NaCl; CfePL was eluted with 1 M acetic acid (pH 4.0). CfePL HA was evaluated with ions (Ca^{++} and Mg^{++}), pH values (2 - 12), carbohydrates, glycoproteins and temperatures (30° - 100° C, 30 min). Molecular mass of native protein was determined in a ÄKTA FPLC system using a Sephacryl column; CfePL preparations were evaluated by PAGE for acidic and basic native protein, as well as under denatured and reduced conditions. CfePL antimicrobial activity was performed with strains of Gram-positive (5) and Gram-negative (3) bacteria or fungi (4). CfePL did not show specificity to human erythrocytes; rabbit erythrocytes (512^{-1}) were used to HA evaluation. CfePL HA was stimulated by ions (65536^{-1}); at different pH values, the best HA (2048^{-1}) were obtained with citrate-phosphate (pH 4.5, 5.0 and 5.5) and phosphate (pH 7.5) buffer, been almost abolished at pH 9.0 (2.0^{-1}). CfePL, active even after heating at 100°C, was partially inhibited by carbohydrates (threulose, fucose, N-acetyl-D-glucosamine, mannose, fructose, galactose, ramnose, saccharose) and ovalbumin, fetuin, casein and glycoproteins from rabbit, human and fetal bovine serum. CfePL, a basic protein, showed a main band by SDS-PAGE. ÄKTA FPLC system resolved two protein peaks with 43 and 31 kDa. CfePL (1,5µg) inhibited growth of tested microorganisms; best results (17 mm halo) were obtained with *Escherichia coli* and *Colletotrichum gloesporioides* and presented minimum inhibitory concentration (MIC) of 10 µg/ml for both microorganism. In conclusion, CfePL, purified in milligram quantities, was a powerful antimicrobial agent of low cost, with wide spectrum of action.

I - INTRODUÇÃO

I. 1 Lectinas

O primeiro relato a respeito de lectinas se deu em 1888, quando Stilmark estudando a toxicidade de *Ricinus communis* (mamona) observou que a presença de uma proteína no extrato da planta, denominada ricina, aglutinava eritrócitos (Kennedy *et al.*, 1995). Pouco tempo depois outra hemaglutinina foi descoberta em sementes de *Abrus precatorius* (jequiriti), a lectina abrina, porém, o estudo sobre estas proteínas só começou a ganhar ímpeto em 1960 (Sharon e Lis, 1998), abrindo uma vasta área de aplicação para as lectinas (Gabor *et al.*, 2001).

As lectinas são proteínas ou glicoproteínas que possuem pelo menos um sítio de ligação a carboidratos ou derivados sem apresentar função catalítica nem características imunológicas (Gosh *et al.*, 1999; Sharon e Lis, 2001). Ubíquas na natureza se ligam reversivelmente a mono e oligossacarídeos de glicoconjugados eucarióticos (Peumans e Van Damme, 1995) e podem apresentar um sítio hidrofóbico adicional (Barondes *et al.*, 1988).

Cada lectina liga-se a um carboidrato específico ou grupos de carboidratos em oligossacarídeos ou glicoproteínas, através de seus sítios de ligação que tendem a se localizar na superfície da molécula protéica, e a seletividade da ligação é obtida através de pontes de hidrogênio, interação de van der Waals, interações hidrofóbicas e coordenação metálica, entre o carboidrato e a proteína (Lis e Sharon, 2002). Pequenas alterações na estrutura da molécula protéica podem levar a modificações na orientação do carboidrato ligado a ela, portanto, altera a especificidade da lectina (Ng *et al.*, 1996).

Pelo fato das lectinas aglutinarem eritrócitos, a sua presença é detectada através de ensaio de hemaglutinação, no qual uma diluição seriada de lectina é efetuada, antes da incubação com os eritrócitos humanos ou de outros animais, que podem ser tratados enzimaticamente (Banerjee *et al.*, 2004; Branco *et al.*, 2004) ou quimicamente (Coelho e Silva, 2000; Gaidamasvili *et al.*, 2002) aumentando a sensibilidade das células à lectina. Esta hemaglutinação ocorre devido à ligação da lectina ao carboidrato da superfície dos eritrócitos. Somente a aglutinação de eritrócitos não é suficiente para comprovar a presença de lectina, pois alguns agentes, como os taninos, certos lipídeos ou cátions divalentes em altas concentrações podem aglutinar eritrócitos (Rüdger, 1998). Faz-se necessário realizar ensaios de inibição da atividade hemaglutinante (AH) com carboidratos, para comprovar a presença de lectina (Correia e Coelho, 1995; Sharon e Lis, 2001).

O termo lectina (originado do latim “lectus”) foi introduzido por Boyd e Shapleigh no ano de 1954, devido à capacidade de algumas proteínas se ligarem a carboidratos, aglutinando seletivamente eritrócitos de um grupo sanguíneo específico (Peumans e Van Damme, 1995). Estas proteínas ou glicoproteínas têm sido purificadas principalmente de sementes maduras de leguminosas, devido à sua abundância, uma vez que lectinas constituem 10 % do total de proteínas solúveis das sementes, como únicas ou múltiplas formas moleculares (Sharon e Lis, 1990; Paiva e Coelho, 1992; Konozy *et al.*, 2003). Entretanto as lectinas podem ser encontradas em outros tecidos vegetativos como casca, bulbo, vagem, raiz, folha, fruto, caule e flor (Ratanapo *et al.*, 2001). Com base na estrutura geral das proteínas as lectinas de plantas têm sido subdivididas em: merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas (Peumans e Van Damme, 1998). Merolectinas são aquelas que possuem um domínio de ligação a carboidratos, são monovalentes e por isso não podem aglutinar células ou precipitar glicoconjugados. Hololectinas possuem dois ou mais domínios de ligação a carboidratos que são idênticos ou muito semelhantes; este grupo compreende todas as lectinas que possuem múltiplos sítios de ligação, sendo capazes de aglutinar células e / ou precipitar glicoconjugados. Quimerolectinas são proteínas com um ou mais domínios de ligação a carboidrato e um domínio não relacionado. Este domínio pode apresentar atividade enzimática ou outra atividade biológica, no entanto age independentemente dos outros domínios de ligação a carboidratos. Superlectinas são proteínas que apresentam exclusivamente pelo menos dois domínios de ligação a carboidratos diferentes. Este pode ser considerado um grupo especial das quimerolectinas consistindo de dois domínios estruturalmente e funcionalmente diferentes de ligação a carboidratos (Van Damme *et al.*, 1996).

Através de sua especificidade as lectinas podem ser classificadas em cinco grupos, baseado no monossacarídeo que demonstra a maior afinidade. Os grupos são: glicose/manose; galactose e galactose/ N-acetilgalactosamina, L-fucose, N-acetilglicosamina e complexo, quando a lectina tem especificidade por um oligossacarídeo complexo em vez de um monossacarídeo (Audette *et al.*, 2000).

Algumas vezes as interações com carboidratos requerem íons metálicos como Ca^{++} , Mn^{++} , Mg^{++} e outros que estão presentes no sítio de ligação e / ou adjacentes a ele. Os aminoácidos que coordenam o íon metálico incluem asparagina e ácido aspártico. A presença destes íons é considerada como um coadjuvante auxiliar na manutenção da estrutura terciária da lectina em uma conformação favorável para a ligação ao carboidrato, mas não interage diretamente com o mesmo (Audette *et al.*, 2000; Sharon e Lis, 2001).

I. 1. 2 Purificação

O isolamento de lectinas segue os métodos de separação das proteínas, baseado na carga elétrica, tamanho e solubilidade, propriedades exibidas pelas mesmas, que variam de uma proteína para a outra.

O processo inicia-se com a preparação do extrato, onde as células precisam ser rompidas e as proteínas liberadas, com a obtenção do extrato bruto, em salina ou tampão (Kawagishi *et al.*, 2001; Mladenov *et al.*, 2002). Após a extração segue-se o fracionamento a partir da adição de um sal. Isto baseado no fato de que muitas proteínas possuem água na sua superfície, camada de solvatação. Em virtude das proteínas possuírem muitos grupos carregados, a solubilidade depende da concentração de sais dissolvidos, aumentando à proporção que os sais são adicionados (“salting in”) e voltando a diminuir à medida que mais sais são adicionados (“salting out”). O sal mais utilizado é o sulfato de amônio devido a sua alta solubilidade permitir a precipitação protéica em soluções com elevada força iônica (Heu *et al.*, 1995).

Em seguida, pode então se efetuar uma cromatografia, que é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição destes entre duas fases, que estão em contato íntimo. Uma fase é estacionária e a outra é móvel. Durante a passagem da fase móvel sobre a estacionária, os componentes da mistura são distribuídos entre as duas fases, de tal forma que cada um dos componentes é seletivamente retido pela fase estacionária, resultando em migrações diferentes dos componentes. A cromatografia pode ser de afinidade (Naeem *et al.*, 2001), exclusão molecular (Karasaki *et al.*, 2001), troca iônica, entre outras, que constituem uma etapa determinante na purificação, devido às propriedades ligantes das lectinas aos sacarídeos e derivados, fornecendo preparações protéicas homogêneas (Coelho e Silva, 2000).

A técnica de cromatografia de afinidade desenvolvida por Cuatrecasas *et al.* (1968) é a mais utilizada. Esta tem como princípio de separação a capacidade de proteínas se ligarem especificamente a outras moléculas, como as lectinas, que se ligam especificamente a carboidratos, através de ligações não covalentes. Desde que lectinas têm a propriedade de se ligar a carboidratos em colunas comerciais contendo suportes polissacarídicos tais como Sephadex (polímero de glicose), Sepharose (polímero de galactose) e quitina (polímero de N-acetilglicosamina) estas têm sido usadas (Cavada *et al.*, 1998; Jimbo *et al.*, 2000; Freire *et*

al., 2002; Wang *et al.*, 2003), bem como, Sepharose conjugada com glicoproteínas (Gerlach *et al.*, 2002).

A Cromatografia de troca iônica baseia-se na ligação da proteína com os grupos de cargas de sinais contrários imobilizados na matriz. A coluna é lavada com solução tampão e as proteínas com nenhuma ou pouca interação com o trocador de íons são eluídas. As proteínas adsorvidas à matriz podem ser eluídas pelo aumento da força iônica ou alteração do valor do pH do meio (Datta *et al.*, 2001). São alguns exemplos de trocadores aniônicos: Carboximetil (CM) celulose, CM-Sephadex (Hedge *et al.*, 1989), Sp-Sephadex (Kabir e Daar, 1994) e catiônicos: Dietilaminoetil (DEAE) celulose e DEAE-Sepharose (Kolberg e Sletten, 1982).

A cromatografia de gel filtração, exclusão molecular ou peneira molecular, é um método simples e baseia-se na separação de biomoléculas de acordo com o seu 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 de 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).

Após a purificação efetua-se a caracterização estrutural das lectinas, realizando difusão em agarose (Correia e Coelho, 1995), coloração para glicoproteínas (Coelho e Silva, 2000), eletroforese em gel de poliacrilamida, que se baseia na mobilidade eletroforética e nos efeitos de peneiramento, tornando possível definir no ensaio a massa molar de subunidades constituintes pela adição de sulfato sódico de dodecila (SDS) e / ou o agente β -mercaptoetanol (Kawagishi *et al.*, 2001). Na ausência destes reagentes e com técnicas

específicas, a eletroforese pode indicar a natureza ácida (Coelho e Silva, 2000) ou básica (Correia e Coelho, 1995), da lectina isolada.

A avaliação da atividade biológica em função do pH, da temperatura e da presença de íons, além de contribuir para a caracterização da proteína, define as condições a serem utilizadas na aplicação biotecnológica da lectina e na avaliação dos seus efeitos fisiológicos (Machuka *et al.*, 1999).

I. 1. 3 Aplicações

As lectinas mostram ser importantes ferramentas para a investigação em diversos processos médicos, químicos e biológicos (Karasaki *et al.*, 2001; Kiner *et al.*, 2003; Ohba *et al.*, 2003). A distribuição de um grande número de lectinas com diferentes especificidades para carboidratos tem levado à sua utilização como reagentes para explorar carboidratos, sendo este, o ponto mais importante no avanço de numerosas áreas da biologia celular. A aplicação das lectinas pode ser ampla e variada, devido as suas propriedades biológicas, como por exemplo, na investigação estrutural e funcional de carboidratos complexos, especialmente glicoproteínas; na observação de mudanças que ocorrem na superfície celular durante os processos fisiológicos e patológicos, desde a diferenciação celular ao câncer (Sharon e Lis, 2001), na avaliação de toxicidade para células e animais, bem como no efeito imunossupressor *in vivo*. Em estudos recentes, com lectinas, foi observada: a indução de apoptose em tumores de células humanas (Karasaki *et al.*, 2001); interação com células Du-145 do câncer de próstata (Gabor *et al.*, 2001); aglutinação de células bacterianas (Gaidamashvili *et al.*, 2002; Tasumi *et al.*, 2004); inibição da proliferação de fibroblastos oculares e contração de colágeno (Batterbury *et al.*, 2002); produção dos chamados medicamentos inteligentes, onde estes diferem dos tradicionais por atuarem em células específicas do organismo evitando efeitos colaterais, do tipo provocado pela quimioterapia (Woodley *et al.*, 2001); atividade mitogênica (Banerjee *et al.*, 2004); além de atividade antimicrobiana. A afinidade das lectinas por glicoproteínas de superfície celular tem sido usada para a caracterização epidemiológica da *Neisseria gonorrhoeae* e diferenciação de outras espécies de *Neisseria* (Wu *et al.*, 2001). Vários trabalhos mostraram 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, sendo o bloqueio aos locais de ataque

das bactérias, um caso claro de terapia antiadesiva contra doenças microbianas. Esta forma de aplicação das lectinas é alvo de intensas pesquisas pelas indústrias farmacêuticas como método contra infecções (Sharon e Lis, 1993; Rudiger *et al.*, 2000). Ainda, Lectinas de diferentes especificidades foram imobilizadas em suportes inertes e usadas como matriz de afinidade para fins bastante variados, tais como: purificação de glicoconjugados, glicoproteínas, imunoglobulinas, separação entre linfócitos normais de células T leucêmicas, dentre outras (Lima *et al.*, 1997; Ohba *et al.*, 2002; Bakalova e Ohba, 2003).

I. 1. 4 Lectinas de Leguminosas

Lectinas de legumes representam a maior e mais estudada família de proteínas desta classe, alguns dos 100 membros bem caracterizados, foram quase todos obtidos de sementes de plantas (Sharon e Lis, 1990; Loris *et al.*, 1998; Konozy *et al.*, 2003). Alguns exemplos bem conhecidos destas lectinas são Concanavalina A (Con A), Phytohemaglutinina (PHA), *Cratylia mollis* (Cramoll) e a lectina de *Erythrina coralladendron* (ECorl). As lectinas de legumes são extremamente úteis como um modelo para o entendimento da base molecular de interações proteína-carboidrato porque elas são mais fáceis de serem purificadas e exibem uma grande variedade de especificidade para açúcares. Uma importante razão pelo interesse nestas lectinas é sua similaridade estrutural com as lectinas de outras fontes, como as de animais e microrganismos (Sharon e Lis, 2001).

I. 1. 5 *Caesalpinia ferrea*

Caesalpinia ferrea, planta que pertence à família Leguminosae, do gênero *Caesalpinioideae* é uma espécie oriunda do Brasil, encontrada no norte e nordeste do País, principalmente na caatinga nordestina.

É uma planta de flores amarelas pequenas e em cachos, com frutos achatados de casca dura, marrom escuro medindo em média 8 por 2 cm, folhas compostas, pinadas, sementes escuras, de altura média, que fornece madeira para construção civil, como vigas, esteios, estacas e também como lenha (figura 1). A casca do caule é usada como descongestionante, as raízes como febrífugas e antidiarréicas, o fruto para contusões, apresenta propriedades béquicas e antidiabéticas e a decocção da madeira é anticatarral e cicatrizante (Penna, 1964; Pio Corrêa, 1984; Lewis, 1987). Também tem ação antiúlcera, hemostática, expectorante,

antibacteriana, antifúngica, anti-helmíntica, antiinflamatória. Apresenta como constituintes: taninos, sitosterol, ácido palmítico, octocosanóico, saponinas (traços de saponinas na casca), óleo essencial, alcalóides, flavonóides e cardiotônico (casca). Tinturas, casca, medicamentos (Proconeol) e a erva medicinal têm sido comercializados pelos laboratórios: Napie, Aromas Tropicais, Pharmacotecnica, Plant et Medicinas, Herbário e Santosflora (www.napie.com.br, www.aromastropicais.hpg.ig.com.br, www.pharmacotecnica.com.br, www.vidal.fr, www.herbario.com.br e www.santosflora.com.br).



Figura 1- Aspectos da árvore, flor e fruto de *Caesalpinia ferrea* (Pau-ferro).

Os extratos aquosos e alcoólicos do fruto foram avaliados quanto às propriedades analgésicas e antiinflamatórias (Carvalho *et al.*, 1996), quanto a efeitos antiúlcera gástrica (Bacchi *et al.*, 1995), quanto à atividade antifúngica (Lima *et al.*, 1994) e quanto a efeitos quimiopreventivos ao câncer, (Nakamura *et al.*, 2002a). Os constituintes extraídos dos extratos alcoólicos do fruto foram avaliados quanto ao seu efeito antitumor em processos carcinogênicos de pele no segundo estágio “in vivo” (Nakamura *et al.*, 2002b).

I. 2 Microrganismos

I. 2.1 Bactérias

Como as bactérias são organismos unicelulares, o termo crescimento refere-se ao aumento do número de indivíduos presentes na população. O crescimento bacteriano depende das condições químicas, físicas e dos nutrientes adequados. Isto ocorre por divisão binária que é precedida do aumento da massa celular, pela síntese de proteínas, polissacarídeos, lipídeos e ácidos nucleicos que estão presentes na célula. Sua classificação é feita de acordo com a constituição da parede celular em dois grupos Gram-positivas e Gram-negativas. Substâncias químicas interessantes são encontradas na parede das bactérias como o ácido diaminopimílico (DPA), o ácido murâmico e o ácido teicóico. Outros constituintes principais são aminoácidos, açúcares aminados, carboidratos, lipídeos e peptoglicanos (constituídos de N-acetilglicosamina e ácido N-acetilmurâmico). As bactérias Gram-positivas apresentam em sua parede celular, polissacarídeos, ácidos teicóico e peptoglicanos, enquanto as Gram-negativas apresentam na sua parede celular, peptoglicanos, lipídeos, proteínas e lipopolissacarídeos (Trabulsi, 1991).

Dentre as bactérias Gram-positivas podem-se destacar: *Staphylococcus aureus*, de forma esférica, coagulase positivo, geralmente com distribuição em cachos irregulares semelhantes a cachos de uvas. É um patógeno responsável por muitas infecções graves nos seres humanos. Pode provocar endocardite, osteomielite hematogênica aguda, meningite ou infecção pulmonar, entre outras. Desenvolve rapidamente resistência a muitos agentes antimicrobianos e representa problemas terapêuticos difíceis; *Streptococcus*, também esférica, tipicamente forma par ou cadeias durante o seu crescimento. Apresenta-se amplamente distribuído na natureza. Pode estar presente na flora humana normal, como também estar associado a importantes doenças humanas que pode ser atribuída em parte à infecção por estreptococos e / ou em parte a sensibilidade ao mesmo, por produzir várias substâncias extracelulares e enzimas.

Como bactérias Gram-negativas destacam-se: *Escherichia coli*, apresenta-se na forma de bastonete, além de formar colônias lisas, convexas, circulares e com bordas bem definidas. Faz parte da flora normal e acidentalmente causa doenças. Podendo causar infecção do trato urinário, diarreia, meningite e septicemia; *Klebsiella*, também em forma de bastonete, forma colônias grandes e mucóides, e tendem a coalescer com a incubação prolongada. Encontrada

no trato respiratório e nas fezes, é responsável por uma pequena fração de pneumonias bacterianas, provocando extensa consolidação necrozante hemorrágica nos pulmões. Pode causar infecção no trato urinário e bacteremia, além de ser responsável por infecções hospitalares; *Pseudomonas aeruginosa* é um bacilo aeróbico móvel. Amplamente distribuído na natureza, sendo comum seu achado em ambientes úmidos de hospitais. Consegue colonizar seres humanos normais, nos quais é um saprófita sendo encontrada em pequenos grupos na flora intestinal normal e na pele de humanos. É capaz de provocar doença em seres humanos cujas defesas estejam alteradas, por produzir a endotoxina A que causa necrose, quando purificada e injetada é letal para animais. Provoca, ainda, várias infecções sendo resistente a muitos antimicrobianos (Jawetz, 1991).

I. 2. 2 Fungos

Os fungos são protistas, não-fotossintéticos que crescem como uma massa de filamentos entrelaçados e ramificados, conhecida como micélio. Os fungos filamentosos possuem micélio e sua parede celular é constituída por celulose ou quitina. As leveduras não formam micélio, mas são reconhecidas como fungo pela natureza de seus processos de reprodução sexuais e pela existência de formas de transição (Jawetz, 1991). Estes microrganismos são ubíquos, encontrados no solo, água, vegetais, homem e detritos em geral (Trabulsi, 1991). Muitos dão origem a doenças em plantas, contudo somente cerca de 100 das milhares de espécies conhecidas de levedura e fungos filamentosos provocam doenças em seres humanos ou em animais, tais como: *Candida albicans*, levedura ovalada, com brotamento que produz pseudomicélio tanto em cultura como nos tecidos e exudatos. Trata-se de um membro da flora normal das mucosas nas vias respiratórias, gastrintestinais e genitais femininas. Nesses locais, pode predominar e associar-se às condições patogênicas, podendo provocar doença sistêmica em pacientes imunodeprimidos ou debilitados e ser comumente transmitida de um ser humano para outro (Jawetz, 1991); *Aspergillus niger* apresenta conidióforos simples, cabeça conidial grande, radiada, preta e ocre. É patogênico ao homem, capaz de provocar aspergilose pulmonar, aspergilose disseminada, lesões cutâneas, nasais e do sistema nervoso central, bem como outros processos; *Colletotrichum*, forma assexuada de *Glomerella cingulata*, apresenta micélio de coloração branca, conídios hialinos e arredondados. O *Colletotrichum gloesporioides*, corresponde ao estado conidial de *Glomerella cingulata*. Este gênero é um dos mais importantes e difundidos na natureza, supostamente com mais de 1.000 espécies, normalmente é patógeno de plantas; *Trichoderma*

viride apresenta colônias de crescimento lento, inicialmente brancas e mais tarde, amareladas, verdes e acinzentadas. Conidióforo ramificado, com fíalides em forma de frasco. Conídios dispostos em aglomerados, de paredes lisas ou rugosas, dispostos nas extremidades das fíalides. Frequentemente isolado do solo e restos de madeira, apresenta interesse médico, pois são oportunistas, causando patologias humanas, por produzirem micotoxinas (Lacaz, 1998).

I. 3 Atividade Antimicrobiana

Uma substância apresenta efeito antimicrobiano quando o microrganismo responsável pela infecção é sensível a ela. Então o microrganismo é considerado sensível a um antimicrobiano quando o seu crescimento é inibido “*in vitro*” por uma concentração três ou mais vezes, inferior àquela que o antimicrobiano atinge no sangue. Se a concentração inibitória é igual ou superior àquela que o antimicrobiano atinge no sangue, o microrganismo é considerado resistente.

Muitas substâncias, inclusive proteínas, estão sendo avaliadas quanto ao seu efeito antimicrobiano. As proteínas antimicrobianas, em animais, constituem parte do sistema imune inato. Peptídeos e pequenas proteínas com atividade antimicrobiana são usados contra inúmeros microrganismos perigosos. Por causa dos distintos mecanismos de ação, houve um crescente interesse no uso de peptídeos e proteínas antimicrobianos como antibióticos para o controle de patógenos (Wang *et al.*, 2002). Em plantas as proteínas antimicrobianas estão envolvidas com mecanismo de defesa (Lee *et al.*, 2002).

Duas proteínas de *Malva parviflora* possuem uma potente atividade antifúngica e curiosamente a inibição é fungicida em vez de ser fungistática frente ao fungo *Fusarium graminearum* (Wang e Bunbers, 2000) e peptídeos isolados de sementes de *Phaseolus vulgaris* e *Adzuckia angularia* possuem uma potente atividade antifúngica frente aos fungos *Botrytis cinerea*, *Mycosphaerella arachidicola* e *Fusarium oxysporum* (Ye e Ng, 2001).

Lectinas, que são proteínas, estão sendo avaliadas quanto a apresentarem efeitos antimicrobianos. Algumas lectinas como, a de *Anguilla japonica* (AJL-1) apresentou atividade aglutinante frente à bactéria patogênica *Streptococcus difficile*, sugerindo uma atuação como fator de defesa (Tasumi *et al.*, 2004). Uma lectina manose-dependente isolada do soro de peixe (salmão) do Atlântico teve efeito antibacteriano contra a bactéria Gram-negativa patogênica, *Aeromonas salmonicida*, através da associação com macrófagos (Ottinger *et al.*, 1999) e outra lectina de peixe (*Trichogaster trichopterus*) associada a macrófagos,

também, apresentou ação antibacteriana frente a *Aeromonas hydrophila* (Fock *et al.*, 2001). Lectinas parcialmente purificadas a partir de sete plantas medicinais do Sul da África foram avaliadas quanto ao efeito antibacteriano frente às bactérias *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* através de método de aglutinação, apresentando efeito inibitório no crescimento das mesmas (Gaidamashvili e Staden, 2002). Concanavalina A (Con A), lectina de *Canavalia ensiformis*, aglutinina da *Bauhinia purpurea* (BPA), aglutinina da *Lens culinaris* (LCA), aglutinina de *Germem de trigo* (WGA) bloquearam a adesão dos conídios de *Colletotrichum graminicola*, indicando que o material associado à aderência do conídio é composto de glicoproteínas (Mercure *et al.*, 1995).

Atividade antifúngica foi observada em uma lectina isolada de sementes de *Castanea mollisma* (Castamollin), frente aos fungos *Botrytis cinerea*, *Mycosphaerella arachidicola*, *Physalospora piricola* (Wang e Ng, 2003); bem como na lectina de *Talisia esculenta* (TEL) a qual inibiu o crescimento dos fungos *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum lindemuthianum* e *Saccharomyces cerevisiae* através da interação da lectina com as estruturas dos fungos (Freire *et al.*, 2002).

Extratos de diferentes tecidos de plantas, contendo substâncias bioativas, vêm sendo utilizados na medicina popular para os mais diversos fins. Infecções microbianas são, entre outras, uma das maiores causas de doenças humanas. A utilização e a comercialização, para aplicações em medicina popular, de extratos aquosos e alcoólicos, farinha de diversos tecidos e a vagem de *C. ferrea* desperta o interesse desta planta para estudos biotecnológicos. A purificação, caracterização e avaliação de atividade antimicrobiana de lectina(s) presente(s) na vagem de *C. ferrea*, é de relevância para um maior conhecimento da planta, além de se somar ao painel de lectinas, puras, com relevante aplicação biológica, do Laboratório de Glicoproteínas da Universidade Federal de Pernambuco.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Extrair, purificar e caracterizar lectina (s) presente (s) em vagem de *C. ferrea* através de métodos físico-químicos e processos cromatográficos, com interesse biotecnológico.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a presença de atividade hemaglutinante em extratos da vagem de *C. ferrea* para detecção de lectina (s);
- Purificar a proteína com maior atividade hemaglutinante, lectina da vagem de *C. ferrea* (CfePL), utilizando processos cromatográficos convencionais e de alta resolução;
- Caracterizar a CfePL utilizando métodos eletroforéticos;
- Determinar em CfePL a especificidade para carboidratos, para eritrócitos, estimulação da AH em presença de íons, estabilidade térmica e comportamento frente à variação de pH;
- Avaliar a atividade antimicrobiana da CfePL;
- Determinar a concentração mínima inibitória (CMI), mínima bactericida (CMB) e mínima fungicida (CMF) da CfePL.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AUDETTE, G. F.; VANDONSELOAR, M.; DELBAERE, L. TL J. The 2.2 Å resolution structure of the O (H) blood-specific lectin I from *Ulex europaeus*. **Journal of Molecular Biology**, v. 304, p. 423 – 433, 2000.

BACCHI, E. M.; SETIE, J.A. A. Anti-ulcer action and toxicity of *Styrax camporum* and *caesalpinia ferrea*. **Planta Medica** 60, 118 - 120, 1995.

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 from freshwater Indian gastropod *Belamya bengalensis*: purification and molecular characterization. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 421, 125 - 134, 2004.

BARONDES, S. H. bifunctional properties of lectins: lectins redefined. **Trends in Biochemical Science**, 13: 480 – 482, 1988.

BATTERBURY, M.; TEBBS, C. A.; RHODES, J. M.; GRIERSON, I. *Agaricus bisporus* (Edible Mushrooms lectin) inhibits ocular fibroblast proliferation and collagen lattice contraction. **Exp. Eye Res.** 74, 361 - 370, 2002.

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.

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.

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**, 53, 175 -178, 1996.

CAVADA, B. S.; SANTOS, C. F.; GRANGEIRO, T. B.; NUNES, E. P.; SALES, P.V. P.; RAMOS, R. L.; DE SOUZA, F. A M.; CRISOSTOMO, C. V.; CALVETE, J. J. Purification and characterization of lectin from seeds of *Vatairea macrocarpa* Duke. **Phytochemistry**, v. 49, n. 3, p.675 - 680, 1998.

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, 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 Biotechnology**, v. 55, p. 261 - 273, 1995.

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.

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

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.

FOCK, W. L.; CHEN, C. L.; LAM, T. J.; SIN, Y. M. Roles of an endogenous serum lectin in the immune protection of blue gourami, *Trichogaster trichopterus* (Pallus) against *Aeromonas hydrophila*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 11, p. 101 - 113, 2001.

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.; 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.

GERLACH, D.; WAGNER, M.; SCHLOTT, B.; ZÄHRINGER, U. Chemical and physicochemical characterization of the sialic acid-specific lectin from *Cepaea hortensis*. **FEM Microbiology Letters**, 10579, 61 - 68, 2002.

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.

HEDGE, S.P.; SHET, M.S.; MADAIHA, M. Purification and partial characterization of lectin from *Ariopsis peltata* tubers. **Phytochemistry** **28**, 2897-900, 1989.

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.

JAWETZ, E.; MELNICK, J. L.; ALDELBERG, E. A.; BROOKS, G. F.; BUTEL, J. S.; ORNSTON L. N. **Microbiologia Médica**, 18^a ed., Ed. Guanabara – Koogan, 1991.

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

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

KOLBERG, J.; E SLETTEN, K. Purification and properties of a mitogenic lectin from *Lathyrus sativus* seeds. **Biochimica et Biophysica Acta** 704, 26-30, 1982.

KONOZY, E. H.; BERNARDES, E. S.; ROSA, C.; FACA, V.; GREENE, L. J.; WARD, R. J. Isolation, purification, and physicochemical characterization of a D-galactose-binding lectin from seeds of *Erythrina speciosa*, **Archives of Biochemistry and Biophysics**, available online at www.sciencedirect.com, 2003.

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

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; HEINS-VACCARI, E. M.; DE MELO, N. T. **Guia para identificação de fungos, actinomicetos , algas de interesse médico**, Ed. Savier, FAPESP, 1998.

LEE, D. G.; PARK, Y.; KIM, H. N.; KIM, H. K.; KIM, P. IL.; CHOI, B. H.; HAHM, K-S. Antifungal mechanism of an antimicrobial peptide, HP (2-20), derived from N-terminus of *Helicobacter pylori* ribosomal protein L1 against *Candida albicans*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 291, p. 1006 - 1013, 2002.

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.

LIMA, V. L. M., CORREIA, M. T. S., CECHINEL, Y. M. N., SAMPAIO, C. A., OWEN, J. S. and COELHO, L. C. B. B. Immobilized *Cratylia mollis* lectin as potential matrix to isolate plasma glycoproteins Including lecithin cholesterol acyltransferase. **Carbohydrate Polymers**. v. 31, n. 892, 27 - 32, 1997.

LORIS, R.; HAMELRYCK, T.; BOUCKAERT, J.; WYNS, L. Legume lectin structure, **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1383, p. 9 - 13, 1998.

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

MERCURE, E. W.; KUNOH, H.; NICHOLSON, R. L. Visualization of materials released from adhered ungerminated conidia of *Colletotrichum graminicola*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 46, p. 121 - 135, 1995.

MLADENOV, I.V.; HARALAMBIEVA, I.H.; IANKO, I.D.; MITOV, I.G. Characterisation of 20-kDa lectin-spermagglutinin from *Arum maculatum* that prevents *Chlamydia pneumoniae* infection of L-929 fibroblast cells **FEMS Immunology and Medical Microbiology** **1386**, 1-6, 2002.

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.

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.

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, 2002a.

NAKAMURA E. LS.; KUROSAKI, F.; ARISAWA, M.; MUKAINAKA, T.; TAKAYASU, J.; OKUDA M.; TOKUDA, H. NISHINO, H.; PASTORE JR, F. Cancer chemopreventive effects of a brasilian folk medicine, juca, on in vivo two-stage skin carcinogenesis, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, p. 135 - 137, 2002b.

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.

OHBA, H.; BAKALOVA, R.; MORIWAKI, S.; MURAKI M. Cytoagglutination and cytotoxicity of Wheat Germ Agglutinin isolectins against normal lymphocytes and cultured leukemic cells lines- relationship between structure and biological activity. **Biochemica et Biophysica Acta**, v. 1619, p. 144 - 150, 2003.

OHBA, H.; BAKALOVA, R.; MORIWAKI, S.; NAKAMURA, O. Fractionation of normal and leukemic T- cells by lectin affinity column chromatography. **Cancer Letters**, v.184, p. 207 - 214, 2002.

OTTINGER, C. A.; JOHSON S. C.; EWART K. V.; BROWN L. L.; ROSS N. W. Enhancement of anti- *Aeromonas salmonicida* activity in Atlantic salmon (*Salmo salar*) macrophages by a mannose-binding lectin. **Comparative Biochemistry and Physiology Part (C)**, v. 123, p. 53 - 59, 1999.

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

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

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

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Plant lectins 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.

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.

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.

SHARON, N.; LIS, H. Carbohydrates in cell recognition. **Scientific American** v.268, p. 82-89, 1993.

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

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

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

TRABULSI, R. **Microbiologia**. 2^a ed. Ed. Guanabara-Koogan, 1991.

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.

WANG, X.; BUNBERS, G. J. Potent heterologous antifungal proteins from cheeseweed (*Malva parviflora*). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 279, p. 669 - 673, 2000.

WANG, X.; THOMA, R. S.; CARROLL, J. A.; DUFFIN, K. L. Temporal generation of multiple antifungal proteins in primed seeds. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 292, p. 236 - 242, 2002.

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

WOODLEY, J. Bioadhesion: New possibilities for drug administration? **Clinical Pharmacokinetics**, v.40, p.77 - 84, 2001.

WU, A. M.; WU, J. H.; TSAI, M. S.; HERP, A. Carbohydrate specificity of an agglutinin isolated from the root of *Trichosanthes kirilowii*. **Life Science**, v. 66, p. 2571 – 2581, 2001.

YE, X. Y.; NG, T. B. Peptides from pinto bean and red bean with sequence homology to cowpea 10-KDA Protein precursor exhibit antifungal, mitogenic, and HIV-1 reverse transcriptase-inhibitory activities. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 285, p. 424 - 429, 2001.

www.vidal.fr, acessado em nove de fevereiro de 2004.

www.santosflora.com.br , acessado em nove de fevereiro de 2004.

www.pharmacotecnica.com.br , acessado em nove de fevereiro de 2004.

www.napie.com.br , acessado em nove de fevereiro de 2004.

www.herbario.com.br , acessado em nove de fevereiro de 2004.

www.aromastropicais.hpg.ig.com.br, acessado em quinze de fevereiro de 2004.

4 ARTIGO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO *Phytochemistry*

**PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF A *Caesalpinia ferrea*
THERMOSTABLE POD LECTIN WITH ANTIMICROBIAL ACTIVITY**

Ximenes, N. C. A., Paiva, P. M. G., Coelho, L. B. B., Carneiro-da-Cunha, M. G. and Correia, M. T. S.

Purification and Characterization of a *Caesalpinia ferrea* Thermostable Pod Lectin with Antimicrobial Activity

Ximenes, N. C. A., Paiva, P. M. G., Coelho, L. B. B., Carneiro-da-Cunha, M. G. and Correia, M. T. S*.

Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, 50.670-420, Recife, Brasil.

Abstract

Caesalpinia ferrea pod lectin (CfePL) was isolated through chromatography on chitin followed by 1 M acetic acid elution. The purified lectin showed a main protein band in SDS-PAGE (~14.4 kDa) in the presence of 2-mercaptoethanol and agglutinated human as well as animal erythrocytes. CfePL exhibited two protein peaks with molecular masses of 43 and 31 kDa by gel filtration using a ÄKTA $FPLC$ system. Bovine, rabbit and fetal serum glycoproteins inhibited the lectin hemagglutinating activity (HA). The HA of CfePL was not affected over the temperature range 30-100 °C, even after exposure to 100 °C for 30 min. The activity was stimulated by ions (Ca^{2+} and Mg^{2+}) and in presence of citrate-phosphate (pH 4.5, 5.0, 5.5) and sodium phosphate (pH 7.5) buffers. CfePL displayed antibacterial activity against *Escherichia coli*, *Klebsiella sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sp.*, *Corynebacterium sp.*, *Bacillus sp.* and displayed antifungal activity against *Colletotrichum gloesporioides*, *Trichoderma viride*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans* and presented minimum inhibitory concentration (MIC) of 10 µg/ml against *Colletotrichum gloesporioides*, *Escherichia coli*, *Streptococcus sp.*

Keywords: *Caesalpinia ferrea* lectin; antibacterial activity; antifungal activity; pod.

*Corresponding author: Tel.- fax: +55-081-32718354; E-mail address: mtcorreia@bol.com.br

Introduction

Lectins are proteins or glycoproteins of ubiquitous distribution in nature, which have at least one carbohydrate or derivative binding site without catalytic function or immunological characteristics (Sharon and Lis, 2001), could have one additional hydrophobic site (Barondes, 1988) and reversibly bind to mono or oligosaccharides of eukaryotic glycoconjugates (Peumans and Van Damme, 1995). They could be purified from different species (Banerjee et al., 2004; Ngai and Ng, 2004; Fenton-Navarro et al., 2003; Freire et al., 2002). In plants, they are mainly obtained from legume seeds (Wang and Ng, 2003), but could be, also, obtained from different vegetative tissues such as leaves (Coelho and Silva, 2000), bulbs (Mo et al., 1993), bark (Wititsuwammakul et al., 1998), root (Naeem et al., 2001) and pod (Oliveira et al., 2003). By virtue of their sugar-binding property, they are useful for detection of cell surface carbohydrates (Weis et al., 1996), differentiation normal from transformed tissues (Beltrão et al., 2003), glycoconjugate purification (Lima et al., 1997), as well as biological and medical investigations (Banerjee et al., 2004; Mizuno et al., 2004; Sharon and Lis, 2001).

Several proteins (Nagashima et al., 2003; Wang and Ng, 2003) and lectins (Tasumi et al., 2004; Gaidamashvili and Standen, 2002) showed antimicrobial activity. Some lectins have action against pathogenic species of fungi such as *Talisia sculenta* lectin (Freire et al., 2002), *Ganoderma capense* lectin (Ngai and Ng, 2004) and *Castanea mollissima* lectin (Wang et al., 2003). In particular, chitin-binding lectins seemed to have a role in defending plants against fungi and insects (Freire et al., 2002; Macedo et al., 2002). Studies *in vitro* with *Urtica dioica* lectins demonstrated inhibition growth of some fungi (Broekaert et al., 1989). Antibacterial activity have, also, been found in many lectins obtained from medicinal plants or from fish (Gaidamashvili and Staden, 2002; Fock et al., 2001). A lectin from salmon (*Salmo solar*), an Atlantic fish, inhibited the growth of *Aeromonas salmonicida* (Ottinger et al., 1999).

Caesalpinia ferrea Mart. is a legume broadly distributed at North and Northeast Region of Brazil and locally known as *Jucá* or Pau-ferro (iron-wood). Anti-fungal, anti-ulcer and anti-inflammatory properties have been attributed to *C. ferrea* fruit (Thomas et al., 1988; Lima et al., 1994; Bacchi et al., 1995); also aqueous extracts have anti-inflammatory and analgesic activities (Carvalho et al., 1996). Fruit have been used for popular treatment of diabetes (Balbach, 1972).

This paper describes the extraction, purification and characterization of *C. ferrea* pod lectin (CfePL) and the evaluation of its antimicrobial activity.

Results and discussion

Several lectins have been purified from leguminous tissues and used in different biological applications. Search of new pure lectins is of interesting to amplify the knowledge about this class of proteins as well as if they are responsible by pharmacological activity presented by plant extracts popularly used. Different *C. ferrea* tissues have been used in popular medicine (Lewis, 1987; Pio Corrêa, 1984; Penna, 1964), waked the interesting in isolated and purify lectins from this plant. *C. ferrea* pod showed be a potential tissue to obtain lectin due highest HA. Analgesic and antiinflammatory (Carvalho et al., 1996) or anti-gastric ulcer (Bacchi et al., 1995) activities were evaluated with aqueous extracts from *C. ferrea* fruits; alcoholic extracts were used in antifungi and antitumor assays (Lima *et al.*, 1994; Nakamura *et al.*, 2002). *C. ferrea* tinctures, pod, medicine (Proconeol) as well as medicinal herb have been commercialized by the Laboratories: Napie, Aromas Tropicais, Pharmacotecnica, Plant et Medicinas, Santosflora and Herbário (www.napie.com.br, www.aromastropicais.hpg.ig.com.br, www.pharmacotecnica.com.br, www.herbario.com.br, www.santosflora.com.br and www.vidal.fr).

Preliminary experiments indicated that N-acetyl-D-glucosamine inhibited F80 activity, and one chromatographic step of F80 on chitin column was used to purify CfePL, which was resolved in three main peaks (Figure 1). The adsorbed proteins (second and third peaks), showed HA, however the last peak (CfePL) showed higher activity and stability. The described protocol allowed to obtain 48 mg of pure CfePL from 10 g *C. ferrea* pod flour, a high yield, in relation to others lectin purification steps, such as those to obtain soybean agglutinin (44 mg of pure lectin from 50 g of soybean flour) or *Talisia esculenta* lectin (5 mg from 10 g of seeds) by chitin chromatography (Franco-Fraguas et al., 2002; Freire et al., 2002). Elution with 0.5 M acetic acid from affinity chromatography on BSM-Toyopearl column was efficient to purify *Goderma lucidum* lectin (Kawagishi et al., 1997). CfePL specific binding to chitin was demonstrated by a microassay using N-acetyl-D-glucosamine (carbohydrate which compound the matrix) as an eluent of bound protein. Table 2 summarizes CfePL purification.

CfePL agglutinated rabbit and human (A, B, AB and O) erythrocytes (Figure 2 A). It was sensible to alkaline pH (Figure 2 B) and stimulated by ions Mg^{2+} or Ca^{2+} and (Figure 2 C). Carbohydrates and glycoproteins partially inhibited CfePL HA at tested concentrations (Figure 2 D). CfePL showed great thermostability and remained active even after 30 min at 100 °C.

CfePL agglutinated preferentially AB and O human blood types. A lectin from *Talisia esculenta*, recently purified by chitin chromatography, showed similar preference to AB type blood. *T. esculenta* lectin was stimulated by Ca^{2+} (Freire et al., 2002) and *Sphenostyles stenocarpa* lectin showed higher agglutination to type O blood (Machuka et al., 1999). The thermal stability of CfePL and the reasonable stability with respect to pH variations; only at pH above 8.0 a reduction of HA was observed, suggested that the lectin is markedly stable. Legume seed lectins have been very stable; isolectin 1 from *Cratylia mollis* lectin (Cramoll 1) remained active after exposure at 80 °C for 30 min or after storage for at least 10 years (Correia and

Coelho, 1995). Ngai and Ng (2004) showed that *Ganoderma capense* lectin was unaltered after incubation at 100 °C for 60 min and only lost activity when the time of incubation was 150 min.

When CfePL was chromatographed in Sephacryl two protein peaks were obtained, with 43 and 31 kDa, respectively (Figure 3). Native electrophoresis showed only one small and highly basic band (Figure 4A); under denatured and reduced conditions CfePL showed only one polypeptide band with molecular mass of approximately 14.4 kDa (Figure 4B). SDS-PAGE and gel filtration assays showed that CfePL could be a monomer of approximately 14 kDa (or smaller), and each monomer aggregates/associates with each other to give 14 kDa multiple polypeptides, during or not its purification steps. Similar results were obtained to *Grifola frondosa* lectin (Kawagishi et al., 1990). Concanavalin A (Con A), the most known lectin, exist as dimmers (below pH 6.0) or tetramers (above pH 7.0) of a 26.5 kDa polypeptide (Hong et al., 2001).

Table 3 shows the results of microorganism's growth in the presence of CfePL. All bacteria and fungi tested were inhibited by the lectin; better results were obtained to *C. gloesporioides* (17.25 ± 1.5 mm halo) and to *E. Coli* (16.75 ± 0.5 halo). Although halos obtained with *C. gloesporioides* and *E. Coli* have been highest no significative difference was observed between *E. coli*, *Klebsiella* sp. and *Streptococcus* sp bacteria or between *C. gloesporioides* and *T. Viride* fungi (Figure 5). CfePL showed fungistatic and bacteriostatic action by minimum bactericidal concentration (MBC) or minimum fungicidal concentration (MFC) assays, respectively, for *C. gloesporioides*, *E. Coli*, *Streptococcus* sp, chosen due to their better results, with minimum inhibitory concentration (MIC) of 10.0 µg/ml. Gaidamadhvili and Staden (2002) defined that MIC for *Combretum* agglutinin was 20.0 µg/ml and 5.0 µg/ml for *B. subtilis* and *S. aureus* aggregation, respectively. The presence of chitin, cellulose, N-acetyl-D-glucosamine, mannan, N-muramic acid and other carbohydrates at fungi and bacteria membranes could explain the broad inhibitory effects of CfePL on growth of used microorganisms; CfePL was not

specific to any tested monosaccharide but was partially inhibited by them. The number of lectins described with antibacterial activity is relatively small (Tasumi et al., 2004; Freire et al., 2002; Gaidamashvili and Staden, 2002; Ottinger et al., Fock et al., 2001). 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 (Gaidamashvili 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.

In this paper, a thermostable *C. ferrea* pod lectin 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; it was a powerful antimicrobial agent of low cost, with broad spectrum of action.

Experimental

Plant material

C. ferrea pods were harvested from plants at Ibimirim City, State of Pernambuco, Northeast Brazil.

Microorganisms

Twelve microorganisms were used for antimicrobial activity evaluations, five Gram-positive, three Gram-negative bacteria and four fungi (Table 1).

Haemagglutination and inhibition assays

Fresh erythrocytes from human (A, B, O and AB types) and rabbit were obtained as described by Bukantz et al. (1946), and glutaraldehyde treated according to Bing et al., (1997). Haemagglutinating activity (HA) was evaluated as described by Correia and Coelho (1995) defined as the lowest sample dilution showing haemagglutination; specific HA (SHA) corresponded to HA divided by the protein concentration. Quantitative protein determination was performed according to Lowry et al., (1951). Carbohydrate binding specificity was determined by HA inhibition using several sugars (threulose, fucose, N-acetyl-D-glucosamine, mannose, glucose, fructose, galactose, rhamnose, saccharose) and glycoproteins (fetuin, ovalbumin, casein, fetal bovine, human and rabbit serum) as described by Coelho and Silva (2000). Rabbit erythrocytes were chosen for subsequent assays.

Lectin purification

C. ferrea pod were washed with distilled water, dried at room temperature, powdered in a multiprocessor and a 10 % (w/v) extract in 0.15 M NaCl was obtained by gentle shaking for 16 h, at 4 °C. The extract was passed through gauze, centrifuged (10.000 x g) for 15 min, mixed with

activated charcoal, filtered and submitted to 0 to 80 % (w/v) ammonium sulphate fractionation (F 0-80 %, F80) by addition of solid salt. After 4 h at room temperature, the resuspended precipitate was dialyzed against distilled water followed by 0.15 M NaCl (F80). A sample of F80 (8.7 mg / 500 μ l) was incubated (30 min) with chitin pre-equilibrated with 0.15 M NaCl containing 0.04 mM MgCl_2 (NaCl/Mg), applied to a chromatographic column (5.0 x 1.5 cm) and proteins of each fraction were measured by absorbance at 280 nm. Unbound proteins were eluted with NaCl/Mg and adsorbed proteins were eluted with 1.0 M NaCl containing 0.04 mM MgCl_2 followed by 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 ions

CfePL samples were submitted to a defined temperature (30 °C – 100 °C) and after incubation (30 min) HA was determined using 0.15 M NaCl as diluent. Different pH solutions (citrate phosphate buffer, pH 2.0 – 4.5; sodium phosphate buffer, pH 5.0 – 8.0; Tris-HCl buffer, pH 8.5 – 10 and NaOH, pH 10 – 12) and CaCl_2 or MgCl_2 solutions (0.01 – 0.04 M) were used to dilute CfePL samples in HA assay; after incubation (45 min) rabbit erythrocytes were added.

Molecular mass determination

Mr of CfePL (1mg/ml) in 2ml volume was determined in a ÄKTA FPLC system (Pharmacia Fine Chemicals) using a Sephacryl S-300 (Pharmacia Biotech) column (120 ml, 60 x 16 mm), 3 ml of fractions, 0.6 ml/min and 168 ml for 0.5 M NaCl elution. A mixture of bovine serum albumin (67 kDa), fetuin (64 kDa), ovalbumin (44 kDa) and ovomucoid (28 kDa) were used as standard proteins.

Electrophoresis

Native PAGE for basic and acid protein was performed by Reisfeld et al. (1962) and Davis (1964), respectively. Denaturated samples, reduced or not, were evaluated by SDS-PAGE according to Laemmli (1970). The standard marker proteins used were Phosphorilase B (94 kDa), bovine serum albumin (67 kDa), ovalbumin (43 kDa), carbonic anhydrase (30 kDa), soybean trypsin inhibitor (20.1 kDa) and α -lactalbumin (14.4 kDa), purchased from Pharmacia Fine Chemicals. The gel was stained with silver stain according to Heukeshoven and Dernick (1985).

Inocula preparation

Bacteria were inoculated in Nutrient Broth and fungi in Sabouraud Dextrose Broth. Bacteria (24 h at 37 °C) and fungi (48 h at 28 °C) growth were maintained in an orbital shaker. Bacteria were harvested during the exponential growth phase and their concentration, determined by OD measurements at 600 nm. All microorganisms were adjusted to 10^5 colony forming units (CFU) per ml^{-1} .

Antibacterial and antifungal assays

Antimicrobial activity of CfePL were investigated by the disc diffusion method (Bauer et al., 1966). The antimicrobial screening was performed using Nutrient Agar (NA) for bacteria and Sabouraud Dextrose Agar (SDA) for fungi. Warmed medium (100 ml, 43°C) and 0.5 mL of inoculum (10^5 colony/ml) were added; solution was distributed in sterile Petri plates (90 X 15 mm) in portions of 10 mL and allowed to solidify. Following, 15 μl of CfePL solution (100

µg/ml) were impregnated on sterile paper discs with 6 mm diameter and placed on agar. Discs containing 15 µl of sterile saline solution (0.9% w/v) were used as negative control and discs of chlorophenicol and cyclohexamide, both with 5 mg/ml, were used as positive control for bacteria and for fungi, respectively. Plates were incubated at 37 °C for 24 h (bacteria) and 28 °C for 48 h (fungi). A transparent ring around the paper disc reveals antimicrobial activity. Zones of growth inhibition around discs were measured in mm.

Statistical analysis

Result of four independent experiments were expressed as average $\pm$ standard deviation ($X \pm sd$), and submitted to variance analysis and Tukey test. Values compared at the significance level of $p \leq 0.05$ were considered to be statistically valid as follows: similar letters (*a* or *b*) mean $p > 0.05$; different letters (*a* and *b*) mean $p \leq 0.05$.

Minimum inhibitory concentration (MIC)

Minimum inhibitory concentration (MIC) of CfePL was tested by a serial dilution method. CfePL (0.2 ml) of stock solution (100 µg/ml) was incorporated into assay tube containing 1.9 ml of Nutrient Broth for bacteria and Sabouraud Dextrose Broth for fungi and 0.1 ml of standardized suspension of test organism being serially double diluted to achieve 20, 10, 5 and 2.25 µg/ml. Control tube contained only microorganisms and medium. The culture tubes were incubated at 37 °C for 24 h (bacteria) and 28 °C for 48 h (fungi). The lowest

concentrations, which did not show any growth of tested organism after macroscopic evaluation was determined as MIC.

Minimum bactericidal concentration (MBC) and minimum fungicidal concentration (MFC)

All tubes used in MIC evaluation that did not show any growth of bacteria or fungi after incubation period subcultured on to the surface of freshly prepared Nutrient Agar (for bacteria) and Sabouraud Dextrose Agar (for fungi) plates were incubated at 37 °C for 24 h (bacteria) and 28 °C for 48 h (fungi). MBC and MFC were recorded as the lowest concentration of CfePL that did not allow any visible bacteria and fungal colony growth on appropriate agar plate after incubation period.

Reference

- Bacchi, E. M., Setie, J.A., 1995. Anti-ulcer action and toxicity of *Styrax camporum* and *Caesalpinia ferrea*. *Planta Medica* 60, 118 – 120.
- Balch, A., 1972. *As Plantas que curam*. Três Press, São Paulo, p. 302 –303.
- Banerjee, S., Chaki, S., Bhowal, J., Chatterjee, B. P., 2004. Mucin binding mitogenic from freshwater Indian gastropod *Belamya bengalensis*: purification and molecular characterization. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 421, 125 – 134.
- Barondes, S. H., 1988. Bifunctional properties of lectins: lectins redefined. *Trends in Biochemical Science*, 13: 480 – 482.

- Beltrão, E. I. C., Medeiros, P. L. Rodrigues, O. G., Figueiredo-Silva, J., Valença, M. M., Coelho, L. C. B. B., Carvalho Jr, L. B., 2003. *Parkia pendula* lectin as histochemistry marker for meningotheelial tumour. *European Journal of Histochemistry*, 47, 2, 139 – 142.
- Bing, D H.; Weyand, J. M. Stanislawski, A. B., 1967. Hemagglutination with aldehyde - fixed erythrocytes for assay of antigens and antibodies. *Proc. soc. Cyp. Biol. Med.*, 124, 1166 –1170.
- Bukantz, C. S. C., Rein, L. C. C. R., Kent, J. F., 1946. Studies in complement fixation Preservation of shepp's blood in dextrose mixtures (modified Alsever's solution) for use in the complement fixation reaction. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, Saint Louis. 31, 349 – 399.
- Broekaert, W. F., Parijs, J.V., Leyns, F., Joos, H., Peumans, W. J., 1992. A chitin-binding lectin from stinging nettle rhizomes with antifungal properties, *Science*, 245, 1100 – 1102.
- 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 analgesic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 53, 175 –178.
- 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.
- 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.
- Davis, B. J., 1964. Disc eletrophoresis II: Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121, 404-427.
- Franco-Fraguas, 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, 000-000.

- Feton-Navarro, B., Arreguín-L, B., Garcá-Hernández, E., Heimer, E. Aguilar, M. B., Rodríguez-A, C., Arreguín-Espinosa, R., 2003. Purification and structural characterization of lectins from the cnidarian *Bunodeopsis antillienis*. *Toxicon*, 43, 525 - 532.
- Fock, W. L., Chen, C. L., Lam, T. J., Sin, Y. M., 2001. Roles of an endogenous serum lectin in the immune protection of blue gourami, *Trichogaster trichopterus* (Pallus) against *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunology*, 11, 101 - 113.
- 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.
- 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.
- Heukeshoven, J., Dernick, R., 1985. Simplified methods for silver stain of protein in polyacrylamide gel and mechanism of silver stain. *Electrophoresis*, 6, 103 – 112.
- Hong, M., Cassely, A., Mechref, Y., Novotny, M. V., 2001. Sugar-lectin interactions investigated through affinity capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B*, 752, 207-216.
- Kawagishi, H., Nomura A., Mizumo T., Kimura A., Chiba S., 1990. Isolation and Characterization of a lectin from *Grifola frondosa* fruiting bodies. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1034, 247 –252.
- 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.

- Laemmli, U. K., 1970 Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-5.
- 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.
- Lima, V. L. M., Correia, M. T. S., Cechinel, Y. M. N., Sampaio, C. A., Owen, J. S. And Coelho, L. C. B. B., 1997. Immobilized *Cratylia mollis* lectin as potential matrix to isolate plasma glycoproteins Including lecithin cholesterol acyltransferase. *Carbohydrate Polymers*. 31, 892, 27 - 32.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. And Randall, R. J., 1951 Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193, 265.
- Macedo, M., L. R., Freire, M. G. M., Novello, J. C., Maragoni, S., 2002. *Talisia esculenta* lectin and larval development of *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes*. *Biochimical et Biophysycal Acta*, 1571, 2, 83 – 88.
- 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.
- Mizumo, M., Noguchi, M., Imai, M., Motoyoshi, T., Inazu T., 2004, Interaction assay oligosaccharide with lectins using glycosylasparagine. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 14, 485 – 490.
- Mo, H., Van Damme, E. J. M., Peumans, W. J., Goldstein, I. J.,1993. Purification and characterization of a monnose-specific lectin from shallot (*Allium ascalonicum*) bulbs. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 306, 2, 431-438.

- Nagai, P. H. K., Ng, T.B., 2004. A mushroom (*Gonoderma canpense*) lectin with spectacular thermostability, potent mitogenic activity on splenocytes, and antiproliferative activity toward tumor cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 314, 988 – 993.
- Naeen, A., Khan, R. H., Vikram, H. Akif, M., 2001. Purification of *Cajanus cajan* root lectin and its interaction with rhizobial lipopolysaccharide as studied by different spectroscopic techniques. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 396, 1, 99 -105.
- Nagashima, Y., Kikuchi, N., Shimakura, K., Shiomi, K., 2003. Purification and characterization of an antibacterial protein in the skin secretion of rockfish *Sebastes schlegeli*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 136, 63 –71.
- Oliveira, M. L., Beltramini, L. M., Simone, S. G., Brumano, M. H. N., Silva-Lucca, R. A., Nakaema, M. K. K., Pires, C. V., Oliveira, M. G. A., 2003. Purification and parcial characterization of a lectin from *Caesalpinia trinctoria* Domb, ex. Dc fruits. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 119-122.
- Ottinger, C. A., Johson S. C., Ewart K. V., Brown L. L., Ross N. W., 1999. Enhancement of anti- *Aeromonas salmonicida* activity in Atlantic salmon (*Salmo salar*) macrophages by a mannose-binding lectin. *Comparative Biochemistry and Physiology Part (C)*, 123, 53 - 59.
- 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.
- Peumans, W. J., Van Damme, E. J. M., 1995. Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiology*, 109. 347 - 352.
- Reisfeld, R. A. et al., 1962. Disk eletrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. *Nature*, 195, 281-283.

- 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.
- Tasumi, S., Yang, W-J., Usami, T., Tsutsui, S., Ohira, T., Kawazoe, I., Wilder, M. N., Aida, K., Suzuki, Y., 2004. Characteristics and primary structure of galactin in the skin mucus of the Japanese eel, *Anguilla japonica*. Developmental Comparative Immunology, 28, 325 - 335.
- Thomas, G., Araujo, C. C., Souza, P. S., 1988. Avaliação das atividades antiinflamatória, analgésica e antipirética dos extratos aquosos de *Caesalpinia ferrea*, *Plantago major*, *Polygonum acre* e *Pterodon polygaefloras*. 10th Brazilian Symposium in Medicinal Plants. São Paulo, Brazil.
- 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.
- Wang, H. X., Ng, T. B., 2003. Purification of Castamollin, a novel antifungal protein from Chinese chestnuts. Protein Expression & Purification, 32, 44 - 51.
- Weis, W. I., Drickamer, K., 1996. Structural basis of lectin – carbohydrate recognition. Annual Reviews in Biochemistry, 65, 441-473.
- Wititsuwannakul, R., Wititsuwannakul, D. and Skulborirug, C., 1998. Lectin from the bark of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*). Phytochemistry, 2 (47), 183-187.
- www.vidal.fr, accessed at 2004 February nine.
- www.santosflora.com.br, accessed at 2004 February nine.
- www.pharmacotecnica.com.br, accessed at 2004 February nine.
- www.napie.com.br, accessed at 2004 February nine.
- www.herbário.com.br, accessed at 2004 February nine.
- www.aromastropicais.hpg.ig.com.br, accessed at 2004 February fifteen.

Figure 1

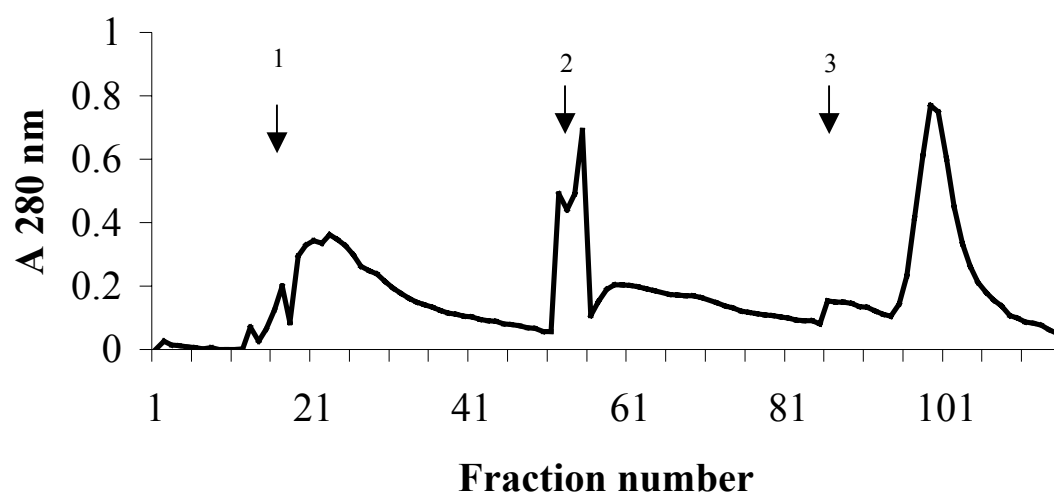


Figure 2

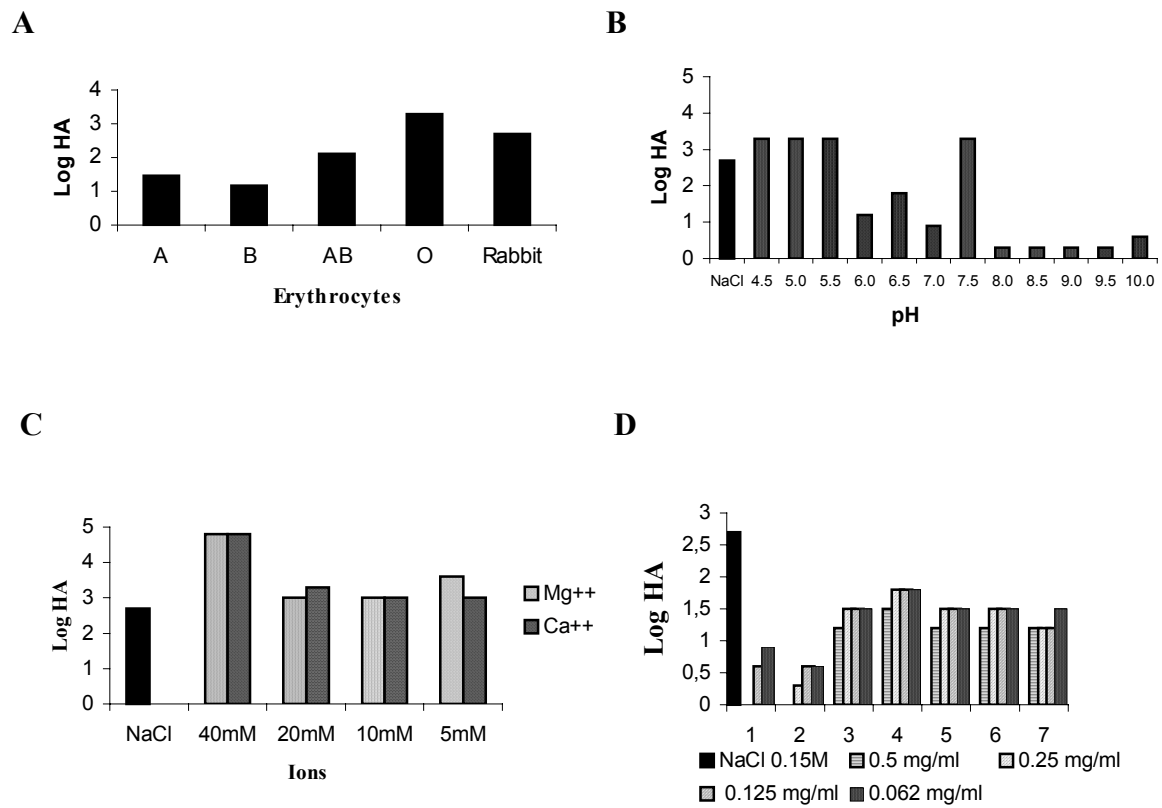


Figure 3

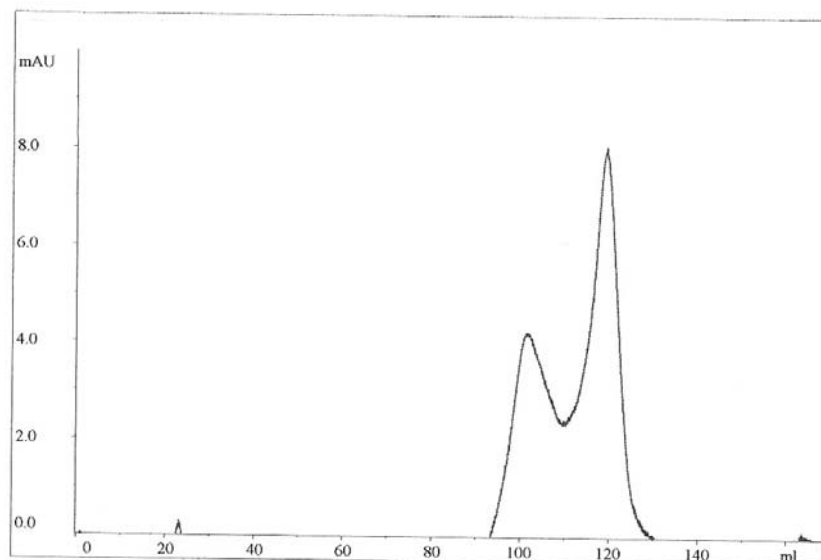


Figure 4

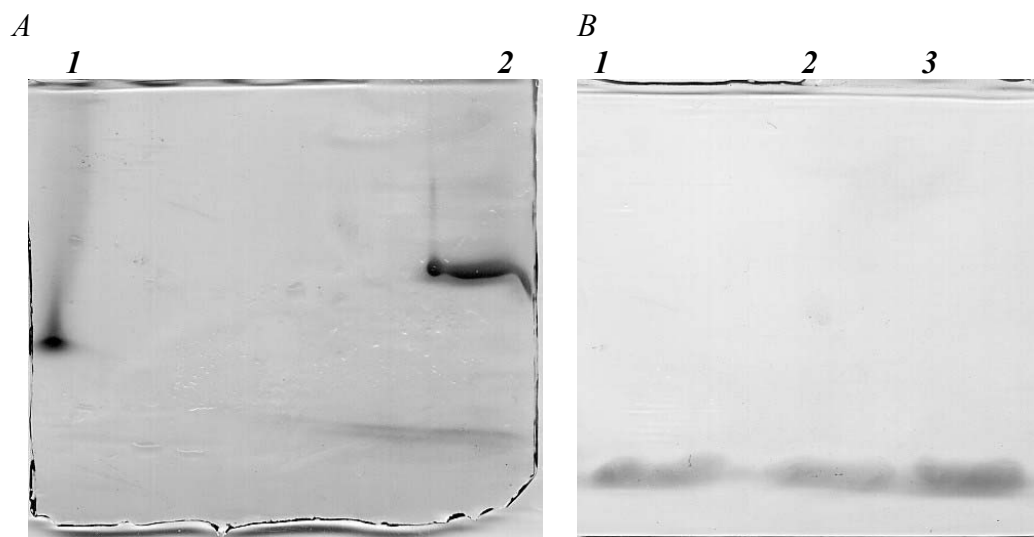


Figure 5

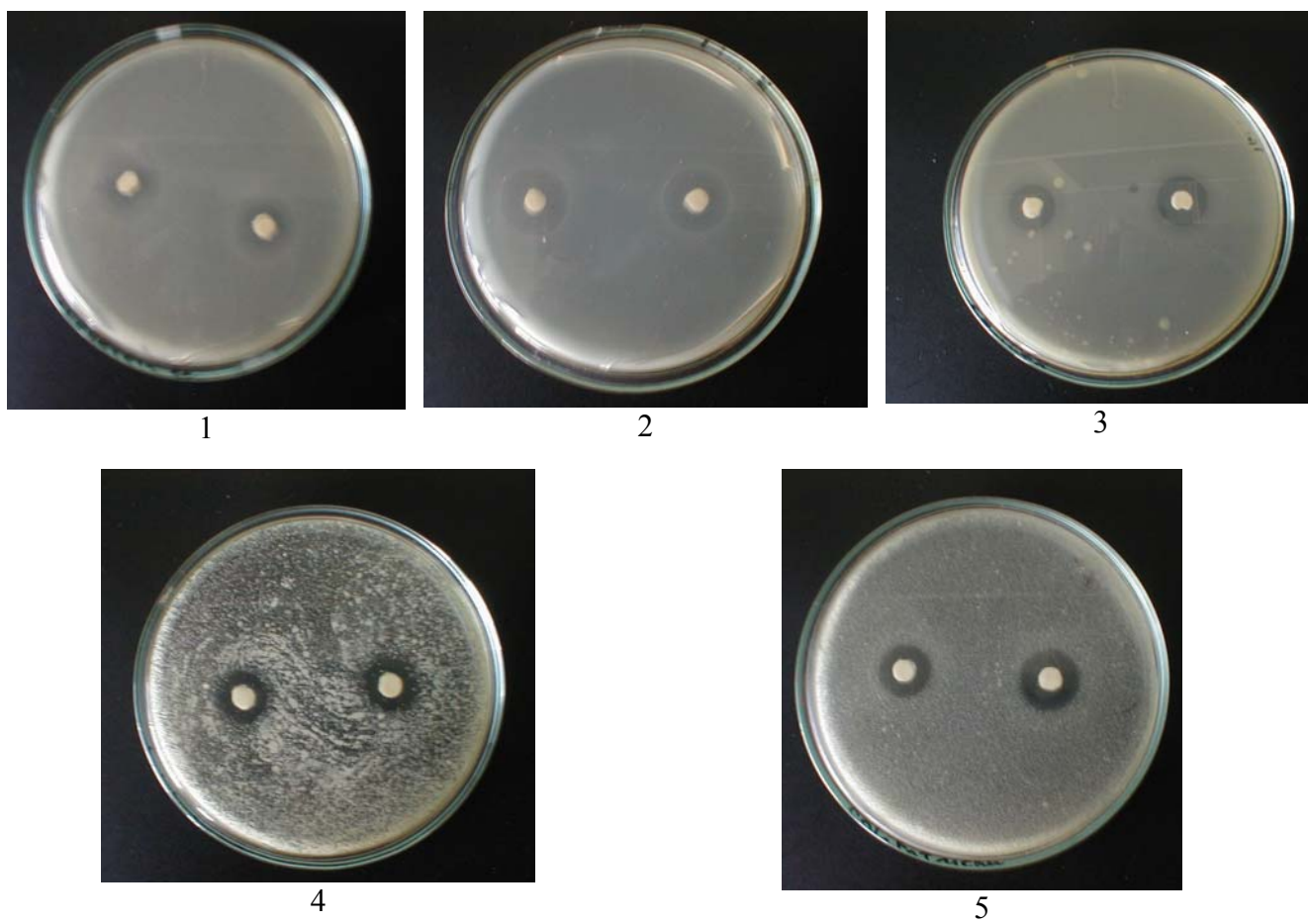


Table 1

Microorganisms	
Bacteria	Local provided
<i>Bacillus subtilis</i>	DAUFPE
<i>Bacillus</i> sp.	UFRPE
<i>Corynebacterium</i> sp.	UFRPE
<i>Escherichia coli</i>	UFRPE
<i>Klebsiella</i> sp.	UFRPE
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	UFRPE
<i>Staphylococcus aureus</i>	DAUFPE
<i>Streptococcus</i> sp.	UFRPE
Fungi	
<i>Aspergillus niger</i>	DAUFPE
<i>Candida albicans</i>	DAUFPE
<i>Coletotrichum gloesporioides</i>	DAUFPE
<i>Trichoderma viride</i>	DAUFPE

Stock cultures were maintained on Nutrient Agar medium (bacteria) and on Sabouraud Dextrose Agar medium (fungi), at 4 °C. All microorganisms were obtained from clinical material and provided by Departamento de Antibióticos (DAUFPE), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), and Laboratório de Microbiologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). *In vitro*, antibacterial activity was determined by using Nutrient Agar and Nutrient Broth (10 g peptone, 5 g yeast extract per liter of distilled water) and antifungal activity was determined by using Sabouraud Dextrose Agar and Sabouraud Dextrose Broth (10 g Glicose, 10 g peptona per liter of distilled water).

Table 2

Summary of CfePL purification

Sample	Volume (ml)	Protein (mg/ml)	HA ^a	SHA	Purification
EP	57	43.2	2048	47	1
F80	20	17.4	2048	117	2.5
CfePL	12	0.1	512	5120	22*

^aThe lectin hemagglutinating activity (HA) was measured with glutaraldehyde treated rabbit erythrocytes. Specific HA = SHA.

* In relation to F80 (500 µl) applied in chitin column.

Table 3

Antimicrobial activity of CfePL

Microorganism	Inhibition halo (mm) ^a
<i>Bacterium</i>	
<i>Bacillus subtilis</i>	11.00 ± 3.5 ^b
<i>Bacillus</i> sp.	11.25 ± 1.7 ^b
<i>Corynebacterium</i> sp.	10.25 ± 0.5 ^b
<i>Escherichia coli</i>	16.75 ± 0.5 ^a
<i>Klebsiella</i> sp.	13.00 ± 0.8 ^a
<i>Staphylococcus aureus</i>	10.25 ± 1.5 ^b
<i>Streptococcus</i> sp.	13.75 ± 3.3 ^a
<i>Fungal</i>	
<i>Aspergillus niger</i>	12.87 ± 0.9 ^b
<i>Candida albicans</i>	08.62 ± 0.3 ^b
<i>Coletotrichum gloesporioides</i>	17.25 ± 1.5 ^a
<i>Trichoderma viride</i>	15.50 ± 1.3 ^a

^a Mean of four assays.Similar letters (*a* or *b*) mean $p > 0.05$; different letters (*a* and *b*) mean $p \leq 0.05$.

Figure 1 – Elution pattern of F80 on chitin column.

A sample (8.7 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 NaCl (2) and 1 M acetic acid (3).

Figure 2 – Hemagglutinating activity of CfePL in presence of different erythrocytes (A), pH values (B), ions (C) and glycoproteins (D), rabbit serum (1) bovine fetal serum (2), ovalbumin (3), fetuin (4), casein (5), colostrum (6) and human serum (7). Log HA of CfePL in 0.15 M NaCl with rabbit erythrocytes was 2.7.

Figure 3 - Elution pattern of CfePL on Sephacryl S-300 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 4 – Polyacrylamide gel electrophoresis for basic and native proteins (A) as well as SDS-PAGE under denatured and reduced conditions (B). CfePL (1) and cytochrome c (2), contained 250 and 20 µg, respectively; protein was stained with Amido black according Reisfeld et al. (1962); Samples of CfePL (3) and after CfePL Sephacryl S-300 column, peak 1 (4) and peak 2 (5) contained 250 µg of protein. Protein was stained with silver stain according to Heukeshoven et al, 1985.

Figure 5 – Antimicrobial activity of CefPL (1.5 µg) against *Klebsiella* (1), *Escherichia coli* (2), *Streptococcus* sp. (3) bacteria and *Colletotrichum gloesporioides* (4) and *Trichoderma viride* (5) fungi.

5 CONCLUSÕES

- As vagens de *C. ferrea* contêm uma proteína com atividade hemaglutinante (CfePL);
- Cromatografia em coluna de quitina foi eficiente na obtenção de CfePL com um alto rendimento em proteínas;
- CfePL não é específica para eritrócitos humanos, apresenta elevada estabilidade térmica, é estimulada pela presença de íons (Ca^{2+} e Mg^{2+}) e é sensível a variações de pH;
- A atividade da lectina é parcialmente inibida por carboidratos (sacarose, N-acetilglicosamina, fucose, frutose, galactose, trealose, raminose, manose), ovoalbumina, caseína, fetuína e glicoproteínas de soros fetal bovino, coelho e humano;
- CfePL foi resolvida em dois picos protéicos de massa molecular de 43 e 31 kDa, respectivamente, por gel filtração em coluna de Sephacryl S-300;
- Eletroforese em gel de poliacrilamida revelou a natureza altamente básica de CfePL. Em condições desnaturantes e redutoras apresenta uma banda principal de massa molecular $\sim 14,4$ kDa, similar as bandas correspondentes as duas frações obtidas na coluna de Sephacryl ;
- CfePL apresentou atividade antibacteriana e antifúngica de amplo espectro, podendo ser considerada um potente agente antimicrobiano.

6 Anexos

6.1 Trabalho apresentado na XXXII Reunião Anual da SBBq, Caxambu, MG.

6.2 Trabalho a ser apresentado na XXXIII Reunião Anual da SBBq, Caxambu, MG.

6.3 Instruções para autores do periódico *Phytochemistry*

EXTRACTION, PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF A PERICARP LECTIN (S) FROM *Caesalpinia ferrea*

Ximenes, N. C. A., Coelho, L. C. B. B. & Correia, M. T. S.

Departamento de Bioquímica – CCB/UFPE – 50670-910, Recife, PE, Brasil.

Lectins are proteins that bind specifically and reversibly to carbohydrates. Those purified proteins have been used in biological and medical investigations. *Caesalpinia ferrea* is a tree broadly distributed in Brazil. The aim of this work was the extraction, purification and characterization of a pericarp lectin (s) from *C. ferrea*. The hemagglutinating activity (HA) of 10 % (w/v) pericarp extracts (PE) in 0.15 M NaCl and citrate phosphate buffer, pH 6.0 were evaluated with different erythrocytes. The HA of dialyzed fractions was assayed with human and rabbit erythrocytes, carbohydrates and glycoproteins. The highest HA (2048, rabbit and human type A erythrocytes) was obtained with 0.15 M NaCl, with was fractioned with ammonium sulphate (F60-80% and F 0-80%). The later fraction was submitted to chitin chromatography. Partial inhibitions were detected with monosacharides; rabbit and fetal bovine serum totally inhibited HA. Chitin chromatography was performed in 0.15 M NaCl. Proteins were eluted with 0.15 M (unadsorbed), followed by sucrose and 1 M NaCl. Polyacrylamide gel electrophoresis under denatured/reduced conditions resolved PE and fractions in different bands. In conclusion, chitin chromatography purified the lectin in a main polypeptide band.

Supported by: CNPq

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF A *Caesalpinia ferrea* THERMOSTABLE POD LECTIN WITH ANTIMICROBIAL ACTIVITY

Ximenes, N. C. A., Paiva, P. M. G., Coelho, L. C. B. B., Carneiro-da-Cunha, M. G. & Correia, M. T. S.

Departamento de Bioquímica – CCB/UFPE – 50670-910, Recife, PE, Brasil.

e-mail: neilaximenes@bol.com.br

The aim of this work was the purification and characterization of *C. ferrea* pod lectin (CfePL). Pod extract (E) in 0.15 M NaCl was partially purified on activated charcoal followed by ammonium sulphate fractionation (0 – 80%, F80). Hemagglutinating activity (HA) of E and F80 were evaluated using different erythrocytes. F80 was chromatographed on chitin column and washed with 0.15 M NaCl followed by 1 M NaCl; CfePL was eluted with 1 M acetic acid (pH 4.0). CfePL HA was evaluated with ions (Ca^{++} and Mg^{++}), pH values (2 - 12), carbohydrates, glycoproteins and temperatures (30° - 100° C, 30 min). Molecular mass of native protein was determined in a ÄKTA FPLC system using a Sephacryl column; CfePL preparations were evaluated by PAGE for acidic and basic native protein, as well as under denatured and reduced conditions. CfePL antimicrobial activity was performed with strains of Gram-positive (5) and Gram-negative (3) bacteria or fungi (4). CfePL did not show specificity to human erythrocytes; rabbit erythrocytes (512) were used to HA evaluation. CfePL HA was stimulated by ions (65536); at different pH values, the best HA (2048) were obtained with citrate-phosphate (pH 4.5; 5.0 and 5.5) and phosphate (pH 7.5) buffer, been almost abolished at pH 9.0 (2.0). CfePL, active even after heating at 100°C, was partially inhibited by carbohydrates and ovalbumin, fetuin, casein and glycoproteins from rabbit, human and fetal bovine serum. CfePL, a basic protein, showed a main band by SDS-PAGE. ÄKTA FPLC system resolved two protein peaks with 43 and 31 KDa. CfePL inhibited growth of tested microorganisms; best results (17 mm halo) were obtained with *Escherichia coli* and *Colletotrichum gloespories*. In conclusion, CfePL, purified in milligram quantities, was a powerful antimicrobial agent of low cost, with wide spectrum of action.

Supported by: CNPq.

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 0EX;

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