



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

ALINE DE SOUZA CARVALHO VALENTIM

**PLANTAS DA CAATINGA COMO FONTES DE ATIVIDADES ANTIOXIDANTE,
ANTIBACTERIANA, INIBIDORA DE TRIPSINA E LECTÍNICA. ISOLAMENTO DE
LECTINA DE SEMENTES DE *Apuleia leiocarpa* (VOGEL) J.F. MACBRIDE**

Recife

2017

ALINE DE SOUZA CARVALHO VALENTIM

**PLANTAS DA CAATINGA COMO FONTES DE ATIVIDADES ANTIOXIDANTE,
ANTIBACTERIANA, INIBIDORA DE TRIPSINA E LECTÍNICA. ISOLAMENTO DE
LECTINA DE SEMENTES DE *Apuleia leiocarpa* (VOGEL) J.F. MACBRIDE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção parcial das exigências para obtenção do título de Doutor em Bioquímica e Fisiologia.

Área de Concentração: Bioquímica e Fisiologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Tereza dos Santos Correia.

Coorientadora: Prof^a Dr^a Márcia Vanusa da Silva.

Recife

2017

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Valentim, Aline de Souza Carvalho

Plantas da caatinga como fontes de atividades antioxidante, antibacteriana, inibidora de tripsina e lectínica, isolamento de lectinas de sementes de *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J. F. Macbride / Aline de Souza Carvalho Valentim. - 2017.

124 f. : il.

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Tereza dos Santos Correia.

Coorientadora: Prof^a Dr^a Márcia Vanusa da Silva.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia, Recife, 2017.

Inclui referências e apêndices.

1. Plantas da Caatinga. 2. Leguminosa. 3. Lectinas. 4. Inibidores de tripsina. I. Correia, Maria Tereza dos Santos (orientadora). II. Silva, Márcia Vanusa da (coorientadora). III. Título.

634.90981

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2020-082

ALINE DE SOUZA CARVALHO VALENTIM

**PLANTAS DA CAATINGA COMO FONTES DE ATIVIDADES ANTIOXIDANTE,
ANTIBACTERIANA, INIBIDORA DE TRIPSINA E LECTÍNICA. ISOLAMENTO DE
LECTINA DE SEMENTES DE *Apuleia leiocarpa* (VOGEL) J.F. MACBRIDE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção parcial das exigências para obtenção do título de Doutor em Bioquímica e Fisiologia.

Aprovada em: 16/02/2017.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof^a. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco- UFPE

Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco- UFPE

Prof^o Dr. Romero Marcos Pedrosa Brandão (Examinador Externo)
Universidade Federal Rural de Pernambuco- UFRPE

Dra. Carolina Barbosa Malafaia (Examinadora Externa)
Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste – CETENE

*Dedico este trabalho a todos
que um dia venham beneficiar-se dele
de maneira honesta e digna.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pois é nEle que tenho encontrado vida e razões para vivê-la. É Ele quem tem me dado alegria, esperança e força para seguir em frente. É Ele quem tem me instruído e ensinado o caminho que devo seguir e com Seus olhos tem me guiado (Salmo 32:8).

Aos meus pais, Cláudio e Eva, pelo imenso amor todos esses anos, pelos valores ensinados, pelo apoio, investimento, paciência e assistência incansável ao longo de todos esses árduos anos de estudo, desafios, esforços e conquistas. Todo empenho de vocês por mim sempre foi visando meu sucesso e felicidade, portanto, todas essas conquistas que tenho obtido também são de vocês.

Ao meu marido, Renato, pelo amor, paciência, apoio e compreensão também nesta etapa. Obrigada por acreditar em mim, por escolher fazer parte dos meus dias e querer construir uma história juntos.

Aos meus amigos fora do contexto acadêmico dos quais conseqüentemente me ausentei esses anos em prol de mais este trabalho.

Aos vários colegas que ganhei nos laboratórios de Glicoproteínas, Biotecnologia, Biologia Molecular, Produtos Naturais nesses seis anos de pós-graduação. Sou grata pela ajuda que recebi de cada um e pela paciência nos experimentos.

Guardarei em meu coração com muito carinho Isabel Renata, Carol Malafaia, Priscilla Sales, Mychelly Melo, Raiana Apolinário e Marthyna Souza que são presentes da época do mestrado. Joelma Pessoa, Bruna Cordeiro e Francinete Cavalcanti que são presentes da época do doutorado. Vocês contribuíram para que essa trajetória fosse menos árdua. Com vocês dividi alegrias e lágrimas. Obrigada por terem entrado em minha vida e espero que fiquem nela para sempre!

Ao encerrar este ciclo profissional em minha vida, gostaria de fazer menção a pessoas que tive a honra de conhecer, pois marcaram minha trajetória pela competência, generosidade e disponibilidade. Pessoas as quais julgo serem exemplos a serem seguidos e desejo intensamente grandes conquistas e realizações na vida: Thiago Napoleão, Fernando Vaz, Marthyna Souza e Romero Brandão.

À minha orientadora Dra. Maria Tereza dos Santos Correia e co-orientadora Dra. Márcia Vanusa da Silva, por me acolherem quando precisei e por confiarem em mim. Muito obrigada por todo o apoio, investimento e orientação.

Às demais professoras e colaboradoras Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva (Laboratório de Glicoproteínas), Dra. Maria das Graças Carneiro Cunha (Laboratório de Biotecnologia) que cederam gentilmente suas estruturas e equipamentos para a realização dos experimentos.

Aos queridos funcionários do departamento de bioquímica Djalma, João, Miron e Dona Helena.

Ao Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste - CETENE por disponibilizar o espectropolarímetro e o extrator automático. Ao Profº. Dr. Luiz Alberto Lira Soares do Núcleo de Desenvolvimento Analítico e Tecnológico de Fitoterápicos – NUDATEF, no Departamento de Ciências Farmacêuticas - DCFar da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, que disponibilizou o cromatógrafo líquido de alta eficiência e viabilizou diversas análises deste projeto.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, à Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia de Pernambuco - FACEPE, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES e à UFPE pelo auxílio financeiro e incentivo à pesquisa.

“Não é sobre ter
Todas as pessoas do mundo pra si
É sobre saber que em algum lugar
Alguém zela por ti
É sobre cantar e poder escutar
Mais do que a própria voz
É sobre dançar na chuva de vida
Que cai sobre nós
[...]
Não é sobre chegar no topo do mundo
E saber que venceu
É sobre escalar e sentir
Que o caminho te fortaleceu
É sobre ser abrigo
E também ter morada em outros corações
E assim ter amigos contigo
Em todas as situações
[...]
Não é sobre tudo que o seu dinheiro
É capaz de comprar
E sim sobre cada momento
Sorrindo a se compartilhar
Também não é sobre correr
Contra o tempo pra ter sempre mais
Porque quando menos se espera
A vida já ficou pra trás

Segura teu filho no colo
Sorria e abraça teus pais
Enquanto estão aqui
Que a vida é trem-bala, parceiro
E a gente é só passageiro prestes a partir”

RESUMO

O baixo custo da medicina popular tradicional brasileira *versus* o seu benefício terapêutico aliado à falta de tratamento para determinadas doenças, seja por acesso ou inexistência, geralmente são as razões para a manutenção dessas tradições oriundas das culturas indígenas locais, influências européias e africanas recebidas durante a colonização. Na busca por novas moléculas ativas, levantamentos botânicos etno-dirigidos são eficientemente aplicados como ferramenta para seleção de plantas para a triagem farmacológica, onde é possível averiguar o potencial dos recursos vegetais sob diferentes aspectos, desde medicinais, industriais, até suas formas de uso através das gerações. *Apuleia leiocarpa* (Voguel) J. F. Macbride é uma árvore leguminosa (Fabaceae) com grande valor na indústria madeireira, agropecuária e com alguns relatos na literatura de uso medicinal como anti-sifilítico e anti-ofídico. Este trabalho inicia-se com uma triagem realizada com plantas encontradas na Caatinga buscando investigar novas fontes vegetais com potencial lectínico e atividade inibidora de protease. Em seguida, realizou-se a purificação, caracterização e a atividade antimicrobiana da lectina extraída de sementes da *Apuleia leiocarpa* (LeSApul) e do extrato aquoso (EA) de suas folhas. LeSApul foi obtida por cromatografia em coluna de quitina por eluição com ácido acético 1M. A LeSApul é uma proteína ácida com um peso molecular nativo de 55,8 kDa, termorresistente (100°C/2h), íon dependente (Mn^{2+}) e afinidade por N-acetilglicosamina, D(-)-arabinose e azocaseína. A LeSApul apresentou atividade bacteriostática e bactericida contra três variedades de *Xanthomonas campestris* (*X. c. pv. campestris*, *X. c. pv. malvacearum* e *X. c. pv. viticola*) como também inibiu cepas Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*) e Gram-positivas (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*) de patógenos humanos. Os taninos condensados e flavonóides presentes no extrato aquoso (EA) das folhas da *A. leiocarpa*, confirmados em CLAE-DAD/EM, apresentaram acentuada capacidade antioxidante através dos ensaios de captura dos radicais de ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina)6-ácido sulfônico), de redução do radical DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazil) e de redução do íon molibdênio (VI) a molibdênio (V). Estes polifenóis apresentaram atividade bacteriostática contra *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis* e *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, onde o melhor desempenho contra a cepa padrão e isolados clínicos multi-resistentes de *Staphylococcus aureus*. EA diminuiu a síntese de estafiloxantina, pigmento

carotenóide que estabiliza a membrana bacteriana, gerando um extravazamento proteico e uma cinética de crescimento decrescente nas células nas primeiras 4h de incubação.

Palavras-chaves: Lectina. Inibidores de tripsina. Flavonóides. *Xanthomonas campestris*. *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

The low cost of traditional Brazilian popular medicine *versus* its therapeutic benefit combined with the lack of treatment for some diseases, either by access or non-existence, are generally the reasons for maintaining these traditions from local indigenous cultures, European and African influences received during the colonization. In the search for new active molecules, ethno-directed botanical surveys are efficiently applied tool for plant selection for pharmacological screening, where it is possible to verify the potential of plant resources under different aspects, from medicinal, industrial and their forms of use through generations. *Apuleia leiocarpa* (Voguel) J. F. Macbride is a leguminous tree (Fabaceae) with great value in the timber, agricultural and livestock industry and with some reports in the medical literature as anti-syphilitic and anti-snakebite. This work begins with a screening carried out with plants found in the Caatinga, exploring new plant sources with lectin potential and protease inhibitory activity. Then, the purification, characterization and antimicrobial activity of the lectin extracted from seeds of *Apuleia leiocarpa* (ApulSL) and from the aqueous extract (AE) of its leaves. ApulSL was obtained by chitin column chromatography eluted by 1M acetic acid. ApulSL is an acid protein with a native molecular weight of 55.8 kDa, heat-resistant (100°C/2h), ion dependent (Mn^{2+}) and N-acetylglucosamine, D(-)-arabinose and azocasein affinity. ApulSL showed bacteriostatic and bactericidal activity against three *Xanthomonas campestris* varieties (*X. c. pv. campestris*, *X. c. pv. malvacearum* e *X. c. pv. viticola* as well as inhibiting Gram-negative strains (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*) and Gram-positive (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*) human pathogens. The condensed tannins and flavonoids found in the aqueous extract (AE) of the leaves of *A. leiocarpa*, confirmed in HPLC-DAD/MS, exhibited a marked antioxidant capacity through the ABTS (2,2'-azinobis (3- ethylbenzothiazoline) 6-sulfonic acid) radical capture test, DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazil) radical reduction and molybdenum (VI) ion reduction to molybdenum (V). These polyphenols showed bacteriostatic activity against *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus saprophyticus* *saprophyticus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis* and *Xanthomonas campestris* *pv. campestris*, where the best performance was against the standard strain and multi-resistant clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. A decreased the synthesis of staphyloxanthin, a carotenoid pigment that

stabilizes the bacterial membrane, generating protein breakdown and decreasing growth kinetics in cells in the first 4h of incubation.

Keywords: Lectin. Trypsin inhibitors. Flavonoids. *Xanthomonas campestris*. *Staphylococcus aureus*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 -	Nomes populares da <i>Apuleia leiocarpa</i> (Vogel) J.F. Macbride nos estados brasileiros e em alguns países.	20
Figura 1 -	Distribuição geográfica da <i>Apuleia leiocarpa</i> .	21
Figura 2 -	<i>Apuleia leiocarpa</i> (Vogel) J.F. Macbride (A); tronco cilíndrico ou irregular casca externa pardo-acinzentada e provida de marcas arredondadas ou irregulares bem características (B); fruto (direita) e semente (esquerda) (C); inflorescência (D); ramos com folhas e frutos (E).	23
Figura 3 -	Resumo do ciclo biossintético dos metabólitos secundários.	27
Figura 4 -	Representação esquemática da ligação da lectina a um carboidrato (A). As linhas pontilhadas representam pontes de hidrogênio	32
Figura 5 -	Esquema representando a aglutinação de eritrócitos promovida por lectinas. Rede de aglutinação formada pela ligação de uma lectina aos carboidratos da superfície dos eritrócitos (A). Inibição da formação da rede de aglutinação por carboidratos livres.	32
Figura 6 -	Formação do biofilme é um processo de desenvolvimento complexo envolvendo cinco etapas. Etapa 1 - adesão inicial; 2 - adesão irreversível; 3 - maturação I; 4 - maturação II; 5 - dispersão. Cada etapa do desenvolvimento está acompanhada com a microfotografia do desenvolvimento do biofilme de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Todas as microfotografias são exibidas na mesma escala.	41

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 OBJETIVOS.....	16
1.1.1 Objetivos Gerais	16
1.1.2 Objetivos Específicos	16
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
2.1 PLANTAS MEDICINAIS E ESTUDOS ETNOBOTÂNICOS.....	17
2.2 <i>Apuleia leiocarpa</i> (VOGEL) J.F. MACBRIDE	19
2.2.1 Distribuição geográfica.....	21
2.2.2 Características botânicas e bioquímicas.....	22
2.2.3 Aplicações.....	24
2.3 METABOLISMO PRIMÁRIO E SECUNDÁRIO.....	25
2.3.1 Lectinas.....	28
2.4.2 Inibidores de Proteases.....	35
2.4.3 Atividade Antioxidante	36
2.4.4 Atividade Antimicrobiana	37
2.5.1 Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB).....	38
2.5.2 Biofilmes	40
3 MÉTODO	44
4 RESULTADOS.....	45
4.1 ARTIGO 1 - “Screening of Caatinga plants as sources of lectins and trypsin inhibitors”.....	45
4.2 ARTIGO 2 - “Purification, characterization and antibacterial potential of a lectin isolated from <i>Apuleia leiocarpa</i> seeds”.....	50
4.3 ARTIGO 3 - “Polyphenols of <i>Apuleia leiocarpa</i> (Vogel) J.F. Macbride leaves: phytochemical analysis, antioxidant and antibacterial activities”.....	57
5 CONCLUSÕES.....	89
REFERÊNCIAS.....	91
APÊNDICE - A: SUPPLEMENTARY MATERIAL	117

1 INTRODUÇÃO

O homem usufrui do ambiente no qual se encontra em benefício próprio desde épocas remotas e as plantas têm se relacionado com o homem mediante suas necessidades de sobrevivência (ALBUQUERQUE, 2005). A medicina tradicional ainda é bastante praticada em pequenas comunidades carentes onde plantas são a única alternativa disponível para combater enfermidades (MENALE et al., 2016; SILVA et al., 2015), onde a dificuldade de acesso ou inexistência de tratamentos convencionais para determinadas doenças e o baixo custo *versus* o benefício terapêutico geralmente são as razões para a manutenção dessas tradições (MENALE et al., 2016).

A busca por plantas com o objetivo de obter novas moléculas ativas pode acontecer através de diferentes abordagens: a abordagem randômica, a quimiotaxonômica, a de amostragem étnico-dirigida e a baseada em tecidos específicos de plantas (ALBUQUERQUE; HANAZAKI, 2006; COTTON, 1996). Entretanto, estudos comparativos têm mostrado que a abordagem mais eficaz para a obtenção novas moléculas de origem vegetal é o levantamento etno-dirigido que investiga o uso de diferentes espécies e tecidos vegetais por uma população através das gerações, utilizando o consenso de informações (SILVA, 2013).

A Caatinga tem se mostrado mais promissora para estudos de bioprospecção que outros domínios fitogeográficos (ALMEIDA et al., 2012) e a sua flora tem se destacado na medicinal popular pelas propriedades anti-inflamatória, cicatrizante e antioxidante. Essas propriedades estão aparentemente relacionadas aos compostos fenólicos, presentes em praticamente todos os grupos de plantas da região (ALMEIDA et al. 2005; MONTEIRO et al., 2006).

Apuleia leiocarpa (Vogel) J.F. Macbride é uma árvore pertencente à família Fabaceae (Caesalpinioideae) (LEWIS et al., 2005) conhecida vulgarmente por grápia, tem uma distribuição muito ampla na América do Sul, habitando preferencialmente solos bem drenados (MARCHIORI, 1997), sendo encontrada na Caatinga. Tem usos múltiplos na indústria madeireira (LORENZI, 2002), em sistemas agroflorestais (SOUZA et al., 1994), produção de substâncias tanantes na indústria de curtumes (CARVALHO, 2003) entre outros empregos.

Tendo em vista a promissora diversidade vegetal brasileira e a riqueza do metabolismo vegetal, neste trabalho foi feito um levantamento de plantas encontradas na Caatinga investigando potenciais atividade lectínica e inibidora de protease, além de substâncias ativas na *Apuleia leiocarpa* até então não conhecidas, visando sua aplicabilidade na terapêutica.

As lectinas, oriundas do metabolismo primário, estão amplamente distribuídas na natureza, estando presentes em todos os reinos. São moléculas com a habilidade de ligação a mono e oligossacarídeos, com uma variedade de aplicações: atividade imunoregulatória (DEÁK et al., 2015; DE LA FUENTE et al., 2014; KOVÁCS-SÓLYOM et al., 2010), antiinflamatória (MELO et al., 2010), pró-inflamatória (ELIFIO-ESPOSITO et al., 2011) antitumoral (DAMASIO et al., 2014; FANG et al., 2010; NOLTE et al., 2012; NUNES et al., 2012; PATHAN et al., 2017), antifúngica (SÁ et al., 2009a; SANTANA et al., 2009; SOUZA et al., 2011), antibacteriana (NUNES et al., 2011; SÁ et al., 2009b), anti-biofilme (KLEIN et al., 2015), antiviral (SATO et al., 2011), antinociceptiva (FIGUEIREDO et al., 2009) e inseticida (PAIVA et al., 2011a; OLIVEIRA et al., 2011). Algumas possuem como propriedade biotecnológica a capacidade de reduzir a turbidez da água por aglutinação (FREITAS et al., 2016) e outras auxiliam na elucidação da estrutura glicídica em superfícies biológicas e suas respectivas funções (KENNEDY et al., 1995). Algumas lectinas funcionam como inibidores de proteases (CARBONARO et al., 2015) envolvidas em processos biológicos essenciais (SALAGA et al., 2013), tornando-se um alvo promissor para o desenvolvimento de novos compostos farmacêuticos, principalmente pela atuação crucial de proteases nos ciclos de replicação de diversos vírus (dengue, HIV e hepatite C, por exemplo), levando ao interesse no desenvolvimento de inibidores destas enzimas (MURI, 2014).

Dentre as macromoléculas provenientes do metabolismo secundário, os polifenóis constituem o maior grupo. Polifenóis representados pelos taninos e flavonóides têm usos terapêuticos devido suas atividades anti-inflamatória, antifúngica, antioxidante e cicatrizantes (SANTOS, MELLO, 2004; VISIOLI et al., 2011; ZUANAZZI, MONTANHA, 2004). Saponinas, alcalóides, glicosídeos de sesquiterpeno e lactonas de sesquiterpeno demonstraram ter propriedades semelhantes (TALHOUK et al., 2007). Alguns taninos e flavonóides têm sido relacionados com atividade imunomoduladora (OKUDA, 2005; TALHOUK et al., 2007) e alguns flavonoides com a inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) (GUERRERO et al., 2012) e ação preventiva contra o câncer (CLERE et al., 2011; NISHIUMI et al., 2011) e contra doença isquêmica cardíaca (WANG et al., 2011) também têm sido reportados.

Por essas propriedades promissoras da vegetação caatingueira, que estudos como estes realizados neste trabalho, buscam prospectar o potencial desta flora, agregando valor bioquímico e terapêutico à mesma.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivos Gerais

Através de um screening com plantas encontradas na Caatinga buscar novas fontes de lectinas e inibidores de protease. Em seguida, purificar, caracterizar e avaliar potenciais atividades biológicas de diferentes tecidos da *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J. F. Macbride, visando a obtenção de novas biomoléculas ativas.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Realizar uma triagem com plantas encontradas na Caatinga avaliando a atividade lectínica e inibidora de tripsina a partir dos diversos extratos obtidos;
- Purificar a lectina de semente de *Apuleia leiocarpa* (LeSApul), utilizando métodos cromatográficos convencionais e avançados para isolamento de proteínas;
- Caracterizar estruturalmente a LeSApul por eletroforese em gel de poliacrilamida, eletroforese bidimensional, fluorimetria, dicroísmo circular, e espectrometria de massas;
- Caracterizar a ApulSL determinando a afinidade da lectina por carboidratos e/ou glicoproteínas, estabilidade frente à variações de temperatura e necessidade de íons;
- Avaliar a atividade antimicrobiana da lectina, determinando a concentração mínima inibitória (CMI), a concentração mínima bactericida (CMB) e a concentração mínima fungicida (CMF) frente a diferentes espécies.
- Realizar a análise fitoquímica do extrato aquoso das folhas de *A. leiocarpa* e dosagem de compostos fenólicos presentes;
- Avaliar o potencial antioxidante dos compostos fenólicos das folhas de *A. leiocarpa*;
- Avaliar a atividade antimicrobiana e anti-adesão dos compostos fenólicos das folhas de *A. leiocarpa*, frente a diferentes espécies patógenas a humanos e fitopatógenas;
- Elaborar a curva de morte e avaliar o extravazamento de proteínas dos microorganismos sensíveis;
- Avaliar a produção de estafiloxantina pelas cepas de *Staphylococcus aureus* frente à diferentes concentrações do extrato aquoso das folhas de *A. leiocarpa*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 PLANTAS MEDICINAIS E ESTUDOS ETNOBOTÂNICOS

O homem em toda sua trajetória registrada na história comportou-se como um agente manipulador do ambiente no qual se encontra, usufruindo do mesmo em benefício próprio mediante suas necessidades de sobrevivência (ALBUQUERQUE, 2005). Mesmo com os constantes aprimoramentos no âmbito médico, a medicina tradicional ainda é predominantemente praticada em pequenas comunidades onde a agricultura é a principal vertente econômica e co-existem diversas carências, de forma que as plantas medicinais são a única alternativa disponível para combater as enfermidades nessas comunidades (MENALE et al., 2016; SILVA; MARINHO et al., 2015). As razões para a manutenção dessas tradições incluem o baixo custo versus o benefício terapêutico, a falta de acesso aos tratamentos convencionais para determinadas doenças. (MENALE et al., 2016).

No Brasil, a base da medicina popular é o conhecimento tradicional relacionado às plantas medicinais derivado de uma mistura de culturas indígenas brasileiras e influências europeias e africanas durante o período de colonização acumulados por pessoas locais com acesso direto à natureza e aos produtos da biodiversidade (ALBAGLI, 2001; MARTINS et al., 2000).

Dadas as circunstâncias sobre a resistência adquirida por microorganismos causadores de problemas de saúde pública e a necessidade da descoberta de soluções medicamentosas para doenças que não possuem tratamento eficaz, mas apenas um controle paliativo, faz-se relevante a bioprospecção por novas moléculas bioativas (ALMEIDA et al., 2012; GUIMARÃES et al., 2010; NASCIMENTO et al., 2000). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), uma planta medicinal é definida como qualquer planta que contenha substâncias que possam ser usadas para fins terapêuticos ou que sejam precursoras da semi-síntese quimiofarmacêutica (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1979). O desenvolvimento de novos produtos a partir de fontes naturais também é encorajado porque estima-se que das 300.000 espécies de plantas existentes no mundo, aproximadamente 15% foram avaliadas quanto ao seu potencial farmacológico (DE LUCA et al., 2012). Muitos estudos têm contribuído na descoberta de novas substâncias derivadas de plantas medicinais e várias drogas como a aspirina, atropina,

camptotecina, digitoxigenina, morfina, podofilotoxina, taxol entre outras já foram obtidas (BOWERS, 1976; BROSSI, 1985; COREDELL, 1981; MUKHTAR et al., 2002)

Diferentes abordagens são utilizadas como ferramenta para seleção de plantas para a triagem farmacológica: a randômica, que envolve a coleta de todas as plantas encontradas na área de estudo; a quimiotaxonômica, que implica na coleta de todos os membros de uma família de plantas conhecidas por serem ricas em determinados compostos bioativos; a de amostragem étnico-dirigida, com base no(s) uso(s) medicinal(is) tradicional(is) de uma planta e a abordagem baseada em tecidos específicos de plantas (ALBUQUERQUE; HANAZAKI, 2006; COTTON, 1996). A partir destes levantamentos é possível averiguar o potencial dos recursos vegetais sob diferentes aspectos, desde medicinais, alimentares, madeireiros, forrageiros, incluindo também as formas de uso através das gerações.

Em estudos comparativos entre as abordagens, Balick (1990), Cox e Balick (1994) Khafagi e Dewedar (2000) e Silva (2013) demonstraram que o método de amostragem étnico-dirigido é mais eficiente para a identificação de compostos bioativos. Esta abordagem trata-se de uma estratégia baseada no consenso de informações obtidas através de vários informantes sobre uma mesma espécie (CANALES et al., 2005; HEINRICH et al., 1998). Assim, estudos étnico-dirigidos são importantes para entender o relacionamento entre a comunidade e a dinâmica de uso das plantas (ARAÚJO et al., 2007), conhecer os recursos terapêuticos das plantas encontradas em seu ambiente natural bem como os alvos fisiológicos (BENNETT; PRANCE, 2000). Estes estudos servem, portanto, como um instrumento promissor para a indústria farmacêutica na elaboração de novos medicamentos (SILVA; MARINHO et al., 2015) e no gerenciamento para conservação e sustentabilidade (ALMEIDA et al., 2010; SILVA et al., 2010).

Classificando os estudos etnobotânicos de acordo com os domínios fitogeográficos naturais encontrados no Brasil, o principal estudado é a Floresta Atlântica (35,25%), seguido pelo domínio Caatinga (30,13%), o Cerrado (16,67%), a Amazônia (12,18%), os Pampas (4,49%) e o Pantanal (1,28%). Até 2012, no mínimo 248 estudos etnobotânicos examinaram a vegetação da Caatinga, onde mais de 65% deles foram conduzidos no estado de Pernambuco (ALBUQUERQUE et al., 2012).

No nordeste brasileiro é possível encontrar dois domínios majoritários: a Floresta Atlântica e a Caatinga (DI STASI et al., 2002; ALBUQUERQUE et al., 2007). Plantas da Caatinga utilizadas com finalidade medicinal têm se destacado pelas propriedades anti-inflamatória, cicatrizante e antioxidante, as quais estão aparentemente relacionadas aos

compostos fenólicos nelas produzidos, armazenados e presentes em praticamente todos os grupos de plantas da região (ALMEIDA et al. 2005; MONTEIRO et al., 2006).

Sabe-se que espécies de plantas em regiões tropicais contém de 3 a 4 vezes o número de constituintes químicos ativos que seus homólogos em regiões temperadas (RODRÍGUEZ; WEST, 1995). Essa diferença, segundo VUUREN (2008), provavelmente é reflexo de estratégias bioquímicas em resposta às condições ambientais características desse domínio botânico, fazendo com que a Caatinga seja mais promissora para estudos de bioprospecção que outros domínios fitogeográficos, conforme estudo realizado por Almeida et al (2012).

2.2 *Apuleia leiocarpa* (VOGEL) J.F. MACBRIDE

As leguminosas (Fabaceae) são consideradas uma das famílias com maior número de espécies em florestas secas e úmidas dos neotrópicos (GENTRY, 1988, 1990, 1995). Fabaceae compreende 727 gêneros e cerca de 19.325 espécies, distribuídas nas subfamílias Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae. A subfamília Caesalpinioideae compreende quatro tribos: Cercideae, Detarieae, Cassieae e Caesalpinieae, com 172 gêneros e cerca de 2.250 espécies com ampla distribuição nas regiões tropicais e subtropicais do globo (LEWIS et al., 2005).

O gênero *Apuleia* Mart. foi publicado em 1837 em substituição ao gênero *Apuleia* Gaertn designado em 1791. *Apuleia* Mart. pertence à subfamília Caesalpinioideae, tribo Cassieae, que em algumas vezes é considerado compreender uma espécie e por vezes três espécies de árvores decíduas nativas da América do Sul, são elas a *A. leiocarpa* (Vogel) J. F. Macbr., *A. molaris* Spruce ex Benth. e *A. grazielana* Afr. Fern. (LEWIS et al., 2005). Vogel descreveu a nova espécie *Leptolobium ?leiocarpum* entre abril e maio de (1837) Em novembro daquele ano, Martius descreveu as mesmas espécies como *Apuleia praecox* Mart., um nome que tem sido mais usado que *L. leiocarpum*. O nome da espécie *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J. F. Macbr. foi publicado por MacBride em 1919 (MACBRIDE, 1919) após já ter sido descrita por Vogel entre abril e maio de (1837) como *Leptolobium ?leiocarpum* e em novembro daquele ano como *Apuleia praecox* Mart., por Martius, o que ainda leva alguns autores a usarem as antigas terminologias da espécie (MARTIUS, 1837; VOGUEL, 1837).

Apuleia leiocarpa (Vogel) J.F. Macbride é conhecida vulgarmente por grápia, entre outros nomes (Quadro 1). Segundo Carvalho (2003), a etimologia do nome *Apuleia* é uma

homenagem a L. Apuleus Madaurensis, filósofo e escritor do século 2 DC; *leiocarpa* significa fruto liso, sem ornamentações.

Quadro 1 - Nomes populares da *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J.F. Macbride nos estados brasileiros e em alguns países.

Estado	Nome popular
Mato Grosso	Amarelão, cumarurana, garapa, garapeira, muirajuba
Mato Grosso do Sul	Amarelinho, mulateira,
Paraná	Amarelinho, garapeira, gramiamunha, grápea,
Santa Catarina	Amarelinho, amarelinho-da-serra, garapiapanha, grapiapunha-branca e guarapeapunha, grapiapunha,
São Paulo	Amarelinho, barajuba; cetim; coração-de-negro, Cumarurana, garapa, garapa-amarela, garapa-branca, garapiapunha, gema-de-ovo, grapiapunha,
Maranhão	Aricirana, muirajuba
Bahia	Cumarurana, garapa, garapeiro, gemada, grapeapunha, guaretá; jataí; jataí-amarelo, jitaí, jitaí-amarelo
Espírito Santo	Cumarurana, garapa, garapa-amarela, gotaí-amarelo, parajuba; pau-cetim, pau-mulato
Minas Gerais	Cumarurana, garapa, garapa-branca, garapeapunha, gemada, grapeapunha, jitaí, parajuba; pau-cetim, pau-mulato
Rio de Janeiro	Cumarurana, garapa, minrajuba
Pará	Garapeira, gema-de-ovo,
Rio Grande do Sul	grapeapunha-branca, grapiá
Alagoas	guaretá; jataí; jataí-amarelo
Paraíba	Jetaí, jitaí, jutaí
Pernambuco	Jitaí, jutaí
Ceará	Jutaí
País	Nome Popular
Peru	Anacspi
Argentina	Grapia
Paraguai	Yvyra pere

Fonte: Carvalho (2003)

2.2.1 Distribuição geográfica

Apuleia leiocarpa é considerada uma das espécies da Floresta Estacional Decidual do Alto Uruguai e Depressão Central do Sul do Brasil, sendo amplamente distribuída, ocorrendo desde o nordeste brasileiro até o Uruguai e Argentina (Figura 1). Na Amazônia é tratada como uma variedade (*Apuleia leiocarpa* var. *mollaris*) ou como espécie distinta (*Apuleia mollaris*) (CARVALHO, 2003).

Apesar da ampla distribuição, essa espécie vem se tornando cada vez mais escassa devido à devastação das florestas na sua área de ocorrência natural pela exploração de sua madeira de forma extrativista (HERINGER; FERREIRA, 1973; MATTOS; GUARANHA, 1983). *A. leiocarpa* está categorizada como vulnerável e consta na Lista Oficial de Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção (MARTINELLI; MORAES, 2013) e já se encontra descrita como criticamente ameaçada de extinção de acordo com o Decreto 52.109, de 01 de dezembro de 2014 do Estado do Rio Grande do Sul (2014), precisando ser considerada uma prioridade para a conservação (MEDEIROS et al., 2011).

Figura 1 – Distribuição geográfica da *Apuleia leiocarpa*.



Fonte: SOUZA; LEWIS; HAWKINS (2010).

2.2.2 Características botânicas e bioquímicas

De acordo com Reitz et al. (1988), Heringer e Ferreira (1973) e Carvalho (2003) a *A. leiocarpa* é uma espécie arbórea decidual (perde as folhas em determinadas épocas do ano), heliófita (cresce melhor em locais bem iluminados) e pioneira (se originam a partir de lugares inóspitos).

De modo geral, a espécie é mais abundante em encostas de morros com rápida drenagem, mas também em regiões de planalto, solos secos e de baixa fertilidade, notando-se não haver pronunciada afinidade por determinadas condições físicas de solo (HERINGER; FERREIRA, 1973; MARCHIORI, 1997), podendo ser encontrada em altitudes de 20 a 1.200m (CARVALHO, 2003). Possui copa larga, ramificada, aplanada e não muito densa, de até 8 m de diâmetro podendo alcançar 40 m de altura, proporcionando uma sombra média (Figura 2 A). Carvalho (2003) destaca a presença de tronco irregular (em lugares mais ou menos abertos) a cilíndrico (floresta fechada) (Figura 2 B). A casca externa é pardo-acinzentada e provida de marcas arredondadas ou irregulares muito características, resultantes da deiscência em finas placas. A casca interna é dura, de cor rosada, fluindo uma seiva que se escurece em contato com o ar, após incisão. Segundo Marchiori (1997), é também muito característico o enraizamento superficial, na base do tronco. *A. leiocarpa* não é muito resistente ao ataque de fungos, apresentando tendência a ter a casca do caule manchado, sendo conveniente a preparação de banhos preventivos com fungicidas (LEONARDIS, 1975).

As folhas são alternas e imparipinadas, com 7 a 11 folíolos alternos, elípticos ou oblongos, coriáceos, de ápice agudo-acuminado ou emarginado, com margem inteira e base obtusa a arredondada (MARCHIORI, 1997), perdendo suas folhas total ou parcialmente durante o inverno (REITZ et al., 1988). As flores são pequenas, melíferas, masculinas ou hermafroditas (monóica), de coloração branca, amarela ou bege, reunidas em inflorescências dispostas em pequenas panículas, terminais do tipo cima ou cimeira, com 25 a 35 flores ou solitárias (Figura 2 D), inseridas sobre os ramos desfolhados ou com folhas novas (HERINGER; FERREIRA, 1973; REITZ et al., 1988; MARCHIORI, 1997). Sua polinização é realizada principalmente por abelhas (CARVALHO, 2003).

O fruto é uma vagem oblonga ou ovado-oblonga, achatada, ligeiramente oblíqua, indeiscente, elíptica, de cor castanho-clara, comprimida lateralmente, com ápice e base agudos, estrutura levemente (HERINGER; FERREIRA, 1973) ou totalmente coriácea (MARCHIORI, 1997), com indumento dourado (Figura 2 C e E) (REITZ et al., 1988) onde aproximadamente

93% dos frutos contêm uma única semente e 7% duas (HERINGER; FERREIRA, 1973), entretanto, é possível observar até três sementes por fruto (SOUZA et al., 1994).

As sementes possui coloração variando do castanho-esverdeado ao castanho-escuro (Figura 2 C), tegumento de consistência dura, germinação lenta (20-40 dias) e desuniforme (inferior a 60%) (LORENZI, 2002), devido à presença de dormência tegumentar, comum em leguminosas (POPIGINIS, 1977). São consideradas ortodoxas (EIBL et al., 1994) por ter uma longevidade de aproximadamente dois anos, ou seja, sobrevivem a secagem e congelamento durante a conservação *ex situ*, como observado em Amaral et al. (1988) onde encontraram 96% de germinação de 72 a 85% 19 meses depois de as sementes serem armazenadas, logo após a coleta, em sacos de papel em condições de temperatura e umidade controladas. No Sul e Sudeste, floresce na primavera (CARVALHO, 2003) e frutifica durante os meses de verão (MARCHIORI, 1997; CARVALHO, 2003) ou no meio do ano (RIZZINI, 1971) e, às vezes, as sementes permanecem nas árvores por vários meses (LORENZI, 2002).

Figura 2 - *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J.F. Macbride (A); tronco cilíndrico ou irregular casca externa pardo-acinzentada e provida de marcas arredondadas ou irregulares bem características (B); fruto (direita) e semente (esquerda) (C); inflorescência (D); ramos com folhas e frutos (E).



Fonte: acervo do autor.

De acordo com anotações durante 3 anos, Felippi (2010) observou que o aparecimento de flores foi perceptível durante a transição para o período de maior pluviosidade (agosto a novembro) no município de Frederico Westphalen - RS, o que pode estar relacionado à disponibilidade de água e luz. A maturação dos frutos ocorreu de janeiro a abril nos três anos de estudo, predominando no período de janeiro a março.

Segundo Pontes et al. (2002) as sementes de *A. leiocarpa* possuem reserva de açúcares (glicose, manose, xilose, arabinose, amido, galactose), ácidos graxos (ácido esteárico, oleico, mirístico, palmítico, esteárico, láurico e linoléico) e proteínas. A reserva de lipídio no embrião de *A. leiocarpa* é a única a ser utilizada durante a fase pré-germinativa, enquanto as demais, permanecem constantes em seus teores. Por outro lado, os cotilédones acumulam reservas que seriam usadas na fase de plântula.

2.2.3 Aplicações

Por ter uma madeira de elevado porte, amarela e densa ($0,75$ a $1,00\text{g/cm}^3$) (MARCHIORI, 1997), a *A. leiocarpa* é de interesse madeireiro, tendo múltiplos usos (LORENZI, 2002). Devido à resistência mecânica média a alta e boa durabilidade natural, é indicada para obras externas, construção civil (LORENZI, 2002; MARCHIORI, 1997; MEDEIROS et al., 2011; REITZ et. al., 1988), construção naval (BAPTISTA et al., 2013) e utilizada para a produção de álcool, carvão e coque (CARVALHO, 1994). Na literatura também há registros de que possui potencial para uso em sistemas agroflorestais (SOUZA et al., 1994), ornamentação, reflorestamentos (MARCHIORI, 1997) e produção de substâncias tanantes na indústria de curtumes (CARVALHO, 1994), já que sua casca chega a ter 24% de taninos (HERINGER; FERREIRA, 1973; NICOLOSO et al., 1999; CARVALHO, 2003).

Face às suas múltiplas aplicações, a *A. leiocarpa* deve ser considerada como uma das mais valiosas madeiras do Rio Grande do Sul (CARVALHO, 2003) e, conseqüentemente, merece uma atenção especial nos estudos sobre a viabilidade de seu reflorestamento em larga escala, possuindo uma importância ecológica inquestionável (BIONDO et al., 2008).

Na medicina popular de algumas comunidades, o decocto das folhas e frutos de *A. leiocarpa* são usados no tratamento de úlceras externas (SILVA; MARINHO et al., 2015), como anti-sifilítica (MENTZ et al., 1997) e antiofídica (GONÇALVES; RUPPELT; PEREIRA, 1991). Em alguns estudos realizados em ratos, a administração prévia do infuso da casca e do durâmen apresentou ação analgésica e a antiinflamatória, além de mostrar 100% de proteção ao

veneno da jararaca após 24h. (GONÇALVES; RUPPELT; PEREIRA, 1991; MARTZ, 1992; PEREIRA et al., 1994).

No estudo realizado por Silva e Trentin et al. (2015), o extrato aquoso dos frutos de *Apuleia leiocarpa* apresentou ação antibiofilme não biocida contra o *Staphylococcus epidermidis* com inibição de 52 %. Através da microscopia eletrônica de varredura confirmou-se que a estrutura do biofilme foi fortemente impedida e que o extrato promoveu o excesso de produção de matriz e/ou modificação da morfologia bacteriana.

Na busca por novos compostos com atividade antimalárica, Muñoz et al. (2000) avaliaram o extrato aquoso dos frutos da *A. leiocarpa*, que foi inativo *in vitro* mas mostrou boa atividade *in vivo* em ratos (53% de inibição com 250 mg/kg). Neste mesmo trabalho, os autores fizeram um estudo etno-dirigido com os índios Chacobo, onde o decocto do caule *A. leiocarpa* é utilizado como antipirético, uso que pode ser justificado pela presença da β -amirina, um triterpeno que pode ser obtido através da extração com éter de petróleo e que possui atividades anti-inflamatórias e sedativas (KWEIFIO-OKAI et al., 1994; MITAINE, 1998), e do β -sitosterol, que também possui propriedades anti-inflamatórias e inibe a elastase, enzima relacionada a desordens inflamatórias (MITAINE et al., 2002). Além da β -amirina e do β -sitosterol, também já é sabido da presença de flavonóides, flavonas, pterocarpano, bamirina e pinitol nas cascas e cerne da *A. leiocarpa* (BRAZ-FILHO; GOTTLIEB 1971; HIJWEGEN, 1973). Em contrapartida, há relatos de dermatite de contato causada pelo pó da madeira (DEJOBERT; MARTIN; BERGOEND, 1995; LÓPEZ et al., 2016).

2.3 METABOLISMO PRIMÁRIO E SECUNDÁRIO

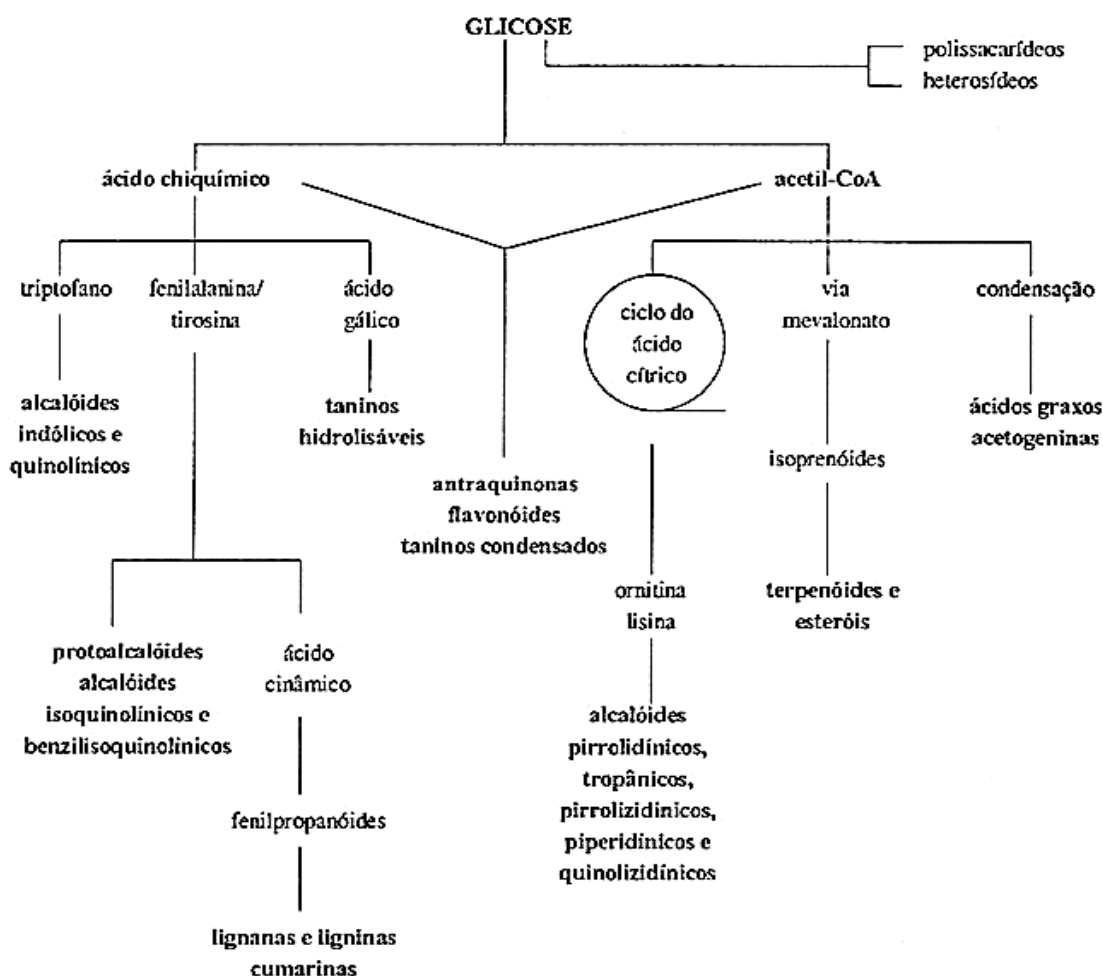
Ao conjunto de reações químicas que continuamente ocorrem em cada célula, dá-se o nome de metabolismo (SIMÕES, 2007). Algumas vias metabólicas são semelhantes entre os organismos, no entanto, algumas são restritas em sua ocorrência. A malha metabólica de plantas é mais extensa que a maioria dos outros organismos, pois além da produção metabólitos primários, as plantas também sintetizam uma vasta gama de metabólitos secundários. Embora classificadas em metabolismo primário e secundário, as reações não ocorrem independentemente umas das outras. São conhecidos mais de 200.000 compostos químicos (EVANS, 2002; SCHWAB, 2003; SIMÕES, 2007).

De uma forma geral, os metabólitos primários essencialmente representam substâncias que são produzidas por todas as espécies de plantas e outros organismos; são geralmente essenciais para sobrevivência. Incluem, principalmente, a base universal e essencial dos carboidratos, aminoácidos, nucleotídeos, lipídeos e proteínas, incluindo as enzimas e coenzimas. As vias de síntese dos metabólitos primários são muito semelhantes entre os organismos (PICHESKY, GANG, 2000). O armazenamento de carboidratos nos vegetais ocorre sob a forma de amido. Os aminoácidos ocorrem tanto sob a forma livre como unidades formadoras de proteínas e outros metabólitos. A maioria dos aminoácidos contém apenas carbono, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio em sua estrutura, mas outros átomos podem estar presentes, como o enxofre e o iodo. As enzimas são geralmente constituídas de proteínas ou contém proteína como parte essencial. Usualmente agem sobre uma categoria de substância, já que são específicas para um grupamento químico ou ligação química, podendo agir como lipases, proteases, oxidases, redutases, hidrolases e entre outras funções. Os triglicerídeos com cadeias longas saturadas ou insaturadas são constituintes importantes de reserva animal e vegetal, particularmente nas sementes (EVANS, 2002).

Os metabólitos secundários são estruturalmente diversificados. Determinadas estruturas são encontradas, muitas vezes, em espécies específicas (PICHESKY, GANG, 2000) e a produção destes metabólitos depende dos ciclos metabólicos fundamentais do tecido vivo (EVANS, 2002). Estes compostos desempenham papéis fundamentais na manutenção da planta, atuando na proteção contra fungos, bactérias, infecções virais, pragas, radiação UV, além de participar em processos de alelopatia, sinalização e atração de polinizadores e frugívoros (DIXON, 1999).

A origem de todos os metabólitos secundários pode ser resumida a partir do metabolismo da glicose (Figura 3), via dois intermediários principais, o ácido chiquímico e o acetato. O ácido chiquímico dá origem aos precursores da maioria dos metabólitos secundários aromáticos, como os taninos hidrolisáveis, alcaloides derivados de aminoácidos aromáticos e fenilpropanóides. O acetato fornece unidades de acetila que compõem o intermediário acetil-tio-coenzima A (acetil-CoA), o precursor de vários grupos de substâncias, como os aminoácidos alifáticos e os alcalóides derivados destes, terpenóides, esteróis, ácidos graxos e triglicerídeos. Os aminoácidos alifáticos originam-se no ciclo do ácido cítrico, enquanto que os demais metabólitos derivam do mevalonato ou da condensação de unidades de acetato. Alguns compostos derivam não apenas de um desses intermediários, mas da combinação de uma unidade do ácido chiquímico e uma ou mais unidades de acetato ou derivados deste, como ocorre com as antraquinonas, os flavonóides e os taninos condensados (SIMÕES, 2007).

Figura 3 - Resumo do ciclo biossintético dos metabólitos secundários.



Fonte: SIMÕES (2007)

Fenóis constituem o maior grupo de metabólitos secundários vegetais. São amplamente distribuídos na natureza, sendo encontrados possuindo estrutura simples com um anel aromático até polímeros altamente complexos, como os taninos e ligninas (CARVALHO et al., 2002; EVANS, 2002). Compostos fenólicos servem como atrativo ou repelentes para predadores, pigmentos florais e componentes estruturais das plantas (HARBORNE, 1982, 1998). Também são importantes constituintes de algumas plantas medicinais e na indústria alimentícia são usados como agentes aromatizantes, corantes e antioxidantes. Algumas categorias de polifenóis são de interesse farmacêutico: fenóis simples, taninos, cumarinas e seus glicosídeos, antraquinonas e seus glicosídeos, naftoquinonas, flavonas e seus flavonóides glicosídicos, antocianidinas e antocianinas, lignanas e lignininas. Quanto à síntese destes compostos, estes podem ser formados pela via do ácido chiquímico ou pela via do ácido acético,

onde a via do ácido chiquímico parece ser importante para a biossíntese de unidades C6-C3 (derivados de fenilpropano) a partir de hidrocarbonetos para a formação de blocos de lignina e para a formação de taninos hidrolisáveis, vanilina e unidades de fenilpropano de flavonas e cumarinas (EVANS, 2002).

Os taninos, largamente distribuídos nas plantas e alimentos, são uma mistura complexa de oligômeros gerados pela polimerização de unidades de flavan-3-ol (taninos condensados) ou pela esterificação de vários resíduos de ácido gálico em um cerne glicídico, principalmente glicose (taninos hidrolisáveis) (MUELLER-HARVEY et al., 2001; SCHOFIELD et al., 2001), com peso molecular entre 1000-5000 Da, com a capacidade de precipitar proteínas (EVANS, 2002) e cujas propriedades biológicas são relacionados com o grau de polimerização e padrão de oxigenação dos mesmos (NOFERI et al., 1997; SCHOFIELD et al., 2001).

Taninos e flavonóides são empregados terapeuticamente devido às suas atividades anti-inflamatória, antifúngica, antioxidante e propriedades cicatrizantes (SANTOS, MELLO, 2004; ZUANAZZI, MONTANHA, 2004; VISIOLI et al., 2011). Mas outros compostos fenólicos como as saponinas, alcalóides, glicosídeos de sesquiterpeno e lactonas de sesquiterpeno, por exemplo, também demonstram propriedades semelhantes (TALHOUK et al., 2007). Alguns flavonóides interferem nas enzimas e vias envolvidas em processos inflamatórios (TALHOUK et al., 2007), outros inibem da enzima conversora de angiotensina (ECA) (GUERRERO et al., 2012), outros estão relacionados com ação preventiva contra o câncer (CLERE et al., 2011; NISHIUMI et al., 2011) e contra doença isquêmica cardíaca (WANG et al., 2011). Quanto aos taninos, a atividade anti-inflamatória tem sido observada com frequência, como citado no trabalho de Okuda (2005), onde foi demonstrado que um grupo de taninos age no metabolismo do ácido araquidônico em leucócitos com importante papel na reversão inflamatória.

2.3.1 Lectinas

O primeiro relato a respeito de lectinas se deu em 1888, quando Stillmark, ao estudar a toxicidade de extratos de *Ricinus communis* (mamona), observou sua capacidade para aglutinar eritrócitos, devido à presença de uma proteína extraída, a ricina, e foi essa descoberta que marcou o início das pesquisas envolvendo lectinas (KENNEDY et al., 1995). Mas foi apenas em 1960 que o estudo sobre lectinas começou a ganhar ímpeto, atraindo a atenção para a investigação e aplicação das lectinas (GABOR et al., 2004; RÜDIGER; GABIUS, 2009a).

O termo *lectina* é originado do latim “*lectus*”, que significa “selecionado” e refere-se à habilidade dessas proteínas ligarem-se seletivamente e reversivelmente (não-covalentemente) a carboidratos (HONG et al., 2001; SHARON; LIS, 2001).

Após anos de pesquisa, conceitua-se lectinas como glicoproteínas de origem não imune que se ligam de maneira específica e reversível (não covalentemente) a resíduos terminais ou subterminais de carboidratos. Dessa forma, desempenham função relacionada ao reconhecimento das informações contidas na enorme variedade e combinação de estruturas oligossacarídicas conjugadas normalmente às proteínas ou aos lipídeos na superfície celular (BROOKS; LEATHEM, 1998; PEUMANS; VAN DAMME, 1995), interferindo no comportamento celular (GABIUS, 2015; GABIUS; ROTH, 2017).

Esta interação ocorre através de ligações de hidrogênio, interação de Van der Waals e interações hidrofóbicas em uma determinada região da molécula proteica, denominada de Domínio de Reconhecimento a Carboidrato (KENNEDY, 1995; NISHIMURA et al., 2006), que tende a se localizar na superfície da molécula (COMINETTI et al., 2002; SHARON; LIS, 2002).

Devido a essa habilidade, as lectinas ou hemaglutininas, apresentam alto grau de especificidade em suas reações com grupos sanguíneos do sistema ABO e MN (SHARON; LIS, 1993) e eritrócitos de diferentes espécies animais (CORREIA; COELHO, 1995; PAIVA; COELHO, 1992; REYNOSO-CAMACHO et al., 2003)

A ênfase dada quanto à origem não-imunológica das lectinas serve para distingui-las de anticorpos anticarboidratos que aglutinam células. Os anticorpos são estruturalmente similares, enquanto as lectinas diferem entre si quanto à composição aminoacídica, requerimento de metais, peso molecular e estrutura tridimensional (VAN DAMME et al., 1998).

Lectinas estão amplamente distribuídas na natureza, estão presentes em todos os reinos da natureza e podem ser encontradas em bactérias (IMBERT et al., 2004); vírus (GAMBLIN et al., 2004); algas (HAN et al., 2010); vegetais (LEITE et al., 2005; SOL et al., 2007); fungos (KHAN et al., 2007; LEONIDAS et al., 2007); líquens (SILVA et al., 2009); invertebrados: esponjas (MOURA et al., 2006); cnidários (FENTON-NAVARRO et al., 2003); moluscos (TAKAHASHI et al., 2008; KONG et al., 2011); crustáceos (XU et al., 2010); insetos (OURTH et al., 2005); vertebrados: peixes (TERADA et al., 2007); répteis (NUNES et al., 2011); aves (HOGENKAMP et al., 2006); mamíferos (OLA et al., 2007). Em plantas, as lectinas têm sido detectadas em: cascas (NASCIMENTO et al., 2008; SÁ et al., 2009b; VAZ et al., 2010; ARAÚJO et al., 2012); cerne (SÁ et al., 2008); cladônias (SANTANA et al., 2009); flores (SANTOS et al., 2009); folhas (COSTA et al., 2010; GOMES et al., 2013); raízes (SOUZA et

al., 2011); rizomas (SANTANA et al., 2012); sementes (COELHO et al., 2009; SANTOS et al., 2009).

As lectinas mais estudadas são da família Fabaceae, pois é nas sementes de leguminosas onde são mais encontradas (LIU; BIAN; BAO, 2010; SOL et al., 2007) chegando a constituir até 10% da proteína total (SHARON; LIS, 1990; SPILATRO et al., 1996). Entretanto, muitas lectinas de outras famílias também têm sido frequentemente isoladas e caracterizadas como, por exemplo, lectinas de Solanaceae (PEUMANS et al., 2003), Cactaceae (ZENTENO et al., 1995), Euphorbiaceae (WITITSUWANNAKUL et al., 1998), Labiateae (FERNÁNDEZ-ALONSO et al., 2003) e Moraceae (MOREIRA et al., 1998) entre diversas outras.

As lectinas variam quanto às fontes, especificidade, estrutura, propriedades biológicas, e por isso, são várias as classificações dessas proteínas. A especificidade de lectinas de plantas a carboidratos é primeiramente determinada pela estrutura tridimensional dos seus sítios de ligação que se apresenta conservada a nível aminoacídico, dentro de famílias de lectinas (PEUMANS; VAN DAMME, 1998). As lectinas exibem uma elevada homologia em seus resíduos de aminoácidos, incluindo aqueles envolvidos na ligação a carboidratos e a maioria dos que coordena os íons metálicos, necessários à integridade das subunidades e ao correto posicionamento dos resíduos para a ligação (SPILATRO et al., 1996).

Com base na estrutura geral, as lectinas de plantas têm sido subdivididas de acordo com o domínio de ligação aos carboidratos (PEUMANS; VAN DAMME, 1998):

- a) Merolectinas** são aquelas que possuem apenas um domínio para ligação aos carboidratos, sendo monovalentes e por isso não podem precipitar glicoconjugados ou aglutinar células.
- b) Hololectinas** também possuem domínio específico para ligação a carboidratos, mas contêm, pelo menos, dois domínios idênticos ou mais domínios homólogos ligantes a açúcares; sendo di ou multivalentes, aglutinam células e/ou precipitam glicoconjugados. A maioria das lectinas de plantas pertence a esse grupo.
- c) Quimerolectinas** são proteínas com um ou mais domínios de ligação a carboidratos e um domínio não-relacionado. Esse domínio diferente pode ter uma atividade enzimática bem definida ou outra atividade biológica, mas age independentemente dos outros domínios de ligação a carboidratos. Dependendo do número de sítios de ligação para carboidratos, quimerolectinas agem como merolectinas ou hololectinas.
- d) Superlectinas** consistem exclusivamente de pelo menos dois domínios de ligação a açúcares diferentes. Esse pode ser considerado um grupo especial de quimerolectinas, consistindo de dois domínios estruturalmente e funcionalmente diferentes de ligação a carboidratos (VAN DAMME et al., 1996).

Quanto à especificidade por monossacarídeos, podem se ligar à manose/glicose, *D*-galactose, *N*-acetilglicosamina, *N*-acetilgalactosamina, *L*-fucose, ácido *N*-acetil-neuramínico e grupos glicanos complexos (PEUMANS; VAN DAMME, 1998; RÜDIGER, 2000), entretanto, a maioria das lectinas que compartilham entre si a característica de reconhecerem o mesmo tipo de monossacarídeo, diferem entre si em relação a afinidade por oligossacarídeos (MORENO, 2008). Algumas lectinas podem ter afinidade por diferentes carboidratos, não sendo portanto específicas (TAKAHASHI et al., 2008).

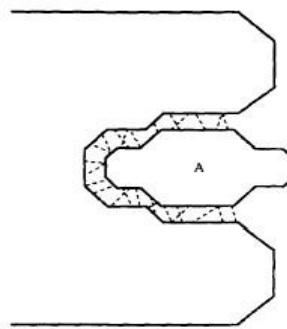
Isolectinas são definidas como um grupo de proteínas intimamente relacionadas, resultantes da expressão de diferentes genes, com estruturas semelhantes em uma mesma espécie, e apresentam formas moleculares com mobilidade eletroforética diferente. O termo isoforma foi proposto para lectinas pertencentes à mesma espécie, cuja heterogeneidade de origem genética não foi bem definida (PAIVA; COELHO, 1992).

Lectinas ligadoras de quitina têm sido isoladas de diversas fontes, incluindo bactérias, insetos, plantas e mamíferos e muitas delas apresentam atividade antifúngica e inseticida uma vez que a quitina é o componente-chave da parede celular de fungos e de diversas estruturas no corpo dos insetos. Dessa forma, o primeiro passo dado para proteger a planta poderia ser o reconhecimento da quitina por esta pequena lectina (NEUMANN et al. 2004). Lectinas com potencial antifúngico e inseticida têm sido estudadas sob vários aspectos, seja como moléculas que protegem as plantas que as produzem naturalmente ou como resultado de um material genético modificado que expresse este tipo de lectina, desde que seja atóxica ao homem (PEUMANS; VAN DAMME 1995, CARLINI; GROSSI DE SÁ, 2002).

As mais estudadas são aquelas pertencentes à família das heveínas, assim chamadas por possuírem em comum o domínio heveínico como motivo estrutural de reconhecimento da quitina. A heveína é uma merolectina constituída por 43 aminoácidos (cerca de 4,5 kDa), encontrada na seringueira (*Hevea brasiliensis*). É especialmente rica em resíduos de glicina e cisteína e sua estrutura é mantida por 4 pontes dissulfeto, o que lhe confere uma estabilidade notável, característica que se estende às demais lectinas da família das heveínas. Mesmo depois de aquecida a 90 °C por 10 minutos, a heveína ainda inibe o crescimento de fungos. Do ponto de vista biológico, a heveína, além de aglutinar eritrócitos e ligar-se a IgE, é o principal fator alérgico do látex, por isso, também, tem sido apontada como envolvida na defesa da planta frente ao ataque de insetos e fungos (NEUMANN et al. 2004).

As lectinas são, em sua maioria, di ou polivalentes e são capazes de formar pontes entre carboidratos ou glicoproteínas, que se apresentam em solução ou ligadas à membrana celular (Figura 4) (CORREIA et al., 2008).

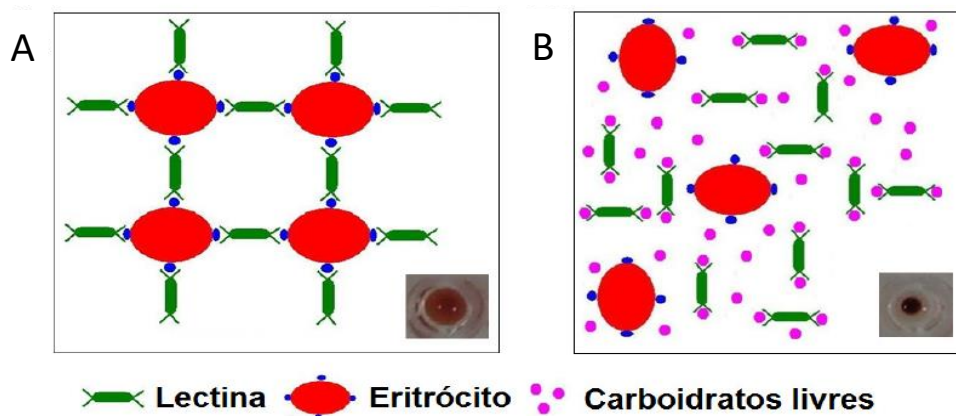
Figura 4 - Representação esquemática da ligação da lectina a um carboidrato (A). As linhas pontilhadas representam pontes de hidrogênio.



Fonte: KENNEDY et al. (1995).

A presença de lectinas em uma amostra pode ser facilmente detectada a partir de ensaios de aglutinação, nos quais elas interagem com carboidratos em uma superfície celular através de seus sítios, formando diversas ligações cruzadas reversíveis entre células distintas (Figura 5).

Figura 5 - Esquema representando a aglutinação de eritrócitos promovida por lectinas. Rede de aglutinação formada pela ligação de uma lectina aos carboidratos da superfície dos eritrócitos (A). Inibição da formação da rede de aglutinação por carboidratos livres.



Fonte: PAIVA et al. (2011b).

As lectinas podem aglutinar diversos tipos de células. O ensaio mais comumente utilizado para a caracterização de uma lectina é o de hemaglutinação, o qual é realizado através de uma diluição seriada da amostra contendo lectina e posterior incubação com eritrócitos; a rede formada decorrente da interação entre a lectina e os carboidratos presentes na membrana dos eritrócitos constitui o fenômeno de hemaglutinação (NAEEM et al., 2007a). O inverso da maior diluição em que se observa a hemaglutinação (título) corresponde à atividade hemaglutinante (AH) (SANTOS et al., 2005). O ensaio possibilita, além da sua detecção, determinar a especificidade de uma lectina, para carboidratos e/ou eritrócitos humanos ou de animais (SANTOS et al., 2005).

Para assegurar que o agente aglutinante é uma lectina, são necessários ensaios subseqüentes de inibição da AH, utilizando-se uma solução do carboidrato ligante livre em solução (WU et al., 2006).

A AH é detectada pela formação de uma rede ou malha decorrente da interação entre a lectina e os carboidratos presentes na membrana dos eritrócitos (NAEEM et al., 2007b). O ensaio possibilita, além da sua detecção, determinar a especificidade de uma lectina, para carboidratos e/ou eritrócitos. Os eritrócitos utilizados podem ser de humanos ou de animais, os quais podem ser tratados enzimaticamente (com tripsina, papaína, entre outras) com proteases afim de remover glicoproteínas das superfícies eritrocitárias e assim permitir melhor acesso aos antígenos eritrocitários (DANIELS, 2007), ou quimicamente (com glutaraldeído ou formaldeído), aumentando a estabilidade da membrana celular (COELHO; SILVA, 2000; SANTOS et al., 2005).

A AH de lectinas também pode ser realizada em diversas condições: em diferentes valores de pH (identificar o ponto isoelétrico e em pH terá maior atividade); após serem submetidas a distintas temperaturas (termolabilidade); após exposição a enzimas proteolíticas (descobrir quais resíduos aminoácídicos existem) e na presença de íons (investigar a existência de co-fator) (KING et al., 1980; KONOZY et al., 2003; MORAES et al., 2013; SUSEELAN et al., 2002; WITITSUWANNAKUL et al., 1998).

Os aminoácidos têm capacidade de se complexarem com íons Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} e outros através do grupo α -amina e carboxílico e formarem quelatos relativamente estáveis. Essa propriedade dos aminoácidos e, portanto, das proteínas, é explorada em métodos de separação baseados na afinidade entre proteínas, pH e íons metálicos (PESSOA-JÚNIOR; KILIKIAN, 2005). Muitas lectinas contêm metais e, em alguns casos, existe evidência da necessidade de íons para suas atividades biológicas (SHARON; LIS, 1990).

As lectinas, por terem a habilidade de se ligar a mono e oligossacarídeos, apresentam uma variedade de efeitos biológicos, como: atividade imunoregulatória (DEÁK et al., 2015; DE LA FUENTE et al., 2014; KOVÁCS-SÓLYOM et al., 2010), antiinflamatória (MELO et al., 2010), pró-inflamatória (ELIFIO-ESPOSITO et al., 2011) antitumoral (DAMASIO et al., 2014; FANG et al., 2010; NOLTE et al., 2012; NUNES et al., 2012; PATHAN et al., 2017), antifúngica (SÁ et al., 2009a; SANTANA et al., 2009; SOUZA et al., 2011), antibacteriana (NUNES et al., 2011; SÁ et al., 2009b), anti-biofilme (KLEIN et al., 2015), antiviral (SATO et al., 2011), antinociceptiva (FIGUEIREDO et al., 2009) e inseticida (PAIVA et al., 2011a; OLIVEIRA et al., 2011).

Devido ao fato de algumas lectinas possuírem habilidade para mediar mucoadesão, citoadesão e citoinvasão de drogas (GABOR et al., 2004; NEUTSCH et al., 2011), essas moléculas têm sido exploradas em sistemas de liberação de drogas (NAEEM et al., 2007b), já que células tumorais ou alteradas expressam glicanos de superfície celular diferentes das células normais. Podem também ser utilizadas como potencializadoras da absorção de drogas, pois ao acionar o transporte vesicular, algumas lectinas são endocitadas pelas células epiteliais do trato gastrointestinal, como mostram os estudos com aglutinina de gérmen de trigo (WGA), ConA e lectina de tomate (BIES et al. 2004, GABOR et al., 2001; LEHR, 2000).

Com base na elevada capacidade de reconhecimento de carboidratos, as lectinas se tornaram relevantes nas investigações estruturais e funcionais dos carboidratos complexos e seu mapeamento a fim de analisar o código de açúcar (*sugar code*) (GABIUS; ROTH, 2017), as mudanças na superfície celular durante processos fisiológicos e patológicos (SHARON; LIS, 2001; GEMEINER et al., 2009; XIE et al., 2009), diferenciação e transformação neoplásica (LI et al., 2008) e no tratamento de condições pré-cancerosas através da associação de fármacos à lectinas com afinidade pela estrutura glicídica alterada decorrente do processo patológico (WROBLEWSKI et al., 2001). Essa especificidade para glicanos e as características topológicas da apresentação destes, cooperaram para garantir que o processo de reconhecimento revele as associações de ligação adequados no contexto fisiológico em conjunto (GABIUS, 2015; GABIUS; ROTH, 2017). Dessa forma, as lectinas são destaque no campo da tecnologia de bioreconhecimento na Histologia e Patologia como ferramentas em ensaios citoquímicos para localização de glicoconjugados e resíduos glicosilados, bem como ferramentas histoquímicas para análises de estruturas de tecidos humanos normais e alterados (FRANCESCHINI et al., 2000; PEDINI et al., 2001; LIMA et al., 2010).

2.4.2 Inibidores de Proteases

Proteases são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas adjacentes. Algumas proteases clivam apenas a ligação peptídica adjacente a determinados resíduos de aminoácidos e, portanto, fragmentam uma cadeia polipeptídica de uma maneira previsível e reproduzível (NELSON, 2014). Proteases ou peptidases representam uma classe de enzimas com importantes papéis em processos fisiológicos (HEDSTROM, 2002). Estas enzimas estão envolvidas em processos biológicos essenciais, como a coagulação sanguínea, morte celular e diferenciação de tecidos, no mecanismo invasivo de tumores, no ciclo de infecção de um grande número de vírus e microrganismos patogênicos (KOBLENSKI et al., 2000; RUFINO; SILVA et al., 2006; SALAGA et al., 2013).

Devido aos importantes processos biológicos em que estão envolvidas, as proteases tornaram-se um alvo promissor para o desenvolvimento de novos compostos farmacêuticos, principalmente pela atuação crucial de proteases nos ciclos de replicação de diversos vírus (dengue, HIV e hepatite C, por exemplo), levando ao interesse no desenvolvimento de inibidores destas enzimas (MURI, 2014).

Os inibidores de proteases podem ser de origem natural, sendo globalmente achados em organismos vivos e largamente descritos em plantas (JAMAL et al., 2013). Geralmente, constituem de 1-15% das proteínas solúveis nos órgãos de estoque e reprodutivos vegetais, como as sementes e tubérculos (BHATTACHARYYA et al., 2006). Estão relacionados com o sistema de defesa das plantas contra insetos, fungos e bactérias patogênicas (FANG et al., 2010; WANG et al., 2010). Em animais, atuam como reguladores de processos proteolíticos de muitas funções biológicas, como no combate às infecções, coagulação sanguínea, agregação plaquetária e anti-carcinogênese (OLIVA, 2000).

As sementes de leguminosas são uma excelente fonte de proteína na dieta, mas contêm várias classes de proteínas resistentes à proteólise em diferentes graus, preservando a atividade biológica durante a digestão devido ao seu alto nível de estabilidade e/ou afinidade pelas enzimas ou receptores alvo. Estudos *in vivo* identificaram várias dessas classes de proteínas resistentes à digestão, incluindo lectinas, inibidores de protease e proteínas da albumina, que diferem em tipo, abundância e relevância entre as espécies de leguminosas (CARBONARO et al., 2015). Dessa forma, inibidores de protease, especificamente inibidores de tripsina/quimotripsina, nas sementes de espécies vegetais de leguminosas são considerados uma limitação à exploração de sementes na nutrição, geralmente levando a uma exigência de

tratamento térmico de produtos de sementes durante o processamento para uso em alimentos para animais (PATTO et al., 2015).

2.4.3 Atividade Antioxidante

A geração de radicais livres derivados do oxigênio ocorre majoritariamente nos processos fisiológicos de forma contínua durante os processos metabólicos. Esses radicais atuam como mediadores para a transferência de elétrons nas várias reações bioquímicas. Sua produção, em proporções adequadas, possibilita grande gama de eventos fisiológicos: a geração de ATP (energia) por meio da cadeia transportadora de elétrons, fertilização do óvulo, ativação de genes, participação de mecanismos de defesa durante o processo de infecção, entre tantos outros. Porém, a produção excessiva pode conduzir a danos oxidativos (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; SHAME; MOREIRA, 2004). A instalação do processo de estresse oxidativo decorre da existência de um desequilíbrio entre compostos oxidantes e a ação endógena de sistemas de defesa antioxidante - enzimático ou não-enzimático -, podendo ser decorrente de uma geração excessiva de radicais livres ou de uma menor velocidade de remoção desses. A principal função desses sistemas de defesa antioxidante é inibir ou reduzir os danos causados pelos radicais livres e espécies reativas de oxigênio (MANDEL; YODIM, 2004) e tal desequilíbrio conduz à oxidação de biomoléculas com consequente perda de suas funções biológicas, desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o dano oxidativo potencial contra células e tecidos (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004).

O sistema de defesa não-enzimático é composto por uma gama de compostos que podem ser encontrados na natureza através das plantas, por exemplo. Os antioxidantes naturais mais comuns são compostos fenólicos (flavonóides, taninos, xantonas, tocoferóis) derivados do metabolismo secundário e são essenciais para o crescimento, reprodução e defesa da planta (BARBOSA et al., 2010; LUO et al., 2013; CHEEL et al., 2013; MARTORANA et al., 2013; PEREIRA et al., 2014), as vitaminas (ácido ascórbico, o α -tocoferol e β -caroteno, precursores das vitaminas E e A, respectivamente) e minerais (zinco, cobre, selênio e magnésio) (PRASAD, A.S. et al., 2007). O sistema de defesa enzimático inclui as enzimas Superóxido Dismutase, Catalase e Glutathione Peroxidase. Essas enzimas agem por meio de mecanismos de prevenção, impedindo e/ou controlando a formação de radicais livres e espécies não-radicais, envolvidos com a iniciação das reações em cadeia que culminam com propagação e amplificação do processo e, consequentemente, com a ocorrência de danos oxidativos (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).

É crescente o interesse sobre radicais livres e isto tem trazido como meta a descoberta de protetores bioquímicos, ou seja, antioxidantes naturais, visto que a cronicidade desse desequilíbrio tem relevantes implicações sobre o processo etiológico de numerosas enfermidades crônicas não transmissíveis, como a aterosclerose, diabetes, obesidade, transtornos neurodegenerativos e câncer (FERRARI, 2004; GREEN; BRAND; MURPHY, 2004).

2.4.4 Atividade Antimicrobiana

Entre os anos 1940-1960 vários antibióticos foram descobertos através de triagens de produtos naturais, em sua maioria eficazes para o tratamento de bactérias Gram positivas: β -lactâmicos (cefalosporina), aminoglicosídeos (estreptomicina), tetraciclina (clortetraciclina), macrolídeos (eritromicina), peptídeos (vancomicina) e outros (cloranfenicol, rifamicina B, clindamicina e polimixina B) (FERNANDES, 2006); estima-se que 30 a 40% dos antimicrobianos disponíveis no mercado são derivados de produtos naturais (CHATTOPADHYAY et al., 2009).

Com a disponibilidade de vários antibióticos no mercado, a resistência microbiana aumentou significativamente, principalmente devido ao uso extensivo dessas drogas e à rápida transferência genética de resistência microbiana. É sugerido que a resistência microbiana se desenvolve dentro de sete a oito anos de uso regular de um antibiótico. Paralelo ao aumento desses níveis de resistência, surge a necessidade de encontrar novas substâncias antimicrobianas capazes de superar esses obstáculos no tratamento de infecções resistentes (GUIMARÃES et al., 2010; SILVEIRA et al., 2006).

A habilidade que lectinas de plantas têm em reagir seletivamente com carboidratos expostos na superfície celular de microorganismos torna possível o emprego dessas biomoléculas como sondas-diagnóstico para identificação de bactérias patogênicas (DOYLE; SLIFKIN, 1994; GEMEINER et al., 2009), na investigação de fatores de virulência (SLIFKIN; GIL, 1984) e para a detecção de receptores em bacteriófagos, fungos e protozoários (ETZLER, 1983; LIS; SHARON, 1986; NICOLSON, 1974).

Nas bactérias, a parede celular, além de impedir qualquer interação entre as lectinas e os glicoconjugados na sua membrana, impede que estas proteínas penetrem no citoplasma. Por esta razão, as lectinas não conseguem alterar a estrutura e/ou a permeabilidade da membrana ou perturbar os processos intracelulares normais de microorganismos invasores. Sendo assim, sua atuação na defesa da planta contra bactérias deve ser por meio de um mecanismo indireto,

baseando-se em interações entre os glicanos extracelulares da parede celular (BOBBARALA, 2012).

Lectinas extraídas a partir de plantas medicinais do Sul da África apresentaram efeito inibitório no crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* através de método de aglutinação (GAIDAMASHVILI; VAN STANDEN, 2002). A lectina extraída das folhas da *Schinus terebinthifolius* (SteLL) mostrou atividade contra *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *S. aureus* e *Candida albicans* (GOMES et al., 2013). Concanavalina A pode ser precipitada por vários polissacáridos bacterianos presentes nas paredes celulares das bactérias que contêm resíduos glicosídicos, como o ácido teicóico por exemplo, encontrados no *Lactobacillus plantarum*, *S. aureus* e *B. subtilis* (ARCHIBALD; COAPES, 1971; DOYLE et al., 1982; REEDER; EKSTEDT, 1971). As lectinas de soja (SBA) detectou um número muito baixo de células vegetativas de *B. anthracis* (COLE et al., 1984; GRAHAM et al., 1984).

Vários metabólitos secundários de plantas também têm apresentado atividade antimicrobiana. Polifenóis podem combinar-se com as adesinas bacterianas de forma a comprometer a adesão do microrganismo sobre a superfície celular do hospedeiro, além de também exercerem atividade antibacteriana provavelmente pela inativação de enzimas hidrolíticas, adesinas e de proteínas transportadoras. Taninos podem afetar a síntese da parede celular ao formarem complexos irreversíveis com proteínas (CHUSRI; VORAVUTHIKUNCHAI, 2009; COWAN, 1999), enquanto que alguns flavonóides podem atuar como inibidores da topoisomerase tipo II bacteriana (CUSHNIE; LAMB, 2011). Compostos de natureza terpênica têm sido relacionados com a inibição do crescimento microbiano. Óleos voláteis de diversas espécies vegetais também têm exibido atividade inibitória contra fungos e bactérias (ESPINA et al., 2011; HUANG et al., 2010).

2.5.1 Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB)

A atividade antimicrobiana de uma substância é geralmente avaliada pela determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e a concentração mínima bactericida (CMB) *in vitro* após incubação aeróbia por um determinado tempo (LEVISON, 2004). CIM e CMB são consideradas o “padrão ouro” para a determinação da susceptibilidade dos organismos a microorganismos e são usadas para julgar o desempenho de todos os outros métodos de teste de susceptibilidade. Dessa forma, são usados em diagnósticos laboratoriais

para confirmar uma resistência anormal, para dar uma resposta definitiva quando um resultado limite é obtido por outros métodos ou quando métodos de teste de difusão em disco não são apropriados (ANDREWS, 2001).

A CMI é definida como a concentração mínima de antibiótico que impede a suspensão transparente de 10^5 UFC/mL de tornar-se turva após a incubação, visto que turbidez normalmente conota um aumento na densidade bacteriana. A CMB é a concentração mínima de antibiótico que impede totalmente o crescimento ou resulta num decréscimo de 99,9% de um inóculo inicial (PANKEY; SABATH, 2004). A CMI e CMB são determinados após um intervalo fixo de tempo após a exposição a concentrações da droga que permanecem constantes durante um período de incubação, mas não fornecem informações sobre a evolução temporal do efeito antimicrobiano que varia em níveis quando em um paciente tratado com a droga. Estas condições *in vitro* são muito provavelmente diferentes das esperadas no local da infecção, em que o meio é frequentemente ácido e anaeróbico, e uma quantidade variável da droga pode-se ligar às proteínas de tecido. Além disso, a CMI e CMB são medidas contra um inóculo bacteriano padrão (cerca de 10^5 unidades formadoras de colônias [UFC] por mililitro), que não corresponde necessariamente à densidade bacteriana no local da infecção (10^{8-10} UFC por grama de tecido ou pus). O inóculo *in vitro* é também na fase exponencial de crescimento, ao contrário da maioria dos organismos de uma infecção estabelecida, que não estão em crescimento (LEVISON, 2004).

Substâncias antimicrobianas são consideradas agentes bacteriostáticos quando a razão CMB/CMI > 4 e bactericidas quando a razão CMB/CMI < 4 (GATSING et al., 2006). Apesar da atividade bacteriostática ter sido definida pela razão CMB/CMI > 4 , vários problemas técnicos podem afetar essa proporção (HANDWERGER; TOMASZ, 1985; PETERSON et al., 1978; PETERSON; SHANHOLTZER, 1992; SHERRIS, 1986; TAYLOR et al., 1983). As definições de “bacteriostático” e “bactericida” são claras: “bacteriostático” significa o agente que previne o crescimento da bactéria, ou seja, a mantém na fase estacionária de crescimento, e “bactericida” significa que o agente mata a bactéria. Na realidade, não há duas categorias puras de agentes antimicrobianos (um que exclusivamente mate bactérias e outro que apenas inibe crescimento). Os agentes que são classificados como bactericidas geralmente falham em matar todos os microorganismos (se por acaso o inóculo for grande) dentro das 18-24 h após o teste, e a maioria dos então classificados como agentes bacteriostáticos matam algumas bactérias dentro das 18-24 h após o teste, frequentemente mais que 90%-99% do inóculo, mas não o bastante (99,9%) para ser chamado de bactericida (PANKEY; SABATH, 2004).

De acordo com Saraiva (2011), extratos de plantas com CMI $<100 \mu\text{g/ml}$ são considerados agentes microbianos altamente ativos; CMI variando de 100 a $500 \mu\text{g/ml}$ são classificados como ativos; CMI variando de 500 a $1000 \mu\text{g/ml}$ são definidos como moderadamente ativos; CMI variando de 1000 a $2000 \mu\text{g/ml}$ são considerados ter uma baixa atividade; e CMI $> 2000 \mu\text{g/ml}$ são classificados como inativos. Como esperado, de acordo com a susceptibilidade de cada microorganismo, cepas sensíveis têm CMI's relativamente baixos, cepas resistentes têm CMI relativamente altas e isolados clínicos de uma mesma espécie têm diferentes CMI's (LEVISON, 2004).

2.5.2 Biofilmes

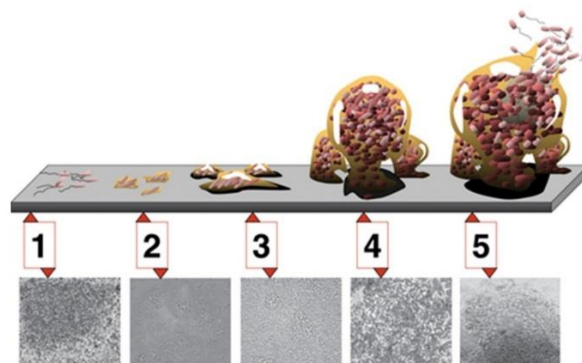
Afim de escaparem das defesas imunológicas do hospedeiro, microorganismos patógenos podem se arranjar química e estruturalmente em comunidades aderentes - biofilmes, cercadas por um polímero extracelular, que confere resistência a tratamentos antibacterianos (FUX, 2005; LEID, 2002; OTTO, 2008; HØIBY, 2010). Muitas espécies bacterianas vivem predominantemente em biofilmes, tanto em ambientes naturais como artificiais (COSTERTON et al., 1995; O'TOOLE et al., 2000; SUTHERLAND, 2001a; 2001b).

O caráter inerentemente defensivo do biofilme é demonstrado por uma notável persistência de bactérias cultivadas de forma séssil versus bactérias cultivadas planctonicamente, o que faz a maioria das infecções associadas ao biofilme serem difíceis de erradicar, assim, contribuindo para a cronicidade da doença (DAVIES, 2003; PARSEK; SINGH, 2003). Microrganismos associados em biofilme têm sido relacionados com mais de 65% de todas as infecções médicas, incluindo endocardite, otite, prostatite, periodontite, conjuntivite, vaginite, infecções relacionadas com a fibrose cística e são os principais colonizadores em dispositivos médicos implantados, infecções crônicas e em tecidos danificados (DONLAN; COSTERTON, 2002).

A formação de biofilmes em bactérias se dá em cinco etapas (Figura 6). Na primeira etapa ocorre a ligação reversível a uma superfície, ditada por forças eletrostáticas não específicas de longo alcance (movimento browniano, gravidade) entre a bactéria planctônica e a superfície (considerando superfícies abióticas) e de modo dirigido via quimiotaxia e motilidade através de flagelos, pili, forças hidrodinâmicas, forças de van der Waals e interações hidrofóbicas (PAVITHRA; DOBLE, 2008; O'TOOLE; KOLTER, 1998). A segunda etapa da

adesão bacteriana é a adesão secundária ou adesão irreversível, onde os microorganismos fracamente ligados à superfície consolidam o processo de adesão através da produção de matriz exopolissacarídica (MEPS). Durante essa fase de adesão, os microorganismos são capazes de se ligar a células da mesma ou de diferentes espécies, formando agregados que vão estar firmemente ligados à superfície (STOODLEY et al., 2002). A produção de MEPS ocorre tanto por bactérias Gram-positivas como por Gram-negativas (VU et al., 2009). À medida que as bactérias se desenvolvem em microcolônias maiores na superfície, elas se tornam incorporadas em uma MEPS mais extensa (etapa 3), que forma a base das estruturas de cogumelo mais maduras que contêm subpopulações mortas e vivas de células (etapa 4); na etapa final ocorre a liberação de células planctônicas vivas desses "cogumelos", que colonizam novas superfícies, que reinicia o processo (MONROE, 2007).

Figura 6 - Formação do biofilme é um processo de desenvolvimento complexo envolvendo cinco etapas. Etapa 1 - adesão inicial; 2 - adesão irreversível; 3 - maturação I; 4 - maturação II; 5 - dispersão. Cada etapa do desenvolvimento está acompanhada com a microfotografia do desenvolvimento do biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*. Todas as microfotografias são exibidas na mesma escala.



Fonte: MONROE (2007)

Ao que muitas evidências indicam, após a adesão de células bacterianas, ocorre um aumento na produção, na liberação e na detecção de moléculas sinalizadoras que regulam a formação de biofilme (DAVIES et al., 1998; BJARNSHOLT; GIVSKOV, 2007; HODGKINSON; WELCH; SPRING, 2007). Conforme a densidade bacteriana aumenta, essas moléculas autoindutoras podem se acumular e induzir a transcrição de genes específicos que regulam várias funções como motilidade, virulência, produção de MEPS e a formação de biofilmes (DONLAN, 2002). Esse processo de comunicação que acopla a transcrição de genes específicos com a densidade celular bacteriana, é referido como *Quorum sensing* (QS). Nestas situações, os microorganismos aderidos podem sofrer alterações moleculares específicas e

estabelecer biofilmes para tornarem-se patogênicos (COSTERTON et al., 1999; DONLAN; COSTERTON, 2002).

A sobrevivência dentro do hospedeiro se dá pela integração de respostas adaptativas à expressão gênica e ao nível metabólico, aliada à exploração de características estruturais e funcionais definidas como fator de virulência (NOVICK, 2003), que funcionam como ferramentas de defesa.

Sob tais circunstâncias, ocorrem várias adaptações: as adesinas são produzidas ((VUONG et al., 2004); a MEPS assume diversos papéis, variando desde a adesão de bactérias patogênicas aos tecidos hospedeiros durante os estágios iniciais da invasão a escudo para o patógeno contra fatores imunológicos do hospedeiro e estresses abióticos (ASLAM et al., 2008; BYLUND et al., 2006; HALL-STOODLEY; STOODLEY, 2009); e espécies, como o *S. aureus*, produzem um pigmento amarelo carotenóide - a estafiloxantina - que promove resistência às espécies reativas do oxigênio e ao sistema imunológico do hospedeiro (LEE et al., 2013).

Maior parte dos estudos detalhando o processo de iniciação, maturação e dispersão do biofilme são focados nos patógenos humanos e animais. No entanto, a formação de biofilme por bactérias fitopatógenas tem recebido pouca atenção (DOW et al., 2003; MARQUES et al., 2002; MARQUES et al., 2003).

A inibição da formação de biofilmes de tal forma que o crescimento bacteriano não seja negativamente afetado é uma abordagem alternativa e atraente, visto que pode dificultar o rápido desenvolvimento de resistência bacteriana (RASKO; SPERANDIO, 2010). A habilidade de prejudicar a adesão representa uma estratégia ideal para combater a patogênese bacteriana, dada sua importância nos estágios iniciais do processo de infecção. O bloqueio da adesão bacteriana torna-se uma ferramenta adequada para promover uma intervenção profilática (CEGELSKI et al., 2008) e o uso de agentes naturais que possam inibir com sucesso a adesão torna-se uma ferramenta para a redução da colonização bacteriana em várias superfícies (BAVINGTON; PAGE, 2005). Nos últimos anos, estudos com inibidores de biofilme têm relatado compostos naturais com atividade anti-adesão ou antibiofilme (CHAIEB et al., 2011; LUNA et al., 2011; SÁ et al., 2012; SCHILLACI et al., 2010; WANG et al., 2012).

De acordo com Teixeira e colaboradores (2006), algumas lectinas de plantas são capazes de inibir a aderência bacteriana ao esmalte dentário provavelmente através do bloqueio da adesão por *Streptococcus*. Liljemark e colaboradores (1981) mostraram o efeito das interações específicas lectina-carboidrato entre bactérias e seus resultados sugerem que a formação de grandes agregados provoca uma diminuição do número de bactérias aderentes.

Polifenóis têm recebido atenção por seu efeito antimicrobiano sobre microorganismos organizados em biofilmes, como relatado em alguns estudos com *S. epidermidis* (FERRAZZANO et al., 2009; PRABHAKAR et al., 2010; SCHITO et al., 2010). Extratos ricos em polifenóis de frutos da *Caesalpinia ferrea* mostraram ter atividade antibiofilme sobre as espécies *Streptococcus* sp., *Candida albicans* e *Lactobacillus casei* (SAMPAIO et al., 2009). Poucos estudos analisaram a atividade anti-biofilme de cumarinas (GIRENNAVAR et al., 2008; PRAUD-TABARIES et al., 2009). Contudo, outros estudos mostram a atividade antimicrobiana das cumarinas, terpenos (exceto óleos voláteis) e esteróides (OJALA et al., 2000; POPOVA et al., 2009; SPARG et al., 2004; SMYTH et al., 2009).

3 MÉTODO

As metodologias aplicadas para a coleta dos materiais vegetais, extrações a partir dos vários tecidos vegetais coletadas na Caatinga e pré-purificação de proteínas das sementes e polifenóis das folhas da *A. leiocarpa* estão descritas nos artigos (RESULTADOS). Também estão descritas as metodologias para cromatografia, eletroforese, espectroscopia de massas, espectroscopia de dicroísmo circular, espectroscopia de fluorescência, avaliação da atividade hemaglutinante, dosagem proteica, atividade inibidora de protease, atividades antioxidantes e avaliação da atividade antimicrobiana.

4 RESULTADOS

4.1 ARTIGO 1 - “Screening of Caatinga plants as sources of lectins and trypsin inhibitors”

Natural Product Research, 2014
<http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2014.900497>



SHORT COMMUNICATION

Screening of Caatinga plants as sources of lectins and trypsin inhibitors

José Héilton Vasconcelos Arcoverde, Aline de Souza Carvalho,
 Fernanda Pacífico de Almeida Neves, Bianca Paiva Dionízio, Emmanuel Viana Pontual,
 Patrícia Maria Guedes Paiva, Thiago Henrique Napoleão*, Maria Tereza dos Santos Correia,
 Márcia Vanusa da Silva and Maria das Graças Carneiro-da-Cunha

Departamento de Bioquímica, CCB, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-420 Recife, Pernambuco, Brazil

(Received 2 January 2014; final version received 25 February 2014)

Although it is one of the most threatened areas in the Earth, there are few studies on the biotechnological potential of the Caatinga. This work evaluated 36 extracts from 27 Caatinga plants for lectin and trypsin inhibitor activities. The presence of lectin was detected in 77.7% of samples by haemagglutinating assay. The highest values of specific haemagglutinating activity were found in extracts of leaves from *Mimosa lewesii*, *Bauhinia acuruana* and *Manilkara rufula* and in branches from *Myracrodruon urundeuva*. Trypsin inhibitor activity was detected in 63.9% of the tested extracts, strong inhibitory effect (>70%) being found in 11 samples. This work demonstrates that Caatinga is a potential source of bioactive plant proteins that can be isolated and studied for several applications. The biochemical prospecting of Caatinga is essential for collection of bioactive principles so as to add conservation value to the region.

Keywords: biochemical prospecting; Caatinga; lectin; plant proteins; protease inhibitor

1. Introduction

The Caatinga is a uniquely Brazilian vegetation formation that has been recognised as one of the 37 large wilderness areas of the planet (Mittermeier et al. 2002). The Caatinga is composed of seasonally dry forests due to irregular rainfall regime and shrubby-spiny vegetation (Leal et al. 2005) and has an area of 844,453 km², corresponding to approximately 10% of the national territory (IBAMA/MMA 2010). Approximately 50% of this environment has been degraded as a result of human activities (IBAMA/MMA 2010) and currently the Caatinga has less than 1% of its area protected in full conservation units, which comprises neither all the kinds of formations nor all its riches (Leal et al. 2005).

There have been few ethnobotanical studies in the semi-arid northeast, which still has some of the lowest scores of socio-economic indicators in Brazil (Albuquerque & Andrade 2002). The expansion of actions aimed at biochemical bioprospecting of plants of the Caatinga is extremely important, since tropical plants have been sources of material for the production of pain relievers, tranquilisers, diuretics, laxatives and antibiotics, as well as new alternatives for industry and agriculture (Souza & Felfili 2006).

Lectins are proteins or glycoproteins that interact specifically with carbohydrates (Correia et al. 2008). These molecules can act in the defense mechanism against pathogens and insects, in the regulation of endogenous proteinases, as signs of responses to environmental conditions, as

*Corresponding author. Email: thiagohn86@yahoo.com.br

enzyme modulators, and in the recognition, liaison and colonisation of nitrogen-fixing bacteria in cells of roots (Chrispeels & Raikhel 1991; Sreevidya et al. 2005; Vandenborre et al. 2011).

Lectins have been suggested as natural compounds for controlling fungi and insects which are safer than synthetic agrochemical products. In addition, they are used in structural and functional studies of complex carbohydrates as well as to analyse changes in the cell surface during physiological and pathological processes (e.g. cancer), including as main components of microarrays (Gemeiner et al. 2009). Antimicrobial activity of lectins has been reported in the literature against fungi and bacteria (Oliveira et al. 2008; Gomes et al. 2013). The toxicity of lectins has also been studied with the aim of ensuring their safe use vis-à-vis the human health (Rolim et al. 2011).

Protease inhibitors are proteins that interact specifically and reversibly with proteolytic enzymes, promoting their inhibition through competition with the substrate for the active site of the enzyme. Protease inhibitors have been used in studies to evaluate their antimicrobial (Kim et al. 2009) and insecticidal action (Pontual et al. 2014).

These two classes of vegetable proteins – lectins and protease inhibitors – have been investigated for their applications in several biological processes. Despite the growing interest for the isolation and structural and functional characterisation of these proteins, there have been few studies in Caatinga in spite of the biochemical potential of the species of this region. In this way, this work describes a survey of the presence of proteins with trypsin inhibitor or lectin activities in various species (see Supplementary material) present in Caatinga, with the aim of contributing to the collection of bioactive principles so as to add value to the region.

2. Results and discussion

From a total of 36 samples, 28 (77.7%) showed haemagglutinating activity (HA). The protein concentration in saline extracts of the species ranged from 0.95 to 20.88 mg/mL (Table 1). The highest values of specific HA indicated the extracts with a greater concentration of lectins among the extracted proteins. In this study it was observed that the extracts of leaves of *Mimosa lewesii*, *Bauhinia acuruana* and *Manilkara rufula* and of branches of *Myracrodruon urundeuva* showed the best values of specific HA.

The inhibitory activity of bovine trypsin, a serine proteinase, was evaluated in the extracts from the species listed in Table 1. From a total of 36 samples, 23 (63.9%) inhibited to some level the enzymatic activity of trypsin, where 11 (47.8%) samples strongly inhibited the enzyme activity, 7 (30.4%) inhibited moderately and 5 (21.7%) caused weak inhibition.

Lectins with insecticidal activity have already been isolated from the heartwood, inner bark and leaves of *M. urundeuva* (Napoleão et al. 2011, 2012). The detection of lectin in the *M. urundeuva* branches reinforces the great potential of this Caatinga plant as source of useful biomolecules. Just as in *Eugenia brejoensis*, studied in this work, another species of this genus, *Eugenia malaccensis*, contains a lectin in its seeds, which has antibacterial activity (Brustein et al. 2012). Lectins from seeds of *Cratylia mollis*, a Caatinga plant, have shown several biological activities such as immunomodulatory, antitumour, healing and mutagenic activities (Santos et al. 2013).

Even though the method for detecting HA is the most commonly used for checking the presence of lectins, this test may produce false-negative results under several circumstances: if the lectin coexists with inhibitors, interacts with substances present in the blood (such as glycoproteins containing sialic acid, heterocyclic amines, carbohydrates and certain metal ions) or if the receptors containing carbohydrates present in the erythrocytes do not exist in sufficient numbers or are inaccessible as well as if the lectin presents low specificity for the carbohydrates of the erythrocyte (Toms 1981).

Table 1. Studied species and their tissues examined for lectin and trypsin inhibitor activity with the respective titres of HA, protein concentration (mg/mL) and trypsin inhibitory effect of the saline extracts.

Species	Tissue/organ	HA (titre ⁻¹)	Protein (mg/mL)	Specific HA	Inhibition of trypsin (%)
<i>Abarema cochliacapos</i>	Leaves	2048	4.55	449.8	–
<i>A. colubrina</i> var. <i>cebil</i>	Bark	512	4.08	125.3	–
<i>A. colubrina</i> var. <i>cebil</i>	Leaves	4	3.18	1.2	52.46
<i>Apuleia leiocarpa</i>	Seeds	256	1.04	244.7	41.39
<i>A. leiocarpa</i>	Pericarp	32	2.95	10.8	100
<i>B. acuruana</i>	Leaves	2048	4.32	473.6	100
<i>Buchenavia capitata</i>	Leaves	2048	4.57	448.1	100
<i>B. gardneriana</i>	Leaves	2048	5.60	365.5	–
<i>Chamaecrista desvauxii</i>	Leaves	–	3.00	–	100
<i>Commiphora leptophloeos</i>	Branches	2048	12.71	161.0	18.85
<i>Commiphora leptophloeos</i>	Bark	2048	17.80	115.0	–
<i>Dioclea grandiflora</i>	Leaves	256	4.11	62.2	63.52
<i>E. brejoensis</i>	Seeds	256	0.95	267.5	–
<i>E. brejoensis</i>	Leaves	64	1.43	44.5	–
<i>Harpochilus neesianus</i>	Branches + leaves + fruits	–	2.67	–	58.19
<i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>courbaril</i>	Leaves	32	1.08	29.6	35.24
<i>Ipomea brasiliensis</i>	Branches + leaves	512	5.18	98.7	–
<i>Jacaranda rugosa</i>	Leaves	64	4.48	14.2	40.97
<i>J. rugosa</i>	Branches	–	9.72	–	100
<i>M. rufula</i>	Leaves	2048	4.42	463.3	–
<i>M. rufula</i>	Fruits	128	1.32	96.9	28.27
<i>M. lewesii</i>	Leaves	2048	3.58	571.1	–
<i>M. urundeuva</i>	Branches	2048	3.93	520.3	–
<i>Myroxylum peruiferum</i>	Leaves	–	3.88	–	100
<i>Ouratea blanchetiana</i>	Leaves	64	3.25	19.6	–
<i>Parkinsonia aculeata</i>	Branches	–	2.02	–	25.85
<i>Piptadenia viridiflora</i>	Branches	–	1.84	–	72.13
<i>Pityrocarpo moniliformis</i>	Pericarp	512	2.40	213.0	100
<i>Poincianella microphylla</i>	Fruits	512	4.37	117.1	–
<i>P. microphylla</i>	Leaves	512	5.83	87.7	–
<i>Senna splendida</i>	Branches	–	1.20	–	100
<i>Sida galheirensis</i>	Branches	–	5.03	–	86.34
<i>Sideroxylon obtusifolium</i>	Leaves	1024	2.67	383.5	83.60
<i>S. obtusifolium</i>	Branches	2048	18.19	112.5	35.24
<i>S. obtusifolium</i>	Fruits	2048	20.88	98.0	5.73
<i>Stigmaphyllon paralias</i>	Leaves	512	11.58	44.2	13.52

Note: –, no activity.

In this work, inhibitory activity of trypsin was detected in several extracts. The specificity of the interaction of the inhibitors occurs due to the presence of amino acid residues at the reactive site of the inhibitor which interact specifically and reversibly with the residues of the active site of the target enzyme, allowing the formation of a stable complex (Bode & Huber 2000).

The study of applications of inhibitors isolated from these species may contribute in the future, for example, to the treatment of metabolic dysfunctions associated with proteolytic enzymes, such as in cases of pancreatitis, emphysema, inflammations and certain cancers, as well as to the understanding of the involvement of these proteins in plant defense mechanisms against the onslaught of different pathogens and predators. On the other hand, among the species studied that are used as human food or animal feed, only one did not exhibit inhibitory activity against trypsin, *Byrsonima gardneriana*. The presence of protease inhibitors can be regarded as

an important anti-nutritional factor, since populations residing in Caatinga, for example, in addition to not having a nutritionally recommended diet, use food species that interfere with proper digestion.

It is also important to highlight that the results found in this work do not mean that lectins or trypsin inhibitors are definitely absent in the plants whose extracts evaluated here did not show haemagglutinating or trypsin inhibitor activities. For example the conditions of drying of plant tissues and the extraction method may have been reasons for absence of one or both of these activities.

3. Conclusion

This work demonstrates that in Caatinga there is a wealth of biochemical resources to be exploited by the scientific community, since the two protein categories analysed in this study have great biotechnological potential. The isolation and structural and functional characterisation of these proteins will contribute to a better knowledge of Caatinga and of the biochemical potential of its species and their applications. Ethnobotanical studies can also be added to the results found and bring benefits to the population using such plants, improving the nutritional quality of life of these people.

Supplementary material

Experimental details are available online, alongside Table S1.

Acknowledgements

This work was supported by the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq) for research grants and fellowship (PMGP, MTSC and MGCC) as well as by the *Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco* (FACEPE), the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES) and the Brazilian Ministry of Science, Technology and Innovation (MCTI).

References

- Albuquerque UP, Andrade LHC. 2002. Conhecimento botânico tradicional e conservação em uma área de caatinga no Estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil. *Acta Bot Bras.* 16:273–285.
- Bode W, Huber R. 2000. Structural basis of the endoproteinase–protein inhibitor interaction. *Biochim Biophys Acta.* 1477:241–252.
- Brustein VP, Souza-Araújo FV, Vaz AFM, Araújo RVS, Paiva PMG, Coelho LCBB, Carneiro-Leão AMA, Teixeira JA, Carneiro-da-Cunha MG, Correia MTS. 2012. A novel antimicrobial lectin from *Eugenia malaccensis* that stimulates cutaneous healing in mice model. *Inflammopharmacology.* 20:315–322.
- Chrispeels MJ, Raikhel NV. 1991. Lectins, lectin genes, and their role in plant defense. *Plant Cell.* 3:1–9.
- Correia MTS, Coelho LCBB, Paiva PMG. 2008. Lectins, carbohydrate recognition molecules: are they toxic? Recent trends in toxicology. Kerala: Transworld Reserarch Network; p. 47–59.
- Gemeiner P, Mislovičová D, Tkáč J, Švitel J, Pätöprstý V, Hrabárová E, Kogan G, Kožár T. 2009. Lectinomics II. A highway to biomedical/clinical diagnostics. *Biotechnol Adv.* 27:1–15.
- Gomes FS, Procópio TF, Napoleão TH, Coelho LCBB, Paiva PMG. 2013. Antimicrobial lectin from *Schinus terebinthifolius* leaf. *J Appl Microbiol.* 114:672–679.
- IBAMA/MMA. 2010. Monitoramento do desmatamento nos biomas brasileiros por satélite – Monitoramento do Bioma caatinga 2002 a 2008. Centro de Sensoriamento Remoto – CSR/IBAMA. Relatório Técnico 72.
- Kim J-Y, Park S-C, Hwang I, Cheong H, Nah J-W, Hahn K-S, Park Y. 2009. Protease inhibitors from plants with antimicrobial activity. *Int J Mol Sci.* 10:2860–2872.
- Leal IR, Silva JM, Tabarelli M, Lacher TE Jr. 2005. Mudando o curso da conservação da biodiversidade na Caatinga do Nordeste do Brasil. In: Megadiversidade. Belo Horizonte: Conservação Internacional do Brasil; p. 139–146.
- Mittermeier RA, Mittermeier CG, Gil PR, Pilgrim J, Fonseca GAB, Brooks T, Konstant WR. 2002. Wilderness: earth's last wild places. Mexico: CEMEX Agrupación Serra Madre.

- Napoleão TH, Gomes FS, Lima TA, Santos NDL, Sá RA, Albuquerque AC, Coelho LCBB, Paiva PMG. 2011. Termiticidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* against *Nasutitermes corniger* and its mechanisms. *Int Biodeter Biodegr.* 65:52–59.
- Napoleão TH, Pontual EV, Lima TA, Santos NDL, Sá RA, Coelho LCBB, Navarro DMAF, Paiva PMG. 2012. Effect of *Myracrodruon urundeuva* leaf lectin on survival and digestive enzymes of *Aedes aegypti* larvae. *Parasitol Res.* 110:609–616.
- Oliveira MDL, Andrade CAS, Santos-Magalhães NS, Coelho LCBB, Teixeira JA, Carneiro-da-Cunha MG, Correia MTS. 2008. Purification of a lectin from *Eugenia uniflora* L. seeds and its potential antibacterial activity. *Lett Appl Microbiol.* 46:371–376.
- Pontual EV, Santos NDL, Moura MC, Coelho LCBB, Navarro DAMF, Napoleão TH, Paiva PMG. 2014. Trypsin inhibitor from *Moringa oleifera* flowers interferes with survival and development of *Aedes aegypti* larvae and kills bacteria inhabitant of larvae midgut. *Parasitol Res.* 113:727–733.
- Rolim LADMM, Macêdo MFS, Sisenando HA, Napoleão TH, Felzenszwalb I, Aiub CAF, Coelho LCBB, Medeiros SRB, Paiva PMG. 2011. Genotoxicity evaluation of *Moringa oleifera* seed extract and lectin. *J Food Sci.* 76: T53–T58.
- Santos AFS, Napoleão TH, Bezerra RF, Carvalho EVMM, Correia MTS, Paiva PMG, Coelho LCBB. 2013. Strategies to obtain lectin from distinct sources. In: *Advances in medicine and biology*. New York: Nova Science Publishers, Inc.; p. 33–60.
- Souza CD, Felfili JM. 2006. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás. *Acta Bot Bras.* 20:135–145.
- Sreevidya VS, Hernandez-Oane RJ, So RB, Sullia SB, Stacey G, Ladh JK, Reddy PM. 2005. Expression of the legume symbiotic lectin genes psl and gs52 promotes rhizobial colonization of roots in rice. *Plant Sci.* 169:726–736.
- Toms GC. 1981. *Advances in Legume Systematics*. vol. 2 Kew, Royal Botanic Gardens. London: Lectins in Leguminosae; p. 561–577.
- Vandenborre G, Smagghe G, Van Damme EJM. 2011. Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects. *Phytochemistry.* 72:1538–1550.

4.2 ARTIGO 2 - “Purification, characterization and antibacterial potential of a lectin isolated from *Apuleia leiocarpa* seeds”

International Journal of Biological Macromolecules 75 (2015) 402–408



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

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



Purification, characterization and antibacterial potential of a lectin isolated from *Apuleia leiocarpa* seeds



Aline de Souza Carvalho^a, Márcia Vanusa da Silva^a, Francis Soares Gomes^b,
Patrícia Maria Guedes Paiva^a, Carolina Barbosa Malafaia^a, Tulio Diego da Silva^a,
Antônio Fernando de Melo Vaz^c, Alexandre Gomes da Silva^a,
Isabel Renata de Souza Arruda^a, Thiago Henrique Napoleão^{a,*},
Maria das Graças Carneiro-da-Cunha^a, Maria Tereza dos Santos Correia^a

^a Departamento de Bioquímica-CCB, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-420 Recife, Pernambuco, Brazil

^b Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, 57072-900 Maceió, Alagoas, Brazil

^c Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, Jatobá, 58700-970 Patos, Paraíba, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 June 2014

Received in revised form 31 January 2015

Accepted 2 February 2015

Available online 7 February 2015

Keywords:

Lectin

Apuleia leiocarpa

Xanthomonas campestris

ABSTRACT

Apuleia leiocarpa is a tree found in Caatinga that has great value in the timber industry. Lectins are carbohydrate-binding proteins with several biotechnological applications. This study shows the isolation, characterization, and antibacterial activity of *A. leiocarpa* seed lectin (ApulSL). The lectin was chromatographically isolated from a crude extract (in 150 mM NaCl) by using a chitin column. ApulSL adsorbed to the matrix and was eluted using 1.0 M acetic acid. Native ApulSL was characterized as a 55.8-kDa acidic protein. SDS-PAGE showed three polypeptide bands, whereas two-dimensional electrophoresis revealed four spots. The peptides detected by MALDI TOF/TOF did not show sufficient homology (<30%) with the database proteins. Circular dichroism spectroscopy suggested a disordered conformational structure, and fluorescence spectrum showed the presence of tyrosine residues in the hydrophobic core. The hemagglutinating activity of ApulSL was present even after heating to 100 °C, was Mn²⁺-dependent, and inhibited by N-acetylglucosamine, D(-)-arabinose, and azocasein. ApulSL demonstrated bacteriostatic and bactericidal effects on gram-positive and gram-negative species, being more effective against three varieties of *Xanthomonas campestris* (MIC ranging from 11.2 to 22.5 µg/mL and MBC of 22.5 µg/mL). The results of this study reinforce the importance of biochemical prospecting of Caatinga by revealing the antibacterial potential of ApulSL.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The Caatinga is a type of vegetation exclusive to Brazil and has been recognized as one of the most important natural regions of the world [1]. Ethnobotanical surveys are important in bioprospecting, to find herbal medicines and other biotechnologically relevant compounds [2]. Although Caatinga is one of the most threatened biomes on the planet, few ethnobotanical studies have been conducted in the Brazilian semi-arid region [3].

Plants from Fabaceae family (leguminous plants) are well known because of the many species used for human consumption, such as soy, beans, and peas. However, Fabaceae plants that are not used in the diet have been poorly studied as sources of compounds

with biotechnological potential [4]. *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J. F. Macbride is a tree belonging to the sub-family Caesalpinioideae of Fabaceae. In Brazil, it is commonly known as “grábia” and “jataí,” among other names [5]. It has a wide distribution, occurring from northeastern Brazil to Uruguay and Argentina, and it prefers mountain slopes and well-drained soils [6]. The tree is used in the tanning, timber, and construction industries [6–8]. It also has potential for use in agroforestry systems and has ornamental and reforestation uses [6,9].

Lectins are proteins from non-immune origin, which bind specifically and reversibly to free sugars or to the subterminal or terminal residues of glycoconjugates [10]. These proteins have been the most studied in leguminous species, because they are frequently very abundant in the seeds of these plants and may constitute up to 10% of the total protein [11,12]. Many lectins have been also isolated from other plant tissues and families [13].

* Corresponding author. Tel.: +55 8121268540; fax: +55 8121268576.
E-mail address: thiagohn86@yahoo.com.br (T.H. Napoleão).

Lectins have been used in biorecognition technology to investigate the structure and function of complex carbohydrates and to map changes in cell surface during physiological and pathological processes [14]. They also have shown immunomodulatory, anti-inflammatory, antitumor, hypotensive, insecticidal, antiviral, antifungal, and antibacterial activities [13,15–21]. The antimicrobial activity of lectins may result from their ability to interact with carbohydrates on the cell surface of microbes. Antibacterial lectins can interact with bacterial cell wall components such as *N*-acetylglucosamine, *N*-acetylmuramic acid (MurNAc), tetrapeptides linked to MurNAc, and lipopolysaccharides [19].

The phytopathogenic bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* causes black rot and produces extracellular enzymes that promote plant cell wall degradation, which contributes to its pathogenicity [22]. *X. campestris* pv. *viticola* is the causal agent of bacterial canker of grapevine, causing necrotic spots in inflorescences and dark, roughly rounded lesions in the rachis and berries. It is considered a pest in the northeastern states of Bahia, Pernambuco, and Piauí [23,24]. *X. campestris* pv. *malvacearum* attacks cotton crops causing angular lesions in the leaves that are initially green and oily, and later brown and necrotic [25].

An initial screening of 36 extracts from 27 Caatinga plants, including *A. leiocarpa*, revealed that 77.7% of the samples had hemagglutinating activity, which is indicative of the presence of lectin [26]. The present study describes the purification, characterization and antibacterial activity of a lectin extracted from the seeds of *A. leiocarpa* (ApulSL), as part of an effort to expand the knowledge of bioactive compounds found in Caatinga plants.

2. Materials and methods

2.1. Plant material and extract preparation

A. leiocarpa seeds were collected from the National Park of Catimbau (PARNA Catimbau), Pernambuco, Brazil, from January 2011 to July 2011. The taxonomic identification was performed in the Herbarium Dárdano de Andrade Lima at the Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) and the testimonial material was archived under the number 84886.

For preparation of the extract, the seeds were dried at 45 °C and processed by grinding. The seed flour was homogenized under agitation for 4 h at 28 °C with 150 mM NaCl to yield a final concentration of 10% (w/v). The homogenate was filtered through filter paper and centrifuged at 3600 rpm for 15 min. The supernatant was the crude extract (CE).

2.2. Protein content and hemagglutinating activity (HA)

Protein concentration was determined according to Lowry et al. [27] using a standard bovine serum albumin curve with values between 31.25 and 500 µg/ml. Protein concentration was also estimated using the absorbance at 280 nm.

The lectin activity was measured by determining hemagglutinating activity (HA) according to Paiva and Coelho [28] in 96-well microtiter plates (Kartell SPA, Italy). The HA assay was started by adding 50 µL of 150 mM NaCl to all wells and 50 µL of the sample in the second well of the horizontal row. Successive dilutions were performed until a ratio of 1:2048 was achieved. Next, 50 µL of a 2.5% (v/v) suspension of glutaraldehyde-treated erythrocytes [29] from humans (A, B or O-types) or rabbits was added. The number of units of hemagglutinating activity was defined as the reciprocal of the highest dilution of sample that promoted full agglutination of erythrocytes. The specific HA was defined as the ratio between the units and protein concentration (mg/mL).

2.3. Purification of ApulSL

The CE (1.0 mg of protein) was loaded onto a chitin (7.5 cm × 1.5 cm) column equilibrated with 150 mM NaCl. The column was washed with the equilibrating solution until absorbance at 280 nm was lower than 0.030. Elution was performed with 1.0 M acetic acid. Fractions of 2 ml were collected every 6 minutes and monitored by absorbance at 280 nm. The fractions with absorbance ≥ 0.100 were pooled (ApulSL) and dialyzed in aqueous 150 mM NaCl to remove the acetic acid.

2.4. Characterization of ApulSL HA

Inhibition of HA was evaluated using carbohydrates and glycoproteins. HA assays were performed as described above but replacing the solution of 150 mM NaCl with a solution of the carbohydrate prepared in 150 mM NaCl. In addition, there was an interval of 45 min between the end of sample dilution in carbohydrate solution and the addition of erythrocyte suspension. The concentrations of inhibitor solutions were 100 and 200 mM for carbohydrates [D(–) arabinose, L(+) arabinose, fructose, fucose, glucose, galactose, D-lactose, D(+) maltose, mannose, methyl-α-D-mannopyranoside, *N*-acetyl-galactosamine, *N*-acetyl-glucosamine, raffinose, rhamnose, and D(–)-ribose] and 250 and 500 µg/mL for glycoproteins (azocasein, casein, fetuin, and thyroglobulin).

The effect of divalent ions (Ca²⁺, Mg²⁺, and Mn²⁺) on the ApulSL HA was evaluated. The lectin was dialyzed with 5 mM EDTA (16 h at 4 °C) and then with 150 mM NaCl (6 h at 4 °C) to remove the EDTA. Next, the dialyzed ApulSL was incubated for 45 min with 10 mM Ca²⁺, Mg²⁺, or Mn²⁺ and then HA was evaluated. The effect of these cations on HA of ApulSL non-treated with EDTA was also determined.

The effect of temperature on the ApulSL HA was evaluated by heating an aliquot of ApulSL (1.5 ml) during 30 min at 30, 40, 50, 60, 70, 80, or 100 °C and for 2 h at 100 °C prior to HA assay. HA of ApulSL was also determined after heating for 30 min at 121 °C in an autoclave.

The ApulSL HA was also evaluated after it was boiled for 5 min at 100 °C with electrophoresis buffer (1.0 M Tris–HCl pH 6.8; 0.2 g sodium dodecyl sulphate; 1.0 ml glycerol; 2 mg bromophenol blue). Control assays were also performed by incubating erythrocytes only with buffer.

2.5. Gel filtration chromatography

A sample of ApulSL (500 µg) in 150 mM NaCl was loaded onto a HiPrep Sephacryl™ 16/60 S100 HR column (GE Healthcare, Sweden) coupled to an ÄKTApriime system to determine the molecular mass of the native protein. The chromatography was performed at a flow rate of 0.5 mL/min in 150 mM NaCl. Fractions of 2 ml were collected and protein elution was monitored by absorbance at 280 nm. Molecular mass standards, phosphorylase b (97 kDa), albumin (66 kDa), ovalbumin (45 kDa), carbonic anhydrase (30 kDa), trypsin inhibitor (20.1 kDa), and α-lactalbumin (14.4 kDa), were similarly chromatographed.

2.6. Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)

PAGE for native acidic proteins [15% gel (w/v)] was performed according to Davis [30] and PAGE for native basic proteins was performed according to Reisfeld et al. [31]. Polypeptide bands were stained with 0.02% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 in 10% acetic acid (for acidic proteins) or 1% Amido Black in 10% acetic acid (for basic proteins).

Electrophoresis on a 15% (w/v) polyacrylamide gel in the presence of sodium dodecyl sulphate (SDS-PAGE) was performed

according to Laemmli [32]. Polypeptide bands of ApulSL and molecular mass standards (bovine albumin, 66 kDa; ovalbumin, 45 kDa; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, 36 kDa; bovine carbonic anhydrase, 29 kDa; bovine trypsinogen, 24 kDa; trypsin inhibitor soybean, 20.1 kDa; α -lactalbumin, 14.4 kDa) were stained with 0.02% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 in 10% acetic acid.

2.7. Two-dimensional electrophoresis

ApulSL (200 μ g) was mixed with 250 μ L of rehydration buffer containing 8.0 M urea, 2% (w/v) CHAPS, 20 mM dithiothreitol (DTT), 0.5% IPG buffer (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA), and 0.002% (w/v) bromophenol blue. The samples were loaded on an IPG strip of 13 cm (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) and a linear pH range from 3.0 to 10.0. The isoelectric focusing was performed on Ettan IPGphor III system (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) following the manufacturer's protocol. Before running the second dimension electrophoresis, the strip was equilibrated for 15 min in fresh buffer (6 M urea, 30% (v/v) glycerol, 2% (w/v) SDS, and 100 mM Tris-HCl pH 8.8) with the addition of 100 mM DTT. Next, the strip was treated for 15 min with the same buffer supplemented with 0.25 M iodoacetamide. The equilibrated IPG strip was transferred to 12.5% (w/v) SDS-PAGE gel. The proteins in the gel were visualized by staining with Coomassie Brilliant Blue R-250. Images with scanning resolution of 300 dpi and 16-bit pixel depth were acquired and then analyzed using the software Image Master 2D Platinum 6.0 (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA).

2.8. Mass spectrometry

Digestion of the polypeptide spots with trypsin (25 ng/mL) was performed as described by Shevchenko et al. [33], omitting the alkylation step and the in-gel reduction steps. The digested peptides in 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) were mixed (1:1) with a solution of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (4 mg/mL) in 50% acetonitrile and 0.3% TFA. After recrystallization, the samples were analyzed in a mass spectrometer MALDI-TOF/TOF (Ultraflex, Bruker Daltonik) in reflectron mode. On average, 10 MS/MS spectra were measured for each protein digested. The mass spectrometer was calibrated with standard from Bruker Daltonik GmbH.

Data analysis was performed using BioTools software 3.0 (Bruker Daltonik) and search engine MASCOT (Matrix Sciences, UK). Searches were performed using the following parameters: mass tolerance of 0.7 Da was adjusted to fragmented ions; trypsin was defined as the proteolytic enzyme with two missed cleavages permitted; charge state of 1+ was used; carbamidomethylation of cysteine residues was used as a fixed modification; and oxidation of methionine residues was defined as a change in the variable. MSDB, Swissprot, and NCBI nr databases and the MASCOT search engine available online were used to identify proteins (Matrix Science, UK).

2.9. Circular dichroism (CD) spectroscopy

CD measurements were performed using a spectropolarimeter (JASCO J-810, Tokyo, Japan). The protein concentration was 300 μ g/mL (dissolved in Milli-Q water) and the assays were performed at 25 °C. The CD spectra were measured in the far UV range (190–250 nm) in a quartz cuvette with a 10 mm optical path. The baselines (water only) were subtracted from the protein spectra. Results were expressed as mean residue ellipticity $[\theta]$, defined as $[\theta] = \theta_{\text{obs}} / (10 \cdot C \cdot l \cdot n)$, where θ_{obs} is the CD in millidegrees, C is the protein concentration (M), l is the path-length of the cuvette (cm), and n is the number of amino acid residues, assuming an average of 469 residues according to results from gel filtration chromatography.

2.10. Fluorescence spectroscopy

Intrinsic fluorescence assay was performed on a spectrofluorimeter (JASCO FP-6300, Tokyo, Japan). The intensity of fluorescence emission of hydrophobic residues from the protein dissolved in Milli-Q water was measured at 25 °C in a rectangular quartz cuvette with a path length of 10 mm. For measurements of intrinsic fluorescence, excitation was at 280 nm and emission at 305–450 nm was recorded using 10 nm. The contribution of the solvent (distilled water) was subtracted. The center of spectral mass (CM) was calculated according to the equation: $CM = \sum I_{\lambda} F_{\lambda} / \sum F_{\lambda}$, where F_{λ} is the fluorescence emission at wavelength I_{λ} , and the summation was carried out over the range of appreciable values of F .

2.11. Antibacterial activity

Strains of the gram-positive bacteria *Enterococcus faecalis* (ATCC 6057/UFPEA 138), *Streptococcus pyogenes* (UFPEA 07), *Micrococcus luteus* (ATCC 2225/UFPEA 320), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633/UFPEA 86), *Bacillus cereus* (ATCC11778/UFPEA 213), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538/UFPEA 02), and *Staphylococcus epidermidis* (UFPEA 183) and of the gram-negative bacteria *Escherichia coli* (ATCC 25922/UFPEA 224), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853/UFPEA 416), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 29665/UFPEA 396), *Salmonella enteritidis* (UFPEA 415), and *Shigella sonnei* (UFPEA 413) were provided by the Departamento de Antibióticos at the Universidade Federal de Pernambuco, Brazil. The gram-negative species *Acidovorax citrulli* (Ac 1.12), *Pectobacterium carotovorum* (Pcc 31), *Ralstonia solanacearum* (Rsol CM10R22), *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Xcv 137), *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* (Xcm 11.2.1), and *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc 53) were provided by the Laboratório de Fitobacteriologia of the Universidade Federal Rural de Pernambuco. Stationary cultures were maintained on nutrient agar (NA) or Müller Hinton agar and stored at 4 °C. To evaluate antimicrobial activity, bacteria were grown on Müller Hinton Broth at 37 °C for 24 h. The cultures were adjusted turbidimetrically to 0.5 on the McFarland scale.

ApulSL (0.36 mg/mL, dissolved in sterile 150 mM NaCl) was added (100 μ L) to a plate well containing 100 μ L of Nutrient Broth (NB) or Müller Hinton Broth and serially diluted in a 96-well microplate until a final ratio of 1:2048. Each well was then inoculated with 20 μ L of bacterial culture. Negative control contained only culture medium (100 μ L) and sterile 0.15 M NaCl (100 μ L). In 100% growth control, the microorganisms (20 μ L) were incubated with culture medium (100 μ L) and sterile 150 mM NaCl (100 μ L). Also, assays were performed using amoxicillin (1.0 mg/mL) as positive control. After incubation (37 °C, 24 h), minimum inhibitory concentration (MIC) was determined as the lowest concentration of lectin at which there was a $\geq 50\%$ reduction in optical density at 490 nm in regard to the control [34].

Inoculations (10 μ L) from the control and from the wells in which inhibition of bacterial growth was detected were transferred to NA or Müller-Hinton agar plates and incubated at 37 °C for 24 h. Minimum bactericidal concentration (MBC) was defined as the lowest lectin concentration that reduced the number of colony-forming units (CFU) by 99.9% in comparison with control. All antibacterial assays were performed in triplicate.

3. Results

3.1. Purification and structural characterization of ApulSL

CE from *A. leiocarpa* seeds showed a HA of 256, which was totally lost after heating at 100 °C for 1 h and partially inhibited by

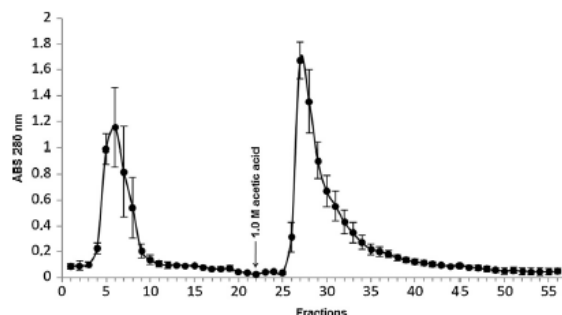


Fig. 1. Isolation of *Apuleia leiocarpa* seed lectin (ApulSL) by chromatography of crude extract on chitin column. The arrow indicates the addition of the 1.0 M acetic acid eluent. Fractions of 2.0 ml were collected. Each dot represents the average of three experiments.

Table 1
Summary of purification of *Apuleia leiocarpa* seed lectin (ApulSL).

Sample	HA (units)	Protein (mg/mL)	Specific HA	Purification (fold)
CE	256	3.87	66.15	1.0
ApulSL	512	0.062	8258	124.8

CE: crude extract; HA: hemagglutinating activity. The number of units of hemagglutinating activity was defined as the reciprocal of the highest dilution of sample that promoted full agglutination of erythrocytes.

N-acetylglucosamine (100 mM). The CE was then chromatographed on a chitin column (Fig. 1). The non-adsorbed fractions did not show HA and elution with 1.0 M acetic acid gave a single active protein peak. The eluted fractions were pooled and the preparation was named ApulSL. After the removal of eluent by dialysis, ApulSL showed a specific HA which was higher than that of the CE, as shown in Table 1.

Analysis of ApulSL by gel filtration chromatography showed a single peak corresponding to a native molecular mass of 55.8 kDa (Fig. 2). In PAGE for native acidic proteins, a single band was detected (Fig. 2, inset 1) while no band was detected in the native PAGE for basic proteins. SDS-PAGE of ApulSL revealed three polypeptide bands with molecular masses 22, 16, and 14 kDa (Fig. 2, inset 2). Two-dimensional electrophoresis of ApulSL revealed four spots (Fig. 3), with respective isoelectric points (pI) and molecular

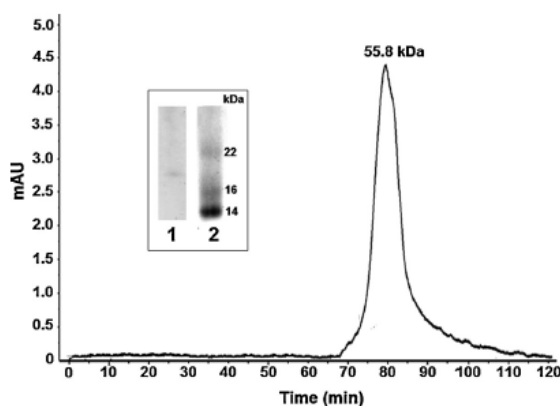


Fig. 2. Profile of native ApulSL on gel filtration chromatography on a HiPrep 16/60 Sephacryl S-100HR column coupled to ÄKTA prime system. A 500 µg sample was injected and eluted (2.0 mL fraction) with 0.15 M NaCl. The insets represent PAGE for native acidic proteins (1) and SDS-PAGE of ApulSL (2).

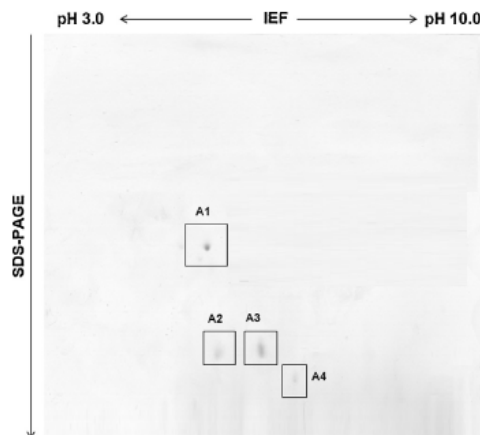


Fig. 3. Two-dimensional electrophoresis of *Apuleia leiocarpa* seed lectin (ApulSL). There were four spots with the following molecular weights and isoelectric points: 21 kDa and 5.4 (A1); 16 kDa and 5.6 (A2); 16 kDa and 6.4 (A3); 14 kDa and 7.1 (A4). The gel was stained with Coomassie Brilliant Blue.

Table 2
Mass spectrometry analysis of peptides originated after digestion by trypsin of ApulSL spots (A1, A2, A3 and A4).

Average isotopic mass of peptides (Da)			
A1	A2	A3	A4
1206.532	905.820	905.810	893.360
1352.730	1107.947	951.825	951.812
1476.738	1490.364	1107.981	1107.940
1611.091	1666.573	1490.228	1494.255
1767.331	1742.283	1822.611	1822.570
1851.392	1822.643	2384.804	2384.741
1991.691	2384.789	2501.891	2502.013
2152.761	2502.138	2717.900	
2385.857	2706.487		
2719.185			

masses of 5.4 and 21.0 kDa (spot 1); 5.6 and 16 kDa (spot 2); 6.4 and 16 kDa (spot 3); 7.1 and 14 kDa (spot 4).

The four spots were then trypsinized and analyzed by mass spectrometry. The digestion of spots 1, 2, 3, and 4 yielded 10, 9, 8, and 7 peptides, respectively, and the average isotopic masses of the peptides are shown in Table 2. The peptides showed a low level of homology (<30%) with sequences in the protein databases.

CD spectrum of ApulSL (Fig. 4A) showed that this protein did not contain regions of β -sheets or α -helices in its structure, because its profile was similar to those of the spectrum of proteins with disordered structures. The intrinsic fluorescence spectrum of ApulSL showed one major peak at 332 nm (Fig. 4B), indicating the presence of tyrosine in the highly hydrophobic core.

3.2. Characterization of ApulSL HA

The ApulSL presented HA with all erythrocytes tested, showing the following ascending order of preference: human types A and B (specific HA of 4876), human type O (specific HA of 9752), and rabbit erythrocytes (specific HA of 19,504).

The HA of ApulSL was partially inhibited by *N*-acetylglucosamine and D(-)-arabinose (100 and 200 mM) and totally inhibited by azocasein (250 and 500 mg/mL). ApulSL proved to be a ion-dependent lectin since its HA dropped from 512 to 16 after dialysis against the chelating agent EDTA and was partially restored by 10 mM Mg^{2+} , fully restored by 10 mM Ca^{2+} ,

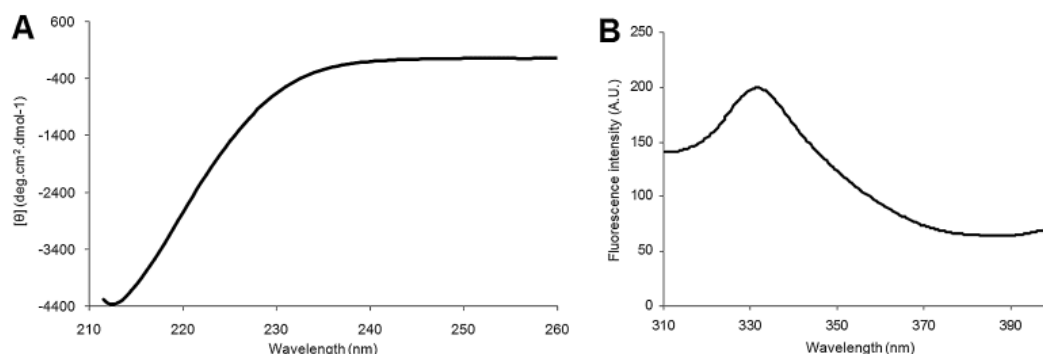


Fig. 4. Structural characterization of *Apuleia leiocarpa* seed lectin (ApulSL). (A) Circular dichroism spectrum of ApulSL showing a negative peak at 212 nm. The spectrum is similar to that of proteins with disordered structure. (B) Intrinsic fluorescence spectrum of ApulSL showing a main peak at 332 nm, indicating the presence of tyrosine in the hydrophobic core.

Table 3
Evaluation of the ion dependence of ApulSL hemagglutinating activity.

Assay condition	Hemagglutinating activity (units)	
	Non-treated ApulSL	EDTA-treated ApulSL ^a
Without ion addition	512	16
With 10 mM Mg ²⁺	8.192	64
With 10 mM Ca ²⁺	256	256
With 10 mM Mn ²⁺	32.768	1.024

ApulSL concentration in all assays: 88 µg/mL.

^a Lectin was treated with 5 mM EDTA. The number of units of hemagglutinating activity was defined as the reciprocal of the highest dilution of sample that promoted full agglutination of erythrocytes.

and stimulated by 10 mM Mn²⁺ (Table 3). When using ApulSL not treated with EDTA, manganese was the most stimulating ion and only the calcium ion did not stimulate HA (Table 3). The lectin was thermo-stable since its HA was preserved after heating at 100 °C for 2 h. ApulSL showed a reduction in HA by half after it had been autoclaved for 30 min. ApulSL denatured after heating with SDS-PAGE buffer did not show HA.

3.3. Antibacterial activity

ApulSL exerted bacteriostatic effects on the gram-positive bacteria *B. subtilis*, *B. cereus*, *E. faecalis*, *M. luteus*, *S. pyogenes*, and *S. aureus* (Table 4), with the smallest MIC (45.12 µg/ml) against *Bacillus* species. Bactericidal activity was not detected against gram-positive bacteria.

Table 4
Antibacterial activity of the ApulSL.

Species	ApulSL			Positive control	
	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)	MBC/MIC ratio	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)
<i>Bacillus cereus</i> (+)	45.12	>180.5	ND	15.62	31.25
<i>Bacillus subtilis</i> (+)	45.12	>180.5	ND	15.62	31.24
<i>Enterococcus faecalis</i> (+)	90.25	>180.5	ND	3.9	15.62
<i>Escherichia coli</i> (–)	180.5	>180.5	ND	15.62	31.25
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (–)	45.12	>180.5	ND	31.25	31.25
<i>Micrococcus luteus</i> (+)	90.25	>180.5	ND	15.62	31.25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (–)	180.5	>180.5	ND	7.81	15.62
<i>Salmonella enteritidis</i> (–)	180.5	>180.5	ND	15.62	31.25
<i>Staphylococcus aureus</i> (+)	180.5	>180.5	ND	7.81	31.25
<i>Streptococcus pyogenes</i> (+)	180.5	>180.5	ND	7.81	15.62
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> (–)	11.2	22.5	2	31.25	62.5
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>malvacearum</i> (–)	22.5	22.5	1	15.62	31.25
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i> (–)	22.5	22.5	1	15.62	62.5

ND: not determined; (+): gram-positive; (–): gram-negative. Amoxicillin was used as positive control.

The gram-negative bacteria inhibited by ApulSL were *X. campestris* pv. *campestris*, *X. campestris* pv. *viticola*, *X. campestris* pv. *malvacearum*, *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, and *S. enteritidis* (Table 4), with the lowest MIC (11.2 µg/ml) against *X. campestris* pv. *campestris*. ApulSL was bactericidal (MBC of 22.5 µg/ml) only against the three varieties of *X. campestris*. The MBC/MIC ratio ranged from 1 to 2, indicating the effectiveness of ApulSL as a bactericide.

4. Discussion

This study shows the presence of lectin in the seeds of *A. leiocarpa*, a legume with important applications in the timber industry. Its presence was first suggested by the fact that the HA of the crude extract was lost after heating, indicating that erythrocyte agglutination was promoted by a proteinaceous molecule. The inhibition of HA by *N*-acetylglucosamine revealed that agglutination was linked to a carbohydrate-binding protein. These results showed that ApulSL was extracted in saline solution (150 mM NaCl), which is similar to many other proteins that are solubilized in low ionic strength solutions, generally around 0.15–0.2 M [35].

The inhibition of HA from extract by *N*-acetylglucosamine (chitin monomer) was the reason for choosing this matrix for lectin isolation. Lectin purification was evidenced by the highest specific HA of ApulSL obtained after chitin chromatography compared with the extract. PAGE for native acidic proteins revealed the homogeneity of ApulSL.

The data from gel filtration chromatography and SDS-PAGE suggested that ApuLSL is a trimeric protein with a native molecular mass of 55.8 kDa and composed by three distinct subunits. Two-dimensional electrophoresis revealed two molecular forms of the 16-kDa subunit (with isoelectric points of 5.6 and 6.4), which suggests the presence of two ApuLSL isoforms that have minor differences in amino acid composition.

The mass spectrometry (MALDI TOF/TOF) gave us the average isotopic masses of several peptides obtained after digestion of ApuLSL spots. However, the lack of sufficient homology with protein sequences in databases did not allow the elucidation of the primary sequence of this protein by peptide mass fingerprint. Thus, the primary structure of ApuLSL remains to be determined by other techniques.

ApuLSL showed good resistance to heating similar to others lectins that were stable after being heated at 100 °C, including *Ganoderma capense* mushroom lectin [36] and coagulant lectin from *Moringa oleifera* seeds [37]. The disordered structure revealed by CD analysis (which does not mean that there is no conformational stability) can be linked to the stability of ApuLSL at different temperatures. According to Oxender and Fox [38], since less energy is required to maintain a disordered tertiary structure, the protein has high conformational entropy and, consequently, greater stability.

ApuLSL is an ion-dependent protein, because its HA was significantly reduced after treatment with EDTA and partially or fully restored by cations. Another lectin with similar ion-dependent behavior has been extracted from *Kalanchoe crenata* leaves [39]. Several lectins contain metal ions, mainly Mn^{2+} and/or Ca^{2+} , which are required for lectin activity. These metal ions can be located close to or inside the carbohydrate-binding site to maintain the integrity of the subunits and/or to help the positioning of amino acid residues for carbohydrate binding [40].

Despite presenting HA with all erythrocytes tested (A, B, O, and rabbit), ApuLSL showed a preference for human O-type. This result can be related with those obtained in HA inhibition assays, since N-acetylglucosamine is the main constituent of antigenic structures of O-type cells [41].

N-acetylglucosamine is part of peptidoglycan and murein, and is present in the cytoplasmic membrane of almost all eubacteria [42,43]. These glycan chains are made by alternating units of N-acetylglucosamine and N-acetylmuramic acid. The N-acetylglucosamine is present in both gram-positive and gram-negative bacteria but is more exposed in gram-positive bacteria [44]. This amino sugar plays important roles in bacteria by participating in cell signaling, colonization of human hosts (formation of fimbriae or pili that mediate adherence to host cells), and as a component of the Curli fibers that promote biofilm formation [44–47]. The binding of ApuLSL to N-acetylglucosamine residues may be linked to its antibacterial action.

Among the tested bacteria, *X. campestris* varieties were more susceptible to ApuLSL. A previous study showed that the lectin extracted from the nitrogen-fixing soil bacterium *Paenibacillus polymyxa* was bactericidal against *X. campestris* [48]. The authors suggest that the antibacterial effect is a result of the interaction between lectin and specific receptors at the cell membrane, inducing conformational alterations and concurrent malfunctions of the metabolism of bacterial cells.

In their studies of lectin-microorganism interactions, Gaidamashvili and van Standen [49] observed that plant lectins are able to promote agglutination when they bind to carbohydrates exposed on the cell surface of microorganism. Therefore, it is possible that ApuLSL exert inhibitory effects on bacterial growth by agglutination.

The increasing reports on the resistance of microorganisms to the antibiotics currently used threat the prevention and treatment of infections and thus stimulate the search for new antimicrobial

agents [50]. The control of *Xanthomonas* species is mainly performed using copper-containing compounds but resistant strains have been identified [51,52]. The isolation of ApuLSL reinforces the importance of biochemical prospecting of Caatinga as source of potential new antibiotic drugs. The advances in nanotechnology allow the development of strategies to increase the bioavailability of proteins, in spite of their high molecular mass, and to optimize the target delivery even with more efficacy than systemic application [53].

In conclusion, this work reports the purification and characterization of a novel antibacterial lectin, with the best bacteriostatic and bactericidal activities against three varieties of *X. campestris*, which stimulates further studies to better understand the mode of action of this lectin and to propose strategies for its possible application for the control of these phytopathogens.

Acknowledgments

The authors express their gratitude to the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq) for research grants fellowships (P.M.G. Paiva, M.G. Carneiro-da-Cunha, M.T.S. Correia), and scholarships. Also, they are grateful to the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES), the *Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco* (FACEPE) and the Brazilian Ministry of Science, Technology and Innovation (MCTI) for research grants.

References

- [1] P.R. Gil, Wilderness – Earth's Cast Wild Places, CEMEX, México, 2002.
- [2] U.P. Albuquerque, N. Hanazaki, Rev. Bras. Farmacogn. 16 (2006) 678–689.
- [3] U.P. Albuquerque, L.H.C. Andrade, Acta Bot. Bras. 16 (2002) 273–285.
- [4] I.E. Liener, Toxic Constituents of Plants Foodstuffs, Academic Press, New York, 1969.
- [5] G. Lewis, B. Schrire, B. Mackinder, M. Lock, Legumes of the World, Royal Botanic Gardens, Kew, 2008.
- [6] J.N.C. Marchiori, Dendrologia das angiospermas: Leguminosas, Editora da UFSM, Santa Maria, 1997.
- [7] P.E.R. Carvalho, Espécies arbóreas brasileiras, Colombo/EMBRAPA, Brasília, 2003.
- [8] R. Reitz, R.M. Klein, A. Reis, Projeto Madeira do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, SUDESUL, 1988.
- [9] P.E.R. Carvalho, Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira, Colombo/EMBRAPA, Brasília, 1994.
- [10] A. Karnchanat, Antimicrobial activity of lectins from plants, in: V. Bobbarala (Ed.), Antimicrobial Agents, InTech, Rijeka, 2012, pp. 145–178.
- [11] F.G. Sol, B.S. Cavada, J.J. Calvete, J. Struct. Biol. 158 (2007) 1–9.
- [12] S.R. Spillator, G.R. Cochran, R.E. Walker, K.L. Cablish, C.C. Bittner, Plant Physiol. 110 (1996) 825–834.
- [13] P.M.G. Paiva, E.V. Pontual, T.H. Napoleão, L.C.B.B. Coelho, Lectins and Trypsin Inhibitors from Plants: Biochemical Characteristics and Adverse Effects on Insect Larvae, Nova Science Publishers, Inc., New York, 2013.
- [14] P. Gemeiner, D. Mislovicová, J. Tkáč, J. Svítel, V. Pátropstý, E. Hrabárová, G. Kogan, T. Kozár, Biotechnol. Adv. 27 (2009) 1–15.
- [15] C.M.L. Melo, M.C. Castro, A.P. Oliveira, F.O. Gomes, V.R. Pereira, M.T.S. Correia, L.C.B.B. Coelho, P.M.G. Paiva, Phytother. Res. 24 (2010) 1631–1636.
- [16] L.C.C. Araújo, J.S. Aguiar, T.H. Napoleão, F.V.B. Mota, A.L.S. Barros, M.C. Moura, M.C. Coriolano, L.C.B.B. Coelho, T.G. Silva, P.M.G. Paiva, PLoS ONE 8 (2013) e81973.
- [17] E.S. Nunes, M.A.A. Souza, A.F.M. Vaz, T.G. Silva, J.S. Aguiar, A.M. Batista, M.M. Guerra, M.C. Guarnieri, L.C.B.B. Coelho, M.T.S. Correia, Toxicon 59 (2012) 667–671.
- [18] L.P. Albuquerque, G.M.S. Santana, T.H. Napoleão, L.C.B.B. Coelho, M.V. Silva, P.M.G. Paiva, Appl. Biochem. Biotechnol. 172 (2014) 1098–1105.
- [19] F.S. Gomes, T.F. Procópio, T.H. Napoleão, L.C.B.B. Coelho, P.M.G. Paiva, J. Appl. Microbiol. 114 (2013) 672–679.
- [20] Y. Sato, K. Morimoto, M. Hirayama, K. Hori, Biochem. Biophys. Res. Commun. 405 (2011) 291–296.
- [21] H.X. Wang, V.E. Ooi, T.B. Ng, K.W. Chiu, S.T. Chang, Pharmacol. Toxicol. 79 (1996) 318–323.
- [22] J. Rodrigues Neto, V.A. Malavolta Junior, Informe Agropecuário 17 (1995) 56–59.
- [23] Secretaria de Defesa Agropecuária Instrução normativa n. 233 de 7 de dez, Dá continuidade aos trabalhos de levantamento da praga *Xanthomonas campestris* pv. viticola na Região do Submédio São Francisco e institui normas para sua erradicação, Diário Oficial (da República Federativa do Brasil), Brasília, 1998.
- [24] V.A. Malavolta Junior, I.M.G. Almeida, M.H. Sugimori, I.J.A. Ribeiro, Arq. Inst. Biol. 70 (2003) 373–376.

- [25] L.M.A. Bacchi, P.E. Degrande, W.L. Gavassoni, *Fitopatol. Bras.* 27 (2002) 180–181.
- [26] J.H.V. Arcoverde, A.S. Carvalho, F.P.A. Neves, B.P. Dionízio, E.V. Pontual, P.M.G. Paiva, T.H. Napoleão, M.T.S. Correia, M.V. Silva, M.G. Carneiro-da-Cunha, *Nat. Prod. Res.* 28 (2014) 1297–1301.
- [27] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275.
- [28] P.M.G. Paiva, L.C.B.B. Coelho, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 36 (1992) 113–118.
- [29] D.H. Bing, J.G.M. Weyand, A.B. Stavitsky, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 124 (1967) 1166–1170.
- [30] B.J. Davis, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121 (1964) 404–427.
- [31] R.A. Reisfeld, U.J. Lewis, D.E. Williams, *Nature* 195 (1962) 281–283.
- [32] U.K. Laemmli, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [33] A. Shevchenko, H. Tomas, J. Havlis, J.V. Olsen, M. Mann, *Nat. Protoc.* 1 (2007) 2856–2860.
- [34] D. Amsterdam, Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media, in: V. Loman (Ed.), *Antibiotics in Laboratory Medicine*, Williams and Wilkins, Baltimore, 1996, pp. 52–111.
- [35] A. Pessoa Júnior, B.V. Kilikian, *Purificação de produtos biotecnológicos*, Barueri, Manole, 2005.
- [36] P.H.K. Ngai, T.B. Ng, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 314 (2004) 988–993.
- [37] A.F.S. Santos, L.A. Luz, A.C.C. Argolo, J.A. Teixeira, P.M.G. Paiva, L.C.B.B. Coelho, *Process Biochem.* 44 (2009) 504–508.
- [38] D.L. Oxender, C.F. Fox, *Protein Engineering*, Alan R. Liss, New York, 1987.
- [39] K. Adenike, O.B. Eretan, *J. Biochem. Mol. Biol.* 37 (2004) 229–233.
- [40] H. Lis, N. Sharon, *Lectins in higher plants*, in: A. Marcus (Ed.), *The Biochemistry of Plants*, Academic Press, New York, 1989, pp. 371–447.
- [41] S.T. Feizi, *Trends Biochem. Sci.* 15 (1990) 330–331.
- [42] K.H. Schleifer, O. Kandler, *Bacteriol. Rev.* 36 (1972) 407–477.
- [43] J. van Heijenoort, *CMLS* 54 (1998) 300–304.
- [44] B.K. Sohanpal, S. El-Labany, M. Lahooti, J.A. Plumbridge, I.C. Blomfield, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 (2004) 16322–16327.
- [45] H. Hirakawa, Y. Inazumi, Y. Senda, A. Kobayashi, T. Hirata, K. Nishino, A. Yamaguchi, *J. Bacteriol.* 188 (2006) 5851–5858.
- [46] U. Gophna, M. Barlev, R. Seijffers, T.A. Oelschlager, J. Hacker, E.Z. Ron, *Infect. Immun.* 69 (2001) 2659–2665.
- [47] M.M. Barnhart, J. Lynem, M.R. Chapman, *J. Bacteriol.* 188 (2006) 5212–5219.
- [48] L.V. Karpunina, Ulu Me'n'nikova, Iu.V. Suslova, E.S. Mukhacheva, V.V. Ignatov, *Mikrobiologiya* 72 (2003) 343–347.
- [49] M. Gaidamashvili, J. van Standen, *J. Ethnopharmacol.* 80 (2002) 131–135.
- [50] World Health Organization, *Antimicrobial resistance. Fact sheet N° 194*, 2014.
- [51] M. Mirik, Y. Aysan, O. Cinar, *J. Plant Pathol.* 89 (2007) 153–154.
- [52] K.C. Shenge, R.B. Mabagala, C.M. Mortensen, K. Wydra, *Afr. J. Microbiol. Res.* 8 (2014) 2881–2885.
- [53] R. Solaro, F. Chiellini, A. Battisti, *Materials* 3 (2010) 1928–1980.

4.3 ARTIGO 3 - “Polyphenols of *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J.F. Macbride leaves: phytochemical analysis, antioxidant and antibacterial activities”

**Polyphenols of *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J.F. Macbride leaves:
phytochemical analysis, antioxidant and antibacterial activities**

Artigo a ser submetido na revista Journal of Ethnopharmacology



ISBN 0378-8741

Qualis 2014: CBII: B1

FI 2015: 3.055

Polyphenols of *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J.F. Macbride leaves: phytochemical analysis, antioxidant and antibacterial activities

Aline de Souza Carvalho¹, Amanda Dias de Araújo Uchôa¹, Carolina Barbosa Malafaia², Clóvis Macêdo Bezerra Filho¹, Isabelle Cristinne Ferraz Bezerra³, Luiz Alberto Lira Soares³, Marcia Vanusa da Silva¹, Magda Rhayanny Assunção Ferreira³, Patrícia Maria Guedes Paiva¹, Pollyanna Michelle da Silva¹, Thiago Henrique Napoleão¹, Maria Tereza dos Santos Correia^{1*}

¹ Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Avenida Professor Moraes Rego, s/n, 50670-420, Recife, PE, Brazil

² Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), Recife, PE, Brazil

³ Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Ciências Farmacêuticas, UFPE, Recife, PE, Brazil.

*Author for correspondence: Tel.: +55 8121268540; fax: +55 8121268576;

E-mail address: mtscorreia@gmail.com

Abstract

Apuleia leiocarpa (Voguel) JF Macbride is a legume tree (Fabaceae) with great value in the timber industry for its high tannins contents. Phytochemical analysis of its leaves aqueous extract (AE) revealed presence of condensed tannins, flavonoids and saponins, and HPLC-DAD analysis showed peaks with UV spectra characteristic of condensed tannins, flavonoids and the presence of vitexin. These polyphenols showed a marked antioxidant capacity (ABTS, DPPH and AAT) and showed antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* and *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Standard and clinical isolates of *S. aureus* were strongly inhibited by AE and after incubate with AE, there was a decreased staphyloxatin synthesis, which can be associated with the bacterial membrane destabilization, causing the protein leakage and a decreasing growth kinetics in the first hours by unclear mechanisms. The antioxidant capacity and antibacterial activity of the extract can be attributed to the polyphenols. Then, the data obtained using leaves *A. leiocarpa* AE indicates that there is potential employing of this extract as an antibacterial activity agent.

Keywords: Condensed tannins. Flavonoids. *Staphylococcus aureus*. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Staphyloxanthin.

1. Introduction

Throughout its history, man behaves as a handler agent in the environment in which he finds himself, taking advantage of it for their own benefit (ALBUQUERQUE, 2005). Even all constant scientific improvements, traditional folk medicine is still practiced in small communities where agriculture is the main economy and medicinal plants are the only available alternative to combat their illnesses (MENALE et al., 2016; SILVA et al., 2015). Reasons for maintaining these traditions include low cost versus therapeutic benefit, beyond lack of available drug for some diseases (MENALE et al., 2016).

Apuleia leiocarpa (Vogel) JF Macbride is a tree (Fabaceae) (LEWIS et al., 2005) commonly known as grápia, jataí among other names. It has a very wide distribution, occurring from northeast Brazil to Uruguay and Argentina with preference for dwelling well-drained soil (MARCHIORI, 1997) and its wood has multiple uses in the timber industry (LORENZI, 2002), construction (REITZ et al., 1988; MARCHIORI, 1997; LORENZI, 2002), in agroforestry systems (SOUZA et al., 1994), ornamentals, reforestation (MARCHIORI, 1997) and production of tanning substances in the tanning industry (CARVALHO, 2003). In the folk medicine of some communities, the decoction of the leaves and fruits of *A. leiocarpa* are used in the treatment of external ulcers (SILVA et al., 2015), bark extract as anti-syphilitic (MENTZ et al., 1997) and roots aqueous extract as antiophidic (PEREIRA et al., 1994).

Some phenolic compounds such as flavonoids and tannins may be potential natural antioxidants (DRAGLAND et al., 2003; CAI et al., 2004), cutaneous sunscreens (VIOLANTE et al., 2009), antibacterial (SCHITO et al., 2010) among other activities. Polyphenols may combine or inactivate bacterial adhesins by compromising adhesion on the cell surface, may inactivate hydrolytic enzymes and carrier proteins. Tannins can affect cell wall synthesis by irreversibly complexing with specific proteins (CHUSRI; VORAVUTHIKUNCHAI, 2009; COWAN, 1999), while some flavonoids may act as inhibitors of bacterial type II topoisomerase (CUSHNIE; LAMB, 2011).

Microbial resistance increased significantly with the availability of various antibiotics and their extensive use, further the rapid genetic transfer of resistance between bacteria. In consequence, there is a need to find new antimicrobial substances capable of overcoming this

obstacle in the treatment of resistant infections (SILVEIRA et al., 2006). Under stress circumstances, bacteria produce virulence factors to protection from host defenses and antibiotic. Staphyloxanthin (STX), a carotenoid pigment, produced by *Staphylococcus aureus* and founded in bacterial membrane, promote neutralization of reactive oxygen species (LEE et al., 2013) and its level influences bacterial membrane fluidity (MISHRA et al., 2011). Adhesins can be produced to provide structural stability to biofilms and enhance adhesion to surfaces (VUONG et al., 2004), exopolymeric matrix to work as a shield against host immunological factors and abiotic stresses (ASLAM et al., 2008; BYLUND et al. 2006; HALL-STOODLEY; STOODLEY, 2009).

Staphylococcus aureus is one of the most common agents of bacterial infections in humans and animals, causing a extensive list of clinically significant hospital and community acquired infections, including skin and systemic infection (DAUM, 2008; PACHECO et al., 2011; KARAMATSU et al., 2012).

Xanthomonas campestris pv. *campestris* causes black rot in brassicas in all development stages of plant and produces extracellular enzymes that promote plant cell wall degradation, contributing to its pathogenicity (RODRIGUES-NETO; MALAVOLTA-JUNIOR, 1995) and the control measures against these bacteria are hampered because contaminated seed lots may allow disease spreading through long distances (BACCHI et al., 2002).

The aim of this work was to elucidate the phytochemical composition of aqueous extract (AE) of *A. leiocarpa* leaves and to evaluate its antioxidant and antimicrobial activities, anti virulence factor property, furthermore to measure the ability of AE in promote the leakage of intracellular proteins by bacteria cells.

2. Materials and Methods

Plant material

Apuleia leiocarpa (Vogel) J.F. Macbride leaves were collected at the Instituto Agrônômico de Pernambuco - IPA (Goiana, Estado de Pernambuco, Brazil) in the month

July 2015 that corresponding to the rainy season at Brazilian Northeast. The Goiana pluviometric index was 276.5 mm in that month (IPA, 2017). The taxonomic identification was performed in the Herbarium Dárdano de Andrade Lima at the Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) and the testimonial material was archived under the number 91788.

Preparation of extract

The leaves of *A. leiocarpa* were dried at 45 °C and powdered in a grinder. To prepare the aqueous extract, leaves flour was homogenized with distilled water in a proportion of 10% (w/v) under agitation for 24 h at 22 °C. The homogenate was filtered through filter paper under vacuum, centrifuged at 9000 x g for 10 min, both at 4 °C. The supernatant corresponded to the crude extract and it was then lyophilized. After, the aqueous extract (AE) was stored under refrigeration (-20 °C) for use in the bioassays.

Thin layer chromatography (TLC) phytochemical analysis

Solution of AE from *Apuleia leiocarpa* leaves at a concentration of 1 mg/mL in methanol were prepared. Aliquots of 30 µL of methanolic solution of AE-*A. leiocarpa* and 10 µL of the standards (caffeic acid, catechin, gallic acid, rutin, saponin; Sigma-Aldrich®) solutions (1 mg/mL) were applied in bands of 10 mm of width and 5 mm space between them.

Silica gel plates 60-F₂₅₄ (Macherey-Nagel®) was used for analysis and the application was performed with semi-automatic equipment (Linomat V, Camag®) controlled by WinCats® software (Camag®). The chromatograms were developed in a twin trough vertical glass chamber (10 cm x 10 cm, Camag®) after saturation (15 min) with the mobile phase (ethyl acetate: formic acid: water - 90:5:5, v/v/v for cinnamic derivative; flavonoids; tannins; or, ethyl acetate: formic acid: acetic acid: water - 100:11:11:27, v/v/v for saponins). The plates were derivatized and observed at wavelengths of 254 and 366 nm. The chromatograms were digitalized after development with NEU + PEG for cinnamic derivative and flavonoids; ferric chloride 5% for hydrolysable tannins; hydrochloric vanillin for condensed tannins; and,

Lieberman-Burchard for saponins; using MultiDoc – It Imaging System (Model 125, UVP®) software and Canon® camera (Rebel T3, EOS1100D).

Determination of total phenolic compounds content

Total phenolic compounds content was determined by the Folin–Ciocalteu method (LI et al., 2008). The samples were carried out in triplicate and the absorbance was measured at 765 nm. Gallic acid (0–250 mg/L) was used for calibration of standard curve. The results were expressed as milligram gallic acid equivalent (mg GAE)/g dry weight of plant material.

Determination of total flavonoid content

Total flavonoid content was determined using the AlCl_3 method (WOISKY; SALATINO, 1998). The absorbance was measured at 420 nm. Calibration curve was made using quercetin (5 – 35 $\mu\text{g/mL}$) as reference. Analysis was performed in triplicate. The flavonoid content was expressed as milligram of quercetin equivalent (mg QE)/g dry weight of plant material.

Determination of condensed tannins content

The condensed tannin content in extract was determined using a method proposed by Swain and Hillis (1959). The samples was carried out in triplicate and the absorbance was measured at 500 nm. Results were expressed as gram of catechin equivalent (CE)/100 g of dry weight of plant material.

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) coupled with a Diode Detector (DAD)

The analysis was conducted using a HPLC-DAD (Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific®), a binary pump (HPG3x00RS, Thermo Fisher Scientific®) and an autosampler equipped with a loop of 20 μL (ACC-3000, Thermo Fisher Scientific®). The chromatographic separation was performed using a C_{18} column (250 mm $\times$ 4.6 mm i.d., particle size 5 μm ,

Dionex[®]), pre-column (C₁₈, 4 mm × 3.9 µm, Phenomenex[®]) and the analyses were performed at 21 ± 2 °C. The detection was performed at 210, 270 and 350 nm with acquiring UV spectra in the range of 190–400 nm. For the analysis and processing of data, it was used Chromeleon 6.8 software (Dionex, Thermo Fisher Scientific[®]). The mobile phase was constituted of ultrapure water (A) and methanol (B), acidified with 0.05% trifluoroacetic acid (TFA) at a flow rate of 0.8 mL/min, according to the following gradient program 0–13.5 min, 15–40% B; 13.5–22 min, 40–50% B; 22–35 min, 50–70% B; 35–37 min, 70% B; 37–38 min, 70–15% B.

The AE of *Apuleia leiocarpa* was dissolved in water (1 mg/mL) and filtered through a 0.45 µm membrane to sample injection. The standard vitexin (98%, Sigma-Aldrich[®]) at 0.1 mg/mL was used. The peaks were identified by comparing the retention time and UV spectra.

ABTS radical decolorization assay

The 2,2-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline) - 6-sulfonic acid (ABTS) assay method was performed as described by Silva et al. (2012). The samples were diluted with water and carried out in triplicate and the absorbance was recorded at 734 nm. Trolox solution (final concentration 0–2000 µM/L) was used as a reference standard. The results were expressed at Trolox Equivalent Antioxidant Activity (TEAC) in µM TEAC/g dry weight of plant material.

DPPH radical scavenging activity

The 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay was adapted from Blois (1958). The reaction mixture consisted of 250 µM DPPH solution (250 µL) incubated with the test solution (40 µL) (15–500 µg/ml) for 25 min at room temperature in the dark. The samples were carried out in triplicate and the change in absorbance of the samples was measured at 517 nm. The control consisted of DPPH solution (250 µL) and methanol (40 µL).

Radical scavenging activity was expressed as the inhibition percentage calculated using the following formula, percentage of Radical Scavenging Activity RSA = (A-B/A)*100 where, A = absorbance of the blank solution and B = absorbance of the test solution.

Phosphomolybdenum complex assay

For determination of Total Antioxidant Activity (TAC), the reduction of molybdenum (VI) to molybdenum (V) by the phytochemicals of the AE was followed (PRIETO et al., 1999). The samples were carried out in triplicate and the change in absorbance of the samples was measured at 695 nm against blank. Acid ascorbic solution (0.5 mg/ml) was used as a reference standard.

TAC was expressed as the inhibition percentage calculated using the following formula, percentage of Total Antioxidant Activity (TAA) = $(A-B/C-B)*100$ where, A = absorbance of the test solution, B = absorbance of the control solution and C = absorbance of the acid ascorbic solution.

Bacterial strains

Strains of the Gram-positive bacteria *Enterococcus faecalis* (UFPEDA 138), *Bacillus subtilis* (UFPEDA 86), *Staphylococcus aureus* (UFPEDA 02; clinical isolates: 659/670/671/683/705/726), *Staphylococcus epidermidis* (UFPEDA 183), *Staphylococcus saprophyticus* (UFPEDA 823), as well as the Gram-negative bacteria *Escherichia coli* (UFPEDA 224), *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 416), *Klebsiella pneumoniae* (UFPEDA 396) and *Salmonella enteritidis* (UFPEDA 415) were provided by the Department of Antibiotics, Universidade Federal de Pernambuco, Brazil. Strains of the gram-negative phytopaginic species *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc 153/326/15/347/119/253/259/343; differing by the source), *Xanthomonas citri* pv. *malvacearum* (Xcm 11.2.1) and *Pectobacterium carotovorum* (Pcc 31) were provided by the Culture Collection of the Phytobacteriology Laboratory of the Agronomic Department of the Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Brazil.

Disc Diffusion Test - Resistance Profile

To evaluate the resistance profile of the strains of *S. aureus*, disc diffusion test was performed according to CLSI (2011) using the standard antibiotics: ampicillin (AMP), oxacilin (OXA), cephalotin (CFL), cephoxitin (CFO), cephazoline (CFZ), cefepime (CPM), cefuroxime (CRX), cefotaxime (CTX), imipenem (IPM), meropenem (MER), nalidixic acid (NAL), ciprofloxacin (CIP), nitrofurantoin (NIT), vancomycin (VAN), gentamicin (GEN), clindamycin (CLI), chloramphenicol (CLO), tetracycline (TET), trimetropim (TRI).

Minimum Inhibitory and Minimum Bactericidal Concentrations

For pathogenic bacteria, minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by the microdilution method (AMSTERDAN, 1996). A twofold serial dilution of the AE (25 mg/mL initial concentration) was prepared in Mueller Hinton Broth (MHB). Then, 10 μ L of bacteria suspension ($OD_{600} 0.15 \pm 0.05$) was added. The samples were incubated for 24 h at 37°C and the growth rate was obtained through the OD_{600} measurement. Afterwards, cultures were seeded (10 μ L) in MHA medium and incubated for 24 h at 37°C to determine the minimum bactericidal concentration (MBC). For phytopathogenic bacteria, a twofold serial dilution of the AE (25 mg/mL) was prepared in NYD (dextrose 10, meat extract 3, peptone 5, yeast extract 5 in gL^{-1}) medium. Bacteria suspension (10 μ L) were adjusted for $OD_{600} 0.15 \pm 0.05$ and the time incubation was 48h at 29°C. Afterwards, cultures were seeded (10 μ L) in NYDA (dextrose 10, meat extract 3, peptone 5, yeast extract 5, agar 21 in gL^{-1}) medium and incubated for 48h at 29°C, to determine the minimum bactericidal concentration (MBC).

The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined as the lowest concentration of AE in which there was a $\geq 50\%$ reduction in optical density relative to OD_{600} in negative control and minimum bactericidal concentration (MBC) corresponds to the minimum concentration of extract that has antimicrobial activity. These assays were performed in quadruplicate

Antimicrobial activity of a plant extract was considered highly active if its MIC < 0.1 mg/ml, active with MIC ranging from 0.1 to 0.5 mg/ml, moderately active with MICs ranging from 0.5 to 1.0, with low activity if MIC from 1.0 to 2.0 mg/ml and MIC > 2.0 mg/ml are classified as inactive (SARAIVA, 2011). Antimicrobial substances were considered as

bacteriostatic agents when the ratio $MBC/MIC > 4$ and bactericidal agents when the ratio $MBC/MIC \leq 4$ (GATSING et al., 2006).

Death Curve

Bacterial culture (100 μ L; $OD_{600} 0,15 \pm 0,05$ in saline) was incubated in MHB (900 μ L) broth containing different concentrations of AE (MIC/2, MIC and 2MIC). Bacterial growth was evaluated considering the following intervals: 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 24 h and for counting viable cells in plate agar after incubation at 37 °C for 24 h. The experiment was performed in triplicate and the viable cells were expressed as CFU/mL (colony-forming units per milliliter).

Biofilm formation assay

Biofilm formation was evaluated using the crystal violet assay in 96-well microtiter plates (Costar 3599, Corning, Inc., USA). The incubation period at 37° C by 24 h for pathogenic bacteria of human was performed according method described by TRENTIN et al. (2011). The biofilm formation by phytopathogenic bacteria was evaluated by similar method, but with modifications according MALAFAIA et al. (unpublished data). The incubation period at 29° C by 48 h. For both evaluations, to represent 100% of biofilm formation (untreated sample), the extracts were replaced with sterile water. Stimulation of biofilm formation was assumed for the values higher than 100% in comparison with the untreated sample. Since does not exist a commercially available non-biocidal compound possessing antibiofilm activity, we can not apply a positive control to antibiofilm activity.

Protein leakage assay

Protein leakage by *S. aureus* microbial cells was monitored by comparing the protein content at t0h and t24h after exposition at AE. For this, the *S. aureus* inoculum (100 μ L; $OD_{600} 0.15 \pm 0,05$ in saline) was incubated in MH broth (900 μ L) containing different

concentrations (MIC/2; MIC; 2xMIC) of AE at 37°C for 24 h in a shaking incubator at 200 rpm. For negative controls, the AE was replaced by distilled water. After this period, the samples were centrifuged (300×g; 10 min, 25 °C) and the supernatants were evaluated by Lowry et al. (1951) method. The samples were performed in quadruplicate.

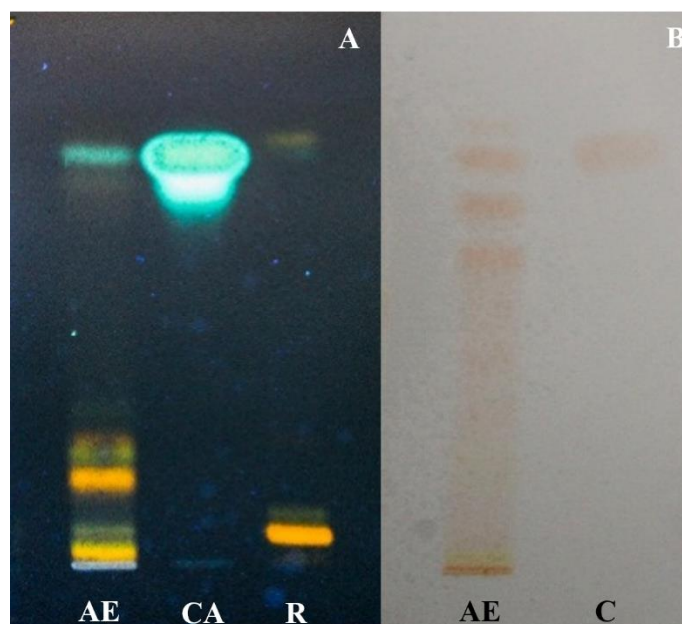
Staphyloxanthin assay

The production of *S. aureus* staphyloxanthin (STX) was evaluated as described by Lee et al. (2013) with slightly modifications. *S. aureus* cells were reinoculated at 1:100 dilution in MH medium (20 mL) and aliquots (100 µL) of this suspension were incubated with different concentrations (MIC/2; MIC; 2xMIC) of AE at 37 °C for 24 h in eppendorfs at 200 rpm, in quadruplicate. AE was not added in the control. Cells were collected by centrifugation at 11.000 × g for 10 min and washed once with saline. STX was extracted with MeOH (600 µL) and the OD was determined at 465 nm. The OD data obtained were statistically analyzed using GraphPad PRISM.

3. Results and Discussion

Using TLC analysis, the presence of flavonoids, cinnamic derivatives, condensed tannins and saponins was observed in the aqueous extract from *Apuleia leiocarpa* leaves. Spots with similar color to standards rutin, caffeic acid and catechin, suggests the presence of the classes of these compounds in *Apuleia leiocarpa* leaves (Figure 1).

Figure 1. Images captured from TLC analysis from aqueous extract of *A. leiocarpa* leaves. A) Flavonoids at UV 365 nm; B) Condensed tannin at white light. AE: aqueous extract, CA: caffeic acid, R: rutin, C: catechin. Source: Pharmacognosy Laboratory, 2020



The total phenolic compounds content in *A. leiocarpa* leaves was 152.43 mg GAE/g of extract, the total flavonoid content was 16.827 mgQE/g and the condensed tannin content was 57.11 g CE/100g of AE. As reported in the literature, *A. leiocarpa* is employed in the tannery industry (CARVALHO, 2003). This characteristic is due to its high content of polyphenols, mainly condensed tannins.

In this study, we developed a method by HPLC-DAD to obtain a chromatographic system capable of eluting and providing good resolution in the separation of compounds in the extract of *Apuleia leiocarpa* leaves.

When analyzing the chromatographic profile of the sample at 270 nm (Figure 2), we can observe the presence of several compounds (Table 1). It was not possible to identify most of these substances by comparing the retention time and maximum absorption spectra of analytical standards, so they should be investigated. Despite this, and according to the scanning spectra, it is possible to infer that the compounds with retention time between 9.35 and 17.49 min have an aromatic ring in their structure (maximum absorption around 270-285 nm) and simple aliphatic chains (maximum absorption around 200 nm). The other

compounds, with retention time between 18.54 and 22.50 have maximums of absorption with characteristics of flavanoidic compounds.

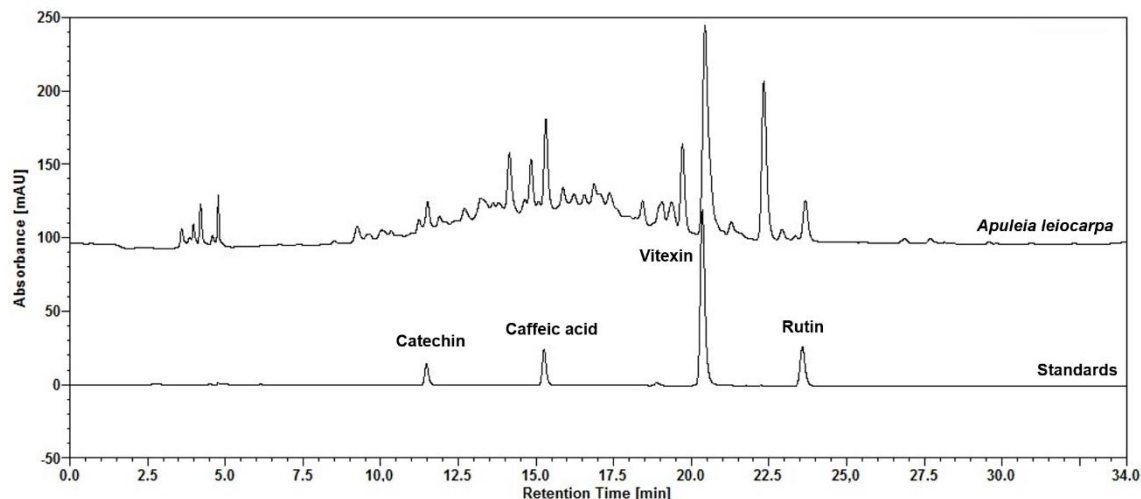
Catechin (Rt = 11.51 min), caffeic acid (Rt = 14.84 min), vitexin (Rt = 20.43 min) and rutin (Rt = 23.67 min) were detected in the sample and the content was calculated according to the equation of the standards, being equal to 0.10%*m/m* (2.56%), 0.20%*m/m* (3.35%), 0.90%*m/m* (1.35%) and 0.15%*m/m* (2.56%), respectively for catechin, caffeic acid, vitexin and rutin.

Table 1. Retention times and maximum absorption wavelength at 270 nm of the compounds observed at the aqueous extract of *A. leiocarpa* leaves by HPLC-DAD.

Rt (min)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	Rt (min)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)
9.35	206.8/274.2	15.43	209.6/274.4
9.70	201.8/274.0	15.98	200.6/276.7
10.46	201.5/270.9	16.33	200.1/276.4
11.36	203.9/270.6	17.49	202.9/273.9
11.62	207.2/280.1	18.54	215.3/334.2
12.01	200.1/279.6	19.19	215.3/329.8
12.82	203.7/275.6	19.50	209.3/350.4
13.34	200.8/276.4	19.86	210.1/347.3
13.92	199.7/277.6	20.68	213.7/338.0
14.74	209.5/276.0	21.44	213.1/336.3
14.96	203.7/279.3	22.50	212.4/337.3

Rt: Retention time.

Figure 2. Chromatograms from aqueous extract of *Apuleia leiocarpa* leaves and standards at 270 nm.
Source: Pharmacognosy Laboratory, 2020.



The presence of vitexin in the AE of *A. leiocarpa* leaves corroborates the antioxidant capacity found (data showed below), since that vitexin is bioactive flavonoid which exerts a variety of biological and pharmacological activities, including anticancer, antioxidant, anti-inflammatory and antitylperoxidase functions (DONG et al., 2011) and also inhibits the production of pro-hyperalgesic cytokines and increases the production of anti-hyperalgesics (DONG et al., 2013).

By phosphomolybdenum method, the Total Antioxidant Activity (TAA) of AE was 59,3% and, according ABTS assay, the capacity of reducing the generated cationic radical (ABTS $\cdot^+$) as of 77.2%, where its corresponds to 1570 μ M TEAC/g dry weight of plant material. DPPH method is based on the transfer of electrons from an antioxidant to the radical with a consequent color change monitored by absorbance variation. Radical scavenging activity of AE was directly proportional with the concentrations and expressed as the inhibition percentage: 500 μ g/mL (88.32%); 250 μ g/mL (88.25%); 125 μ g/mL (85.41%); 62.5 μ g/mL (84.79%); 31.25 μ g/mL (59.88%) and 15.62 μ g/mL (32.75%).

AE showed be active against *E.faecalis* (0,049 mg/mL), all *S. aureus* strains (0.391 – 0.78 mg/mL) and some *Xanthomonas campestris* strains (0.48 – 6.25 mg/mL) and inactive against the other tested species (Table 2). Some clinical isolates of *S. aureus* (0.78 – 3.12

mg/mL) and *Xanthomonas campestris* (6.25 – 12.5 mg/mL) were killed by AE. The antibiotic resistance profiles of clinical isolates of *S. aureus* were defined by disk diffusion test with the purpose of selecting strains with different resistance profiles (Table 2) to evaluate the antimicrobial activity of AE against some of these strains. Antimicrobial activity of AE was evaluated against standard strain and clinical isolates of *S. aureus*, though with different resistance profiles, and their MICs were similar (0,39 mg/mL), except UFPEDA 705, had an MIC (0,78 mg/mL).

Susceptible strains have lower MICs than resistant strains and isolated strains of a particular species have different MICs (LEVISON, 2004). Antibacterial activity of AE can be described as bactericidal against all isolates clinical of *S. aureus*, including the strains like a UFPEDA 683 with a resistance profile to 16 antibiotics. Against some *X. campestris* pv. *campestris* strains (Xcc 15, Xcc 253, Xcc 326), despite of these MIC's are > 2.0 mg/mL, AE was bactericidal (MCB/MIC < 4). This antibacterial activity of AE of *A. leiocarpa* leaves adds to Carvalho et al. (2015), where was observed bactericidal activity of ApulSL - lectin of seeds of *A. leiocarpa* - against the same species

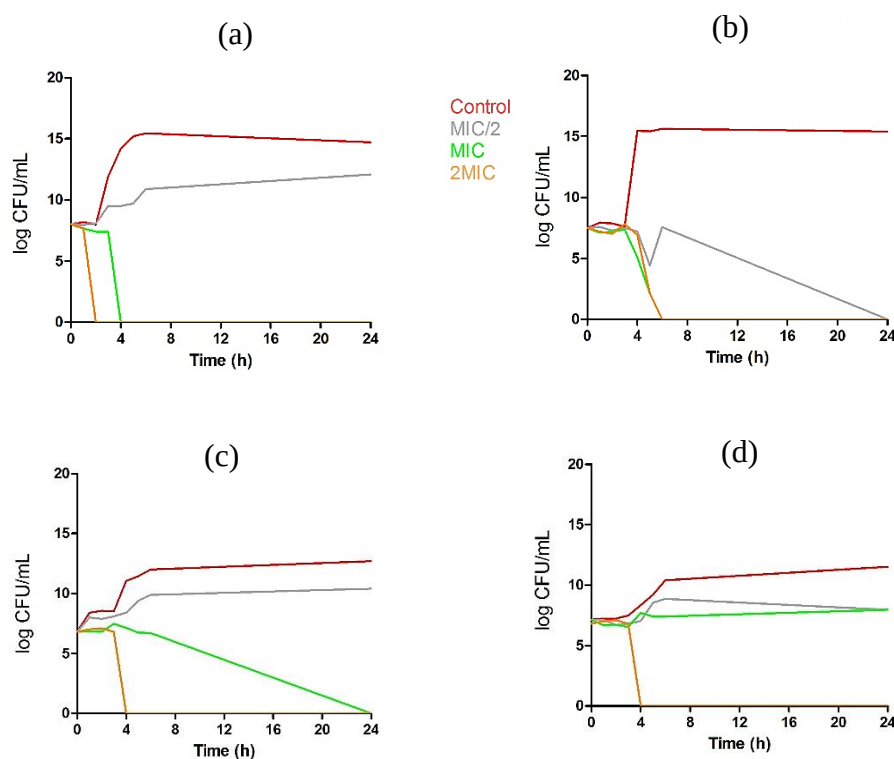
Table 2. MCI and MCB of aqueous extract of *Apuleia leiocarpa* leaves against Gram-positive and Gram-negative bacteria. Resistance profile of clinical isolates and ATCC strain of *S. aureus* by disc diffusion test.

Bacteria Species	Resistance profile	ID	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)	MCB/ MCI
Gram-positive					
<i>Enterococcus faecalis</i>		UFPEDA 138	0.04	> 25	ND
<i>S. saprop.saprophyticus</i>		UFPEDA 823	6.25	> 25	ND
<i>Bacillus subtilis</i>		UFPEDA 86	6.25	> 25	ND
<i>Staphylococcus epidermidis</i>		UFPEDA 183	> 25	> 25	ND
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	UFPEDA 02	0.39	> 25	ND
Catheter tip	OXA/NAL	UFPEDA 659	0.39	0.78	2
Catheter tip	AMP/OXA/NAL/CIP/CLI/TRI	UFPEDA 670	0.39	1.56	4
Bone fragment	AMP/OXA/NAL/CIP/AMI/ GEN/CLI/CLO/TET/TRI	UFPEDA 671	0.39	0.78	2
Purulent exudate	AMP/OXA/NAL/CFL/CFO/ CFZ/CPM/CRX/CTX/CIPVAN/ AMI/GEN/CLI/CLO/TRI	UFPEDA 683	0.39	1.56	4
Surgical wound	AMP/OXA/NAL/CFL/CFO/CPM /CRX/NIT/GEN	UFPEDA 705	0.78	3.12	4
Nasal secretion	OXA/CIP/GEN/CLO/TRI	UFPEDA 726	0.39	1.56	4
Gram-negative					
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		UFPEDA 416	> 25	> 25	ND
<i>Salmonella enteritidis</i>		UFPEDA 415	> 25	> 25	ND
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		UFPEDA 396	> 25	> 25	ND
<i>Escherichia coli</i>		UFPEDA 224	> 25	> 25	ND
<i>Xanthomonas citri malvacearum</i>		Xcm 11.2.1	> 25	> 25	ND
<i>Pectobacterium carotovorum carotovorum</i>		Pcc 31	12.5	> 25	ND
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>		Xcc 347	0.049	12.5	256
		Xcc 153	0.098	12.5	128
		Xcc 259	0.098	6.25	64
		Xcc 119	0.195	12.5	64
		Xcc 326	3.125	12.5	4
		Xcc 343	0.195	12.5	64
		Xcc 253	3.125	12.5	4
		Xcc 15	6.25	6.25	1

For the following tests - growth kinetics, protein extravasation and staphyloxanthin synthesis -, strains were chosen for the susceptibility at AE at antimicrobial test and comprehended different resistance profiles: *S. aureus* UFPEDA 02 (no antibiotic), *S. aureus* UFPEDA 659 (2 antibiotics), *S. aureus* UFPEDA 683 (16 antibiotics), *S. aureus* UFPEDA 705 (9 antibiotics).

The growth kinetics of the strains chosen in the AE of *Apuleia leiocarpa* leaves was performed and in this test, the bacteria were exposed to different concentrations of AE (MIC/2; MIC; 2xMIC), according the results obtained at the MIC test (Figure 3). Of the four tested *S. aureus* strains, three were significantly inhibited at MIC and 2xMIC concentrations, including *S. aureus* UFPEDA 683, resistant to 16 antibiotics. Only *S. aureus* UFPEDA 705 did not have a significative inhibition at MIC/2 and MIC concentrations but only at 2xMIC. Despite the resistance profile of clinical isolate, UFPEDA 683 was significantly inhibited at 2xMIC and at MIC.

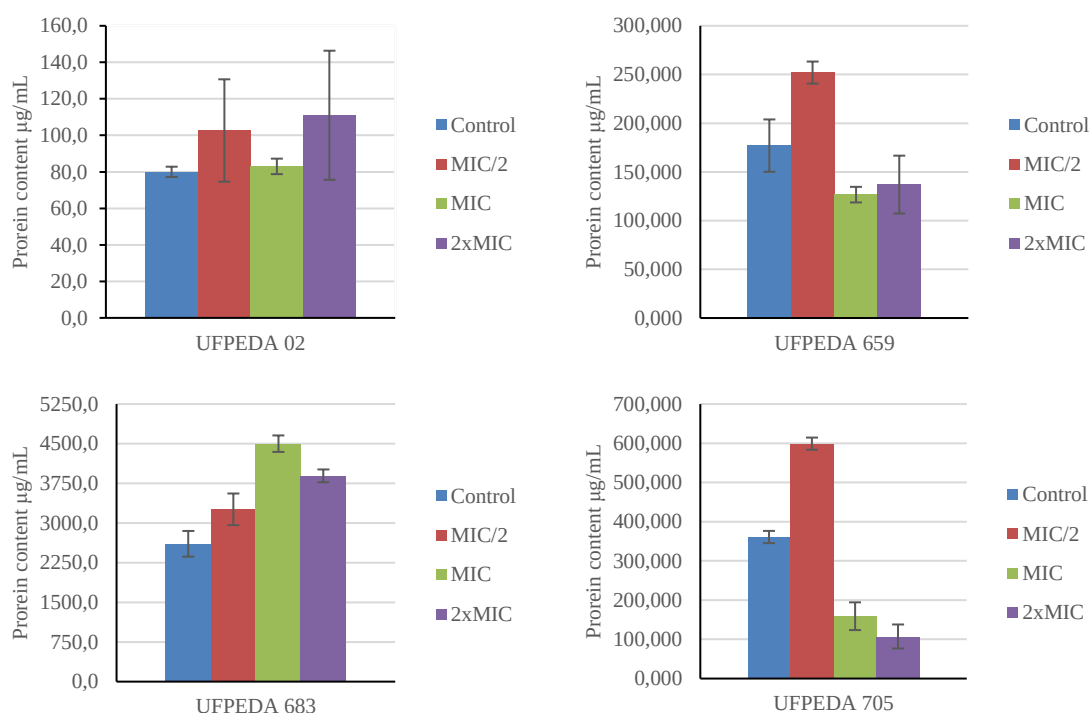
Figure 3. Death kinetics of the *Staphylococcus aureus* strains UFPEDA 02 (a), UFPEDA 659 (b), UFPEDA 683 (c) and UFPEDA 705 (d) in the presence of the different concentrations of the aqueous extract of *Apuleia leiocarpa* leaves.



All the tested bacteria species are biofilm forming, but AE did not demonstrated activity anti-adhesion against them. In general, the species tested did not show changes in the biofilm formation taxa or had their biofilm formation estimated when exposed to AE.

After incubation period with the AE, protein leakage was mensured in the culture medium and the results can be seen in Figure 4. Each *S. aureus* strain had a different leakage but dose-dependent response was observed only with UFPEDA 705, the second most virulent *S. aureus* between tested strains. MIC/2 caused an increase in protein dosage in all species tested. It is important to note that there was more protein leakage for those clinical isolates of *S. aureus* (UFPEDA 659, UFPEDA 683 and UFPEDA 705) in which AE showed bactericidal effect.

Figure 4. Effect of aqueous extract of *Apuleia leiocarpa* leaves on leakage of protein in culture medium from *Staphylococcus aureus* strains after 24h incubated with at MIC/2, MIC and 2xMIC. There was no protein leakage in controls and assays were performed in four replicates.

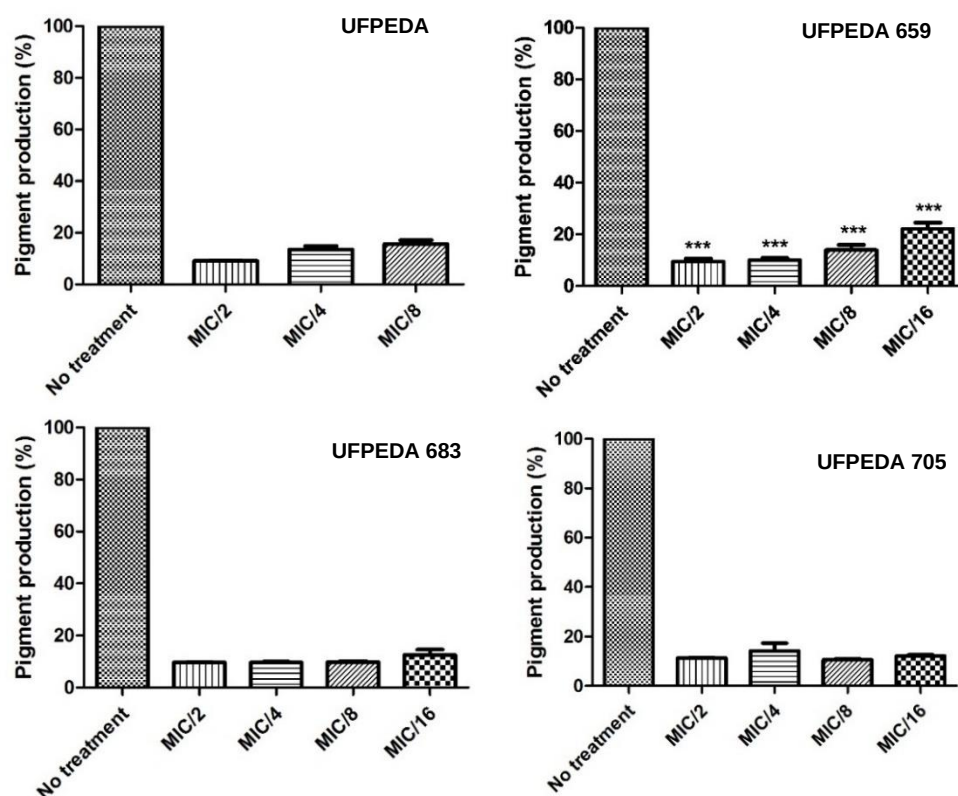


Under stress circumstances *S. aureus* produces extracellular matrix binding proteins with propose to colonization at various sites in the host (PALMA; HAGGAR; FLOCK, 1999), adhesins to stability structuraly the biofilms and enhance adhesion to surfaces (VUONG et al., 2004), exopolymeric matrix against host immunological factors (ASLAM et al., 2008; BYLUND et al. 2006; HALL-STOODLEY; STOODLEY, 2009). All theses artifacts occurs during biofilm formation and can contribute to a protein leakage was in the culture medium (GEOGHEGAN et al., 2013).

Several natural substances showed be active against microorganisms by different mechanisms. Polyphenols may inhibit microorganisms by iron deprivation or hydrogen bounding with vital proteins such as microbial enzymes (SCALBERT, 1991), associate with bacterial adhesins in order to compromise the adhesion of the microorganism on the cell surface and inactivate hydrolytic enzymes, adhesins and carrier proteins. Tannins can affect cell wall synthesis by forming irreversible complexes with proteins (CHUSRI; VORAVUTHIKUNCHAI, 2009; COWAN, 1999). Hydrolysable and condensed tannins and flavonoid that suppressed the antibiotic resistance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) (HATANO, 2005).

STX synthesis was reduzed in all the *S. aureus* strains after exposure to polyphenols present in the AE of leaves of *A. leiocarpa* (Figure 5). At UFPEDA 659 there was a reducing significative and dose-dependent.

Figure 5. Profile of the STX synthesis by *S. aureus* strains in the presence of MIC/2, MIC and 2xMIC of the AE. *** statistically significant.



Inhibiting the synthesis of bacterial virulence factors essential for bacterial growth and/or survival in infected hosts, is an alternative strategy that is attracting attention because it may be a promissory tool for treatment for complicated *S. aureus* infections, for example (ESCAICH, 2008; ARTINI et al., 2011; MITCHELL et al., 2012). Enzymes such as catalase and SOD contribute to the survival of cells during stress and the host response, but staphyloxanthin plays an additional role in the defense against damage by ROS, enhancing the virulence (CLAUDITZ et al., 2006). Then, inhibiting the synthesis of bacterial virulence factors essential is a new and alternative strategy that may be a promissory tool for treatment for complicated *S. aureus* infections, for an example.

Some compounds are reported to inhibit enzymes involved in STX production (CHEN et al., 2016; HAMMOND; WHITE, 1970a, b; LIU et al. 2008) and the decrease in

the STX synthesis implies a greater fluidity of the membrane, may cause a lack of proteins. This protein extravasation can be have two origins: membrane instability (WIDOMSKA et al., 2009) or defense and/or adaptation unclear mechanism. Given that postulated STX biosynthesis pathway involves condensation, dehydrogenation, oxidation, esterification steps (PELZET al., 2005), it is possible that tannins found in AE compromise it, together with its antioxidant capacity, inhibit the steps of enzymatic cascade of STX biosynthesis.

CONCLUSION

The aqueous extract of leaves of *Apuleia leiocarpa* showed antibacterial activity against *E. faecalis*, *S. saprophyticus*, *B. subtilis*, *S. epidermidis*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. The main antibacterial activity was against standard and clinical isolates of *S. aureus* with different resistance profiles, acting as a bactericide agent. AE reduced STX synthesis, an important virulence factor of the *S. aureus* that may contribute to membrane stability, may be associated a protein extravasation and a decreasing growth kinetics in the first four hours, still by unclear mechanisms.

In summary, the tannins and flavonoids present in AE could be a promising tool against resistant *S. aureus* strains increasing the susceptibility of this pathogen, being necessary further researchs on their antibacterial mechanism.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors express their gratitude to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – 405297/2018-1; CNPq - 307110/2018-4) for research grants fellowships (P.M.G. Paiva, T.H. Napoleão, M.T.S. Correia), and scholarships. Also, they are grateful to the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and the Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE - APQ-0493-4.03/14;) for research grants.

REFERENCES

ALBUQUERQUE, U. P. Introdução à etnobotânica. Rio de Janeiro: **Editora Interciência**, 2. ed. 93p., 2005.

AMSTERDAM, D. Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media. In **Antibiotics in Laboratory Medicine**, ed. Loman, p. 52-111. Baltimore, MD: Williams and Wilkins. 1996.

ARTINI, M., SCOARUGHI, G. L., PAPA, R., CELLINI, A., CARPENTIERI, A., PUCCI, P., AMORESANO, A., GAZZOLA, S., COCCONCELLI, P. S., SELAN, L. A new anti-infective strategy to reduce adhesion-mediated virulence in *Staphylococcus aureus* affecting surface proteins. **Int J Immunopathol Pharmacol.**, v. 24, p. 661–672, 2011.

ASLAM, S. N. et al. Bacterial polysaccharides suppress induced innate immunity by calcium chelation. **Curr. Biol.**, v. 18, p.1078–1083, 2008.

BACCHI, L.M.A., DEGRANDE, P.E., GAVASSONI, W.L. Etiologia de podridões em maçãs e em algodoeiros no cerrado do Brasil, **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, p. 180-181, 2002.

BLOIS, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**. v. 181, p. 1199–1200, 1958.

BORGHI, S.M., CARVALHO, T.T., STAURENGO-FERRARI, L., HOHMANN, M.S., PINGE-FILHO, P., CASAGRANDE, R., VERRI JR, W. A. Vitexin inhibits inflammatory pain in mice by targeting TRPV1, oxidative stress, and cytokines. **J Nat Prod.**, v. 76, p. 1141-1149, 2013.

BRASSEUR, T., ANGENOT, L. Un reactif de choix pour la revelation des flavonoïdes: le melange diphenylborate d'aminoethanol -peg 400. **J. Chromatogr.**, v. 351, p. 351-355, 1986.

BYLUND, J., BURGESS, L. A., P. CESCUTTI, R., ERNST, K., SPEERT, D. P. Exopolysaccharides from *Burkholderia cenocepacia* inhibit neutrophil chemotaxis and scavenge reactive oxygen species. **J. Biol. Chem.**, v. 281, p. 2526–2532, 2006.

CAI, Y. Z., LUO, Q., SUN, M., CORKE, H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 Chinese medicinal plants associated with anticancer, **Life Sciences**, v. 74, p. 2157–2184, 2004.

CARVALHO, A.S., SILVA, M.V., GOMES, F. S., PAIVA, P. M. G., MALAFAIA, C. B., SILVA, T. D., VAZ, A. F. M., SILVA, A. G., ARRUDA, I. R. S., NAPOLEÃO, T. H., CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G., CORREIA, M. T. S. Purification, characterization and antibacterial potential of alectin isolated from *Apuleia leiocarpa* seeds, **International Journal of Biological Macromolecules**, v.75, p. 402-408, 2015.

CARVALHO, P. E. R. Espécies arbóreas brasileiras. Colombo: EMBRAPA/CNPR, Brasília: **EMBRAPA/SPI**, v.1, 1039 p., 2003.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, M100-S21, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa, USA, ed. 21, 2011.

CHEN, F., DI, H., WANG, Y., CAO, Q., XU, B., ZHANG, X., YANG, N., LIU, G., YANG, C.G., XU, Y., JIANG, H., LIAN, F., ZHANG, N., LI, J., LAN, L. Small-molecule targeting of a diapophytoene desaturase inhibits *S. aureus* virulence. **Nat Chem Biol.**, v. 12, n. 3, p. 174-9, 2016. doi: 10.1038/nchembio.2003.

CHUSRI, S.; VORAVUTHIKUNCHAI, S. P. Detailed Studies on *Quercus infectoria* Olivier (Nutmegs) as an Alternative Treatment for Meticillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections. **Journal of Applied Microbiology.**, v. 106, n. 1, p. 89-96, 2009.

CLAUDITZ, A., RESCH, A., WIELAND, K. P., PESCHEL, A., AND GÖTZ, F. (2006). Staphyloxanthin plays a role in the fitness of *Staphylococcus aureus* and its ability to cope with oxidative stress. *Infect. Immun.* 74, 4950–4953. Doi: 10.1128/iai.00204-06

COWAN, M.M. Plants products as antimicrobial agents. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 12, p. 564–582, 1999.

CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Recent Advances in Understanding the Antibacterial Properties of Flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 38, n. 2, p. 99-107, 2011.

DAUM, R. S. Removing the golden coat of *Staphylococcus aureus*. **N Engl J Med.**, v. 359, p. 85–87, 2008.

DONG, L., FAN, Y., SHAO, X., CHEN, Z. Vitexin protects against myocardial ischemia/reperfusion injury in Langendorff-perfused rat hearts by attenuating inflammatory response and apoptosis. **Food Chem Toxicol.**, v. 49, p. 3211-3213, 2011.

DRAGLAND, S., SENOO, H., WAKE, K., HOLTE, K., BLOMHOFF, R. Several culinary and medicinal herbs are important sources of dietary antioxidants. **Journal of Nutrition**, v. 133, p. 1286–1290, 2003.

ESCAICH, S. Antivirulence as a new antibacterial approach for chemotherapy. **Curr Opin Chem Biol.**, v. 12, p. 400–408, 2008.

GATSING, D., MBAH, J. A., GARBA, I. H., TANE, P., DJEMGOU, P., NJI-NKAH, B. F. An antisalmonellal agent from the leaves of *Glossocalyx brevipes* Benth (Monimiaceae),” **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 9, n. 1, p. 84–87, 2006.

GEOGHEGAN J. A., MONK I. R., O'GARA J. P., FOSTER T. J. Subdomains N2N3 of fibronectin binding protein a mediate *Staphylococcus aureus* biofilm formation and adherence to fibrinogen using distinct mechanisms. **Journal of Bacteriology**, v. 195, n. 11, p. 2675–2683, 2013. doi: 10.1128/jb.02128-12

HAMMOND, R. K., WHITE, D. C. Inhibition of carotenoid hydroxylation in *Staphylococcus aureus* by mixed-function oxidase inhibitors. **J Bacteriol.**, v. 103, p. 607–610, 1970a.

HAMMOND, R. K., WHITE, D. C. Inhibition of vitamin K2 and carotenoid synthesis in *Staphylococcus aureus* by diphenylamine. **J Bacteriol.**, v. 103, p. 611–615, 1970b.

HARBORNE, J.B. Phytochemical Methods. Londres: **Chapman & Hall**, 3 ed., 1998.

HALL-STOODLEY, L., STOODLEY, P. Evolving concepts in biofilm infections. **Cell. Microbiol.**, v. 11, p. 1034–1043, 2009.

HATANO, T., KUSUDA, M., INADA, K., OGAWA, T.O., SHIOTA, S., TSUCHIYA, T., YOSHIDA, T. Effects of tannins and related polyphenols on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Phytochemistry**, v. 66, n. 17, p. 2047-55, 2005.

IPA: Instituto Agronômico de Pernambuco. Índice Pluométrico, disponível em <http://www.ipa.br/indice_pluv.php#calendario_indices>; accessed in 01/02/2017.

KARAMATSU, M. L., THORP, A. W. & BROWN, L. Changes in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin and soft tissue infections presenting to the

pediatric emergency department: comparing 2003 to 2008. **Pediatr Emerg Care**, v. 28, p. 131– 135, 2012.

LAGHI, L., PARPINELLO, G. P., RIO, D. D., CALANI, L., MATTIOLI, A. U.,
VERSARI, A. Fingerprint of enological tannins by multiple techniques approach, **Food Chemistry**, v. 121, n. 3, p.783-788, 2010.

LEE, J-H., CHO, H., KIM, Y., KIM, J-A., BANSKOTA, S., CHO, M., LEE, J. Indole and 7-benzyloxyindole attenuate the virulence of *Staphylococcus aureus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 10, p.4543-4552, 2013.

LEWIS, G., SCHRIRE, B., MACKINDER, B. et al. Legumes of the World. UK Kew: **Royal Botanic Gardens**, p. 577, 2005.

LI, H.B., WONG, C.C, W., CHENG, K.W., CHEN, F. Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. **LWT - Food Science and Technology**, v.41, n. 3, p.385-390, 2008.

LIN, J.Y., LI, C.Y., HWANG, I.F. Characterisation of the pigment components in red cabbage (*Brassica oleracea* L. var.) juice and their anti-inflammatory effects on LPS-stimulated murine splenocytes, **Food Chemistry**, v.109, n. 4, p. 771-781, 2008.

LIU, C.-I., LIU, G. Y., SONG, Y., YIN, F., HENSLER, M. E., JENG, W.-Y., NIZET, V.,
WANG, A. H.-J., OLDFIELD, E. A cholesterol biosynthesis inhibitor blocks *Staphylococcus aureus* virulence. **Science**, v. 319, p. 1391–1394, 2008.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil, 4 ed., v.1, Nova Odessa: **Plantarum**, 368p., 2002.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p. 265-275, 1951.

MALAFIA, C.B., GUERRA, M.L., MACEDO, A.J., SOUZA, E.B., CORREIA, M.T.S., SILVA, M.V. Biofilm formation by phytopathogenic bacteria on hydrophobic surfaces. (unpublished data)

MANDEL, S.; YODIM, M.B. Catechin polyphenols: Neurodegeneration and neuroprotection in neurodegenerative diseases. **Free Radic Biol Med** 2004;37:304 17.

MARCHIORI, J. N. C. Dendrologia das angiospermas: leguminosas. Santa Maria: Ed. UFSM, 200 p. 1997.

MENALE, B., CASTRO, O., CASCONI, C., MUOIO, R. Ethnobotanical investigation on medicinal plants in the Vesuvio National Park (Campania, Southern Italy), **Journal of Ethnopharmacology**, v. 192, p. 320-349, 2016. doi: 10.1016/j.jep.2016.07.049

MENTZ, L.A., LUTZEMBERGER, L.C., SCHENKEL, E.P. Da flora medicinal do Rio Grande do Sul: notas sobre a obra de D'Ávila (1910). **Caderno de Farmácia**, v. 13, n. 1, p. 25-48, 1997.

METZ, H. Dünnschichtchromatographische Schnellanalyse bei enzymatischen Steroid-Umsetzungen. **Naturwissenschaften**, v. 48, p. 596, 1961.

MISHRA, N. N., LIU, G. Y., YEAMAN, M. R., NAST, C. C., PROCTOR, R. A., MCKINNELL, J. et al. Carotenoid-related alteration of cell membrane fluidity impacts staphylococcus aureus susceptibility to host defense peptides. **Antimicrob. Agents chemother.**, v. 55, p. 526–531, 2011. Doi: 10.1128/aac.00680-10

MITCHELL, G., LAFRANCE, M., BOULANGER, S., SE´GUIN, D. L., GUAY, I., GATTUSO, M., MARSAULT, E., BOUARAB, K., MALOUIN, F. Tomatidine acts in synergy with aminoglycoside antibiotics against multiresistant Staphylococcus aureus and prevents virulence gene expression. **J Antimicrob Chemother**, v. 67, p. 559–568, 2012.

PACHECO, R. L., LOBO, R. D., OLIVEIRA, M. S., FARINA, E. F., SANTOS, C. R., COSTA, S. F., PADOVEZE, M. C., GARCIA, C. P., TRINDADE, P. A. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*(MRSA) carriage in a dermatology unit. **Clinics**, v. 66, p. 2071–2077, 2011.

PALMA, M., HAGGAR, A., FLOCK, J.I. Adherence of *Staphylococcus aureus* is enhanced by an endogenous secreted protein with broad binding activity. **J. Bacteriol.**, v. 181, p. 2840-2845, 1999.

PELZ, A., WIELAND, K. P., PUTZBACH, K., HENTSCHEL, P., ALBERT, K., GÖTZ, F. Structure and biosynthesis of staphyloxanthin from *Staphylococcus aureus*. **J Biol Chem.**, v. 280, p. 32493–32498, 2005.

PEREIRA, N.A., PEREIRA, B.M., DO NASCIMENTO, M.C., PARENTE, J.P., MORS, W.B., Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as snake venom antidotes; IV. Protection against jararaca venom by isolated constituents. **Planta Medica**, v. 60, p. 99–100, 1994.

PRIETO, P., PINEDA, M., AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Anal Biochem**, v. 269, p. 337–341, 1999.

REITZ, R.; KLEIN, R. M.; REIS, A. Projeto Madeira do Rio Grande do Sul. Porto Alegre: **SUDESUL**, 525p., 1988.

RODRIGUES-NETO, J., MALAVOLTA-JUNIOR, V.A. Doenças causadas por bactérias em crucíferas. **Informe Agropecuário**, v. 17, p. 56-59, 1995.

SCALBERT, A (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochem.* 30: 3875-3883.).

DAUM, R. S. Removing the golden coat of *Staphylococcus aureus*. **N Engl J Med.**, v. 359, p. 85–87, 2008.

SCHITO, A.M.; PIATTI, G.; STAUDER, M.; BISIO, A.; GIACOMELLI, E.; ROMUSSI, G.; PRUZZO, C. Effects of demethylfruticuline A and fruticuline A from *Salvia corrugate* Vahl. on biofilm production in vitro by multiresistant strains of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Enterococcus faecalis*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 2010. doi:10.1016/j.ijantimicag.2010.10.016

SILVA, R.A.; LIMA, M.S.F.; VIANA, J.B.M.; BEZERRA, V.S.; PIMENTEL, M.C.B. ; PORTO, A.L.F.; CAVALCANTI, M.T.H.; LIMA FILHO, J.L. Can artesanal “Coalho” cheese from Northeastern Brazil be used as a functional food? **Food Chemistry**, n. 135, v. 3, p. 1533-1538, 2012.

SILVA, L. N., TRENTIN, D. S., ZIMMER, K. R., TRETER, J., BRANDELLI, C. L. C., FRASSON, A. P., TASCA, T., DA SILVA, A. G., DA SILVA, M. V., MACEDO, A. J. . Anti-infective effects of Brazilian Caatinga plants against pathogenic bacterial biofilm formation. **Pharmaceutical biology**, v. 53, n. 3, p. 464-468, 2015.

SILVEIRA, G.P., NOME, F, GESSER, J.C., SÁ, M.M. Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. *Química Nova*, v. 29, n. 4, p.844–855, 2006.

SOUZA, L. A. G., VARELA, V. P., BATALHA, L. F. P. Tratamentos pré-germinativos em sementes florestais da Amazônia: VI – Muirajuba (*Apuleia leiocarpa* (Vog.) Macb. var. *molaris* SPR. ex BENTH.(LEGUMINOSAE). **Acta Amazônica**, v. 24, n1/2, p.81-90. 1994.

STEFANI, S., CHUNG, D. R., LINDSAY, J. A., FRIEDRICH, A. W., KEARNS, A. M., WESTH, H., MACKENZIE, F. M. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods. **Int J Antimicrob Agents**, v. 39, p. 273–282, 2012.

SWAIN, T.; HILLIS, W.E. The phenolics constituents of *prunus domestica*. I. The quantitative analysis of phenolics constituents. **J. Sci. Food Agric.**, v. 10, p. 63–68, 1959.

TRENTIN, D.S.; GIORDANI, R.B.; ZIMMER, K.R.; SILVA, A.G., SILVA, M.V. et al. Potential of medicinal plants from the Brazilian semiarid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. **J Ethnopharmacol**, v. 137, p. 327–335, 2011.

VIOLANTE, I.M.P., SOUZA, I.M., VENTURINI, C.L., RAMALHO, A.F.S., SANTOS, R.A.N., FERRARI, M. Avaliação *in vitro* da atividade fotoprotetora de extratos vegetais do cerrado de Mato Grosso. **Rev Bras Farmacogn.**, v. 1, n. 2A, p. 452-57, 2009.

WAGNER, H.; BLADT, S. Plant drug analysis - a thin layer chromatography atlas. Berlin: **Springer**, 2.ed., 384 p., 1996.

WEISS, A., BROACH, W.H., SHAW, L.N. Characterizing the transcriptional adaptation of *Staphylococcus aureus* to stationary phase growth. **Pathog Dis.**, v. 74, n. 5, p. ftw046, 2016. doi: 10.1093/femspd/ftw04

WIDOMSKA, J., KOSTECKA-GUGAŁA, A., LATOWSKI, D., GRUSZECKI W. I., STRZAŁKA, K. Calorimetric studies of the effect of cis-carotenoids on the thermotropic phase behavior of phosphatidylcholine bilayers. **Biophys. Chem.**, v. 140, p. 108–114, 2009.

WOISKY, R., SALATINO, A. Analysis of propolis: Some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, v. 37, p. 99–105, 1998.

VUONG, C., KOCIANOVA, S.; VOYICH, J. M.; YAO, Y.; FISCHER, E. R.; DELEO, F. R.; OTTO, M. A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm

formation, immune evasion, and virulence. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 54881– 54886, 2004.
(Erratum, 280:12064, 2005)

5 CONCLUSÕES

- A Caatinga constitui uma rica fonte de recursos naturais, mas ainda pouco estudada. A prospecção de moléculas biologicamente ativas neste domínios fitogeográficos tem se mostrado mais promissora que em outros, o que agregará maiores conhecimentos sobre sua flora, além de valor biotecnológico, econômico e o manejo consciente;
- Leguminosas são uma excelente fonte de proteína pelos elevados teores protéicos em seus tecidos, abrangendo várias classes de proteínas, desde enzimas, lectinas com atividade hemaglutinante até lectinas com as resistentes à proteólise em diferentes graus. Dessa forma, inibidores de protease, especificamente inibidores de tripsina/quimotripsina, nas sementes de espécies vegetais de leguminosas são considerados uma limitação à exploração de sementes na nutrição, mas um grande potencial para a indústria farmacêutica no desenvolvimento de medicamentos anti-virais, por exemplo;
- Uma lectina – LeSApul – foi pré-purificada a partir das sementes de *Apuleia leiocarpa* (Voguel) J. F. Macbride através de cromatografia em coluna de quitina e apresentou atividade hemaglutinante com eritrócitos humanos tipos A, B e O e de coelho, sendo inibida pelo açúcar aminado N-acetilglicosamina;
- LeSApul apresentou atividade bacteriostática contra cepas bacterianas Gram-positivas (*Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*) e Gram-negativas (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *X. campestris* pv. *viticola*, *X. campestris* pv. *malvacearum*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*) e atividade bactericida contra as variedades *X. campestris* pv. *campestris*, *X. campestris* pv. *viticola* e *X. campestris* pv. *malvacearum*, fazendo-se necessário estudos complementares visando a empregabilidade na prática clínica e agricultura, visto que é crescente a resistência bacteriana aos antibióticos mais utilizados e que ainda há bactérias fitopatógenas arruinando lavouras por não ter combate eficiente;
- O extrato aquoso (EA) das folhas de *Apuleia leiocarpa* (Voguel) J. F. Macbride apresentou destacada atividade antioxidante, associada aos taninos condensados, flavonóides, dentre eles a vitexina, encontrados;

- O EA apresentou atividade bacteriostática contra *E. faecalis*, *S. saprophyticus*, *B. subtilis*, *S. epidermidis*, *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris*, porém a principal atividade antibacteriana foi contra a cepa padrão e os isolados clínicos de *S. aureus* com diferentes perfis de resistência, agindo como bactericida.
- O EA reduziu a síntese de estafiloxantina, um pigmento carotenóide que atua na estabilidade da membrana bacteriana e é um importante fator de virulência. É possível que a capacidade antioxidante dos taninos encontrados no EA comprometam a síntese de estafiloxantina, inibindo etapas da cascata enzimática da biossíntese. Os baixos níveis de estafiloxantina aumentam a fluidez da membrana bacteriana e pode justificar o extravasamento proteico ocorrido nas linhagens de *S. aureus*;
- Dessa forma, tanto a LeSApul como os taninos e flavonóides presentes na *A. leiocarpa* podem ser ferramentas promissoras contra diversas cepas bacterianas padrões, além das resistentes de *S. aureus*, sendo necessárias investigações adicionais sobre seu mecanismo de ação antibacteriano.

REFERÊNCIAS

- ALBAGLI, S. **Amazônia: fronteira geopolítica da biodiversidade**. Parcerias Estratégicas, Brasília, v. 4, p. 5–19, 2001.
- ALBUQUERQUE, U. P. **Introdução à etnobotânica**. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2. ed., 2005, 93 p.
- ALBUQUERQUE, U. P.; ARAÚJO, E. L.; EL-DEIR, A.C. A.; LIMA, A. L. A.; SOUTO, A.; BEZERRA, B. M.; FERRAZ, E. M. N.; FREIRE, E. M. X.; SAMPAIO, E. V. S. B.; LAS-CASAS, F. M. G.; MOURA, G. J.B. M.; PEREIRA, G. A.; MELO, J. G.; RAMOS, M. A.; RODAL, M. J. N.; SCHIEL, N.; LYRA-NEVES, R. M.; ALVES, R. R. N.; AZEVEDO-JÚNIOR, S. M.; TELINO-JÚNIOR, W. R.; SEVERI, W. Caatinga Revisited: Ecology and Conservation of an Important Seasonal Dry Forest. **The Scientific World Journal**, v. 2012, Article ID 205182. doi:10.1100/2012/205182
- ALBUQUERQUE, U. P., HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos farmacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas, **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 678–689, 2006.
- ALBUQUERQUE, U.P.; MEDEIROS, P.M.; ALMEIDA, A.L.S.; MONTEIRO, J.M.; LINS-NETO, E.M.F.; MELO, J.G.; SANTOS, J.P. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **J Ethnopharmacol**, v. 114, p. 325–354, 2007.
- ALMEIDA, C.D.F.C.B.R.; CABRAL, D.L.V.; ALMEIDA C.C.B.R.; AMORIM, E.L.C.; ARAÚJO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P. Comparative study of the antimicrobial activity of native and exotic plants from the Caatinga and Atlantic Forest selected through an ethnobotanical survey, **Pharmaceutical Biology**, v. 50, n. 2, p.201–207, 2012.
- ALMEIDA, C.D.F.C.B.R.; RAMOS, M. A.; AMORIM, E. L. C.; ALBUQUERQUE, U. P. A comparison of knowledge about medicinal plants for three rural communities in the semi-arid region of northeast of Brazil, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, n. 3, p. 674–684, 2010.
- ALMEIDA, C.F.C.B.R.; LIMA E SILVA, T.C.; AMORIM, E.L.C.; MAIA, M.B.S.; ALBUQUERQUE, U.P. Life strategy and chemical composition as predictors of the selection of medicinal plants from the Caatinga (Northeast Brazil). **Journal of Arid Environments**, v. 62, p. 127–142, 2005.
- AMARAL, D. M. I.; ALCALAY, N.; ANTONIO, M. G. Armazenamento de sementes de quatro espécies florestais do Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO FLORESTAL ESTADUAL, 6, Nova Prata, 1988. **Anais**. Nova Prata: Prefeitura Municipal de Nova Prata/Meridional, p. 373-397, 1988.

- ANDRADE, J.L. et al. Lectin-induced nitric oxide production. **Cellular Immunology**, v. 194, p. 98-102, 1999.
- ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **J. Antimicrob. Chemother.** n. 48, supl 1, p. 5-16. 2001.
- ARAUJO, E. L.; CASTRO, C. C.; ALBUQUERQUE, U. P. Dynamics of Brazilian Caatinga. A Review Concerning Plants, Environment and People. **Functional Ecosystems and Communities**, v. 1, p. 15–28, 2007.
- ARAÚJO, R.M.S.; FERREIRA, R.S.; NAPOLEÃO, T.H.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M.G.; COELHO, L.C.B.B.; CORREIA, M.T.S.; OLIVA, M.L.V., PAIVA, P.M.G. *Crataeva tapia* bark lectin is an affinity adsorbent and insecticidal agent. **Plant Science**, v. 183, p. 20-26, 2012.
- ARCHIBALD, A.R.; COAPES, E.H. The interaction of Concanavalin A with teichoic acids and bacterial cell walls. **Biochemical Journal**, n. 123, p. 665-667, 1971.
- ASLAM, S. N. et al. Bacterial polysaccharides suppress induced innate immunity by calcium chelation. **Curr. Biol.**, v. 18, p.1078–1083, 2008.
- BHATTACHARYYA, A.; MAZUMDAR, S.; LEIGHTON, S.M.; BABU, C.R. A Kunitz proteinase inhibitor from *Archidendron ellipticum* seeds: Purification, characterization, and kinetic properties. **Phytochemistry**, v. 67, p. 232–241, 2006.
- BALICK, M.J. Ethnobotany and the identification of therapeutic agents from the rainforest. In: Chadwick, D.J., Marsh, J. (Eds.), **Bioactive Compounds from Plants**, Wiley, Chichester, p. 22 – 32, 1990.
- BAPTISTA, M. M.; RAMOS, M. A.; ALBUQUERQUE, U.P.; COELHO-DE-SOUZA, G.; RITTER, M. R. Traditional botanical knowledge of artisanal fishers in southern Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 9, n. 54, 2013.
- BARBOSA, K.B.; COSTA, N.M.; ALFENAS, R. C.G.; DE PAULA, S.O.; MINIM, V.P.; BRESSAN, J. Oxidative stress: Concept, implications and modulating factors. **Rev Nutr**, v. 23, p. 629-643, 2010.
- BAVINGTON, C.; PAGE, C. Stopping bacterial adhesion: a novel approach to treating infections. **Respiration**, v. 72, p. 335–344, 2005.
- BENNETT, B.C.; PRANCE, G.T. Introduced plants in the indigenous pharmacopeia of Northern South America. **Economic Botany**, v. 54, p. 90–102, 2000.
- BIES, C., LEHR, C.M.; WOODLEY, J.F. Lectin-mediated drug targeting: history and applications. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 56, p. 425-435, 2004.

BJARNSHOLT, T.; GIVSKOV, M. The role of quorum sensing in the pathogenicity of the cunning aggressor *Pseudomonas aeruginosa*. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 387, p. 409-414, 2007.

BOBBARALA, V. **Antimicrobial Agents**. InTech, 2012, 422 p. ISBN 978-953-51-0723-1

BOWERS, W.S.; OHTA, T.; CLEERE, J.S.; MARSELLA, P.A. Discovery of insect juvenile hormones - in plants (Ageretochrome I, II). **Science**, v. 195, p. 542-547, 1976.

BRAZ-FILHO, R.; GOTTLIEB, O.R. The Flavones of *Apuleia leiocarpa*. **Phytochemistry**, v. 10, p. 2344-2450, 1971.

BROSSI, A. **The Alkaloids**, v. XXV. Academic Press, Inc, London, 1985.

BROOKS, S.A.; LEATHEM, A.J. Expression of N-acetyl galactosaminylated and sialylated glycans by metastases arising from primary breast cancer. **Invasion Metastasis**, v. 18, p. 115-121, 1998.

BYLUND, J.; BURGESS, L. A.; P. CESCUTTI, R.; ERNST, K.; SPEERT, D. P. Exopolysaccharides from *Burkholderia cenocepacia* inhibit neutrophil chemotaxis and scavenge reactive oxygen species. **J. Biol. Chem.**, v. 281, p. 2526-2532, 2006.

CANALES, M.; HERNANDEZ, T.; CABALLERO, J.; VIVAR, A.R.; AVILA, G.; DURAN, A.; LIRA, R. Informant consensus factor and antibacterial activity of the medicinal plants used by the people of San Rafael Coxcatlán, Puebla, México. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 429-439, 2005.

CARBONARO, M.; MASELLI, P.; NUCARA, A. Structural aspects of legume proteins and nutraceutical properties. **Food Research International**, v. 76, p. 19-30, 2015.

CARLINI, C.R.; GROSSI-DE-SÁ, M.F. Plant toxic proteins with insecticidal properties: A review on their potentialities as bioinsecticides. **Toxicon**, v. 40, p. 1515-1539, 2002.

CARVALHO, J.C.T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E.P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G., MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A., PETROVICK, P.R. (Eds.). **Farmacognosia - da planta ao medicamento**, 4 ed., Porto Alegre: Editora Universitária/UFRGS/UFSC, p. 433-450, 2002.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Colombo: EMBRAPA/CNPR, Brasília: EMBRAPA/SPI, v.1, 1039 p., 2003.

CEGELSKI, L.; MARSHALL, G.R.; ELDRIDGE, G.R.; HULTGREN, S.J. The biology and future prospects of antivirulence therapies. **Nat Rev Microbiol**, v. 6, p. 17-27, 2008.

LEONARDIS, J. **Libro del árbol**, tomo 2, Buenos Aires: Celulosa Argentina, 3 ed., v. 2, 1975.

- CHAIEB, K.; KOUIDHI, B.; JRAH, H.; MAHDOUANI, K.; BAKHROUF, A. Antibacterial activity of Thymoquinone, an active principle of *Nigella sativa* and its potency to prevent bacterial biofilm formation. **BMC Complement Altern Med**, v. 13, p. 11–29, 2011.
- CHATTOPADHYAY, D., SARKAR, M.C., CHATTERJEE, T., SHARMA DEY, R., BAG, P., CHAKRABORTI, S., KHAN, M.T. Recent advancements for the evaluation of anti-viral activities of natural products, **New Biotechnology**, v. 25, n.5, p. 348– 365, 2009.
- CHEEL, J.; TUMOVA, L.; ARECHE, C.; VAN ANTWERPEN, P.; NEVE, J.; ZOUAOUI-BOUDJELTIA, K.; et al . Variations in the chemical profile and biological activities of licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.), as influenced by harvest times. **Acta Physiol Plant**, v. 35, p. 1337-1349, 2013.
- CHUSRI, S.; VORAVUTHIKUNCHAI, S. P. Detailed Studies on *Quercus infectoria* Olivier (Nutgalls) as an Alternative Treatment for Meticillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, n. 1, p. 89-96, 2009.
- CLERE, N.; FAURE, S.; MARTINEZ, M. C.; ANDRIANTSITOHAINA, R. Anticancer properties of flavonoids: roles in various stages of carcinogenesis. *Cardiovasc. Hematol. Agents Med. Chem.*, v. 9, p. 62- 77, 2011.
- COELHO, J.S. et al. Effect of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of *Aedes aegypti* larvae. **Chemosphere**, v. 77, p. 934-938, 2009.
- COELHO, L.C.B.B.; SILVA, M.B.R. Simple method to purify milligram quantities of the galactose-specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*. **Phytochem. Anal.**, v. 11, p. 1–6, 2000.
- COLE, H.B.; EZZELL, W.J.; KELLER, F.K.; DOYLE, J.R. Differentiation of *Bacillus anthracis* and other *Bacillus* species by use of lectins. **Journal of Clinical Microbiology**, 19, 48-53, 1984.
- COMINETTI, M. R.; MARQUES, M. R.; LORENZINI, D. M.; LÖFGREN, S.E.; DAFFRE, S.; BARRACCO, M.A. Characterization and partial purification of a lectin from the hemolymph of the white shrimp *Litopenaeus schmitti*. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 26, p. 715-721, 2002.
- CONTE, L.A., Shaman pharmaceuticals' approach to drug development. In: Balick MJ, Elisabetsky E, Laird AS, editors. Medicinal resources of the Tropical Forest biodiversity and its importance to human health. New York: **Columbia University Press**, p. 94 -100, 1996.
- CORDELL, G.A. **Introduction to Alkaloids: a biogenic approach**. New York: John Wiley and Sons, 1981, 1072 p.

CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B. Purification of glucose/mannose lectin, isoform 1 from seeds of *Cratylia mollis* Mart. feijão camaratu. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, New York, v. 55, p. 261-273, 1995.

CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G. Lectins, carbohydrate recognition molecules: are they toxic?. In: Yasir Hasan Siddique. (Org.). **Recent Trends in Toxicology**. Kerala, India: Transworld Research Network, v. 37, p. 47-59. 2008.

COSTERTON, J.W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D.E.; KORBER, D.R.; LAPPIN-SCOTT, H.M. Microbial biofilms, **Annu. Rev. Microbiol.** n.49, p. 711–745, 1995.

COSTERTON, J.W.; STEWART, P.S.; GREENBERG, E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, p. 1318–1322, 1999.

COTTON, C.M. **Ethnobotany: Principles and Application**. Wiley, Chichester, UK, 1996.

COX, P.A.; BALICK, M.J. The ethnobotanical approach to drug discovery, **Scientific American**, v. 270, p. 60 – 65, 1994.

COWAN, M.M. Plants products as antimicrobial agents. **Clin. Microbiol. Rev.** v. 12, p. 564–582, 1999.

CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Recent Advances in Understanding the Antibacterial Properties of Flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 38, n. 2, p. 99-107, 2011.

DAMASIO, D. C.; NOLTE, S.; POLAK, L.P.; BRANDT, A.P.; BONAN, N.B.; ZISCHLER, L.; STUELPCAMPELO, P.M.; CADENA, S.M.S.C.; DE NORONHA, L.; ELIFIO-ESPOSITO, S.L. et al. The lectin BJcuL induces apoptosis through TRAIL expression, caspase cascade activation and mitochondrial membrane permeability in a human colon adenocarcinoma cell line. **Toxicon**, v. 90, p. 299-307, 2014.

DANIELS, G.L.; BROMILOW, I. **Essential guide to blood groups**. Blackwell publishing, 2007.

DAVIES, D.G. et al. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. **Science**, v. 280, p. 295-298, 1998.

DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antimicrobial agents, **Nat Rev Drug Discov**, v. 2, p. 114–122, 2003.

ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL. Decreto 52.109, de 01 de dezembro de 2014, <https://www.mprs.br/ambiente/legislacao/id9025.htm?impressao=1>. Acessado em 01/02/ 2017.

DEÁK, M.; HORNING, Á.; NOVÁK J. et al. Novel role for galectin-1 in Tcells under physiological and pathological conditions. **Immunobiology**, n. 220, p. 483–489, 2015.

DE LA FUENTE, H.; CRUZ-ADALIA, A.; MARTINEZ DEL HOYO, G. et al. The leukocyte activation receptor CD69 controls T cell differentiation through its interaction with galectin-1. **Mol Cell Biol**, n. 34, p. 2479–2487, 2014.

DE LUCA, V.; SALIM, V.; ATSUMI, S.M.; YU, F. Mining the biodiversity of plants: a revolution in the making. **Science**, v. 336, p. 1658–1661, 2012. doi: 10.1126/science.1217410 PMID: 22745417

DEJOBERT, Y.; MARTIN, P.; BERGOEND, H. Airborne contact dermatitis from Apuleia leiocarpa wood. **Contact dermatitis**, v. 32, n.4, p. 242–243, 1995.

DI STASI, L.C.; OLIVEIRA, G.P.; CARVALHAES, M.A.; QUEIROZ, M. JR.; TIEN, O.S.; KAKINAMI, S.H.; REIS, M.S. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest, **Fitoterapia**, v. 73, p. 69–91, 2002.

DIXON, R. Plant natural products: the molecular genetic basis of biosynthetic diversity, **Curr pin Biotechnol**, v.10, p. 192–197, 1999.

DONLAN, R.M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerg Infect Dis**, v. 8, p. 881–890, 2002.

DONLAN, R.M.; COSTERTON, J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, p. 167–193, 2002.

DOYLE, R.J.; NEDJAT-HAIEM, F.; MILLER, R.D.; KELLER, K.F. Interaction between plant agglutinins and Legionella species. **Journal of Clinical Microbiology**, n. 15, p. 973–975, 1982.

DOYLE. R. J.; SLIFKIN, M. **Lectin–Microorganism Interactions**, New York: Marcel Decker, Inc., 1994.

DOW, J.M.; CROSSMAN, L.C.; FINDLAY, K.; HE, Y.-Q.; FENG, J.X.; TANG, J.-L. Biofilm dispersal in xanthomonas campestris controlled by cell–Cell signalling and is required for full virulence to plants. **Proc. Natl. Acad. Sci. Usa**, n. 100, p. 10995–11000, 2003.

EIBL, B.I.; SILVA, F.; CARVALHO, A.; CZEREPACK, R.; KEHL, J. Ensayos de germinación y análisis cuantitativo en semillas de especies forestales nativas de Misiones, R.A. **Yvyrareta**, Eldorado, v.5, n.5, p.33–48, 1994.

ELIFIO-ESPOSITO, S.; TOMAZELI, L.; SCHWARTZ, C.; GIMENEZ, A.P.; FUGII, G.M.; FERNANDES, L.C.; ZISHLER, L.F.M.; STUELP-CAMPELO, P.M.; MORENO,

A.N. Human neutrophil migration and activation by BJcuL, a galactose binding lectin purified from *Bothrops jararacussu* venom. **Bmc Immunol.**, v. 12, 2011.

ESPINA, L.; SOMOLINOS, M.; LORÁN, S.; CONCHELLO, P.; GARCÍA, D.; PAGÁN, R. Chemical Composition of Commercial Citrus Fruit Essential Oils and Evaluation of Their Antimicrobial Activity Acting Alone or in Combined Processes. **Food Control**, v. 22, n. 6, p. 896-902, 2011. ISSN 0956-7135, <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.11.021>.

ETZLER, M.E. Distribution and properties of the *Dolichos biflorus* lectins: a model system for exploring the role of lectins in plants. **Progress in Clinical and Biological Research**, 138, 197-207. 1983.

EVANS, W. C. **Trease & Evans Pharmacognosy**. Elsevier, ed. 15, 585 p., 2002.

FANG, E.F.; LIN, P.; WONG, J.H.; TSAO, S.W.; NG, T.B. A lectin with anti-HIV-1 reverse transcriptase, antitumor, and nitric oxide inducing activities from seeds of *Phaseolus vulgaris* cv. extralong autumn purple bean. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 2221-2229, 2010.

FELIPPI, M. **Morfologia e silvicultura de espécies arbóreas da floresta estacional decidual**. Universidade Federal De Santa Maria. Centro de Ciências Rurais. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal. Santa Maria-RS, Brasil, 2010.

FENTON-NAVARRO, B.; GARCÍA-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. 42, p. 525-532, 2003.

FERNANDES, P. Antibacterial discovery and development - the failure of success? **Nat. Biotechnol.**, v. 24, p. 1497-1503, 2006.

FERNÁNDEZ-ALONSO, J.L.; VEGA, N.; FILGUEIRA, J.J.; PÉREZ, G. Lectin prospecting in Colombian Labiatae. A systematic-ecological approach. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, n. 6, p. 617-633, 2003.

FERRARI, C.K.B. Functional foods, herbs and nutraceuticals: towards biochemical mechanisms of healthy aging. **Biogerontology**, v. 5, n. 5, p. 275-9, 2004.

FERRAZZANO, G.F.; AMATO, I.; INGENITO, A.; DE NATALE, A.; POLLIO, A. Anti-cariogenic effects of polyphenols from plant stimulant beverages (cocoa, coffee, tea), **Fitoterapia**, v. 80, p. 255-262, 2009.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **RAMB.**, v. 43, n. 1, p. 61-8, 1997.

FIGUEIREDO, J.G.; DA-SILVEIRA-BITENCOURT, F.; BESERRA, I.G. et al. Antinociceptive activity and toxicology of the lectin from *Canavalia boliviana* seeds in mice. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 380, p. 407-414, 2009.

FRANCESCHINI, V.; LAZZARI, M.; CIANI, F. Lectin cytochemical localization of glycoconjugates in the olfactory system of the lizards *Lacerta viridis* and *Podarcis sicula*. **Anatomy and Embryology**, v. 202, p. 49-54, 2000.

FREITAS, J.H.; SANTANA, K.V.; NASCIMENTO, A.C.; PAIVA, S.C.; MOURA, M.C.; COELHO, L.C.; OLIVEIRA, M.B.; PAIVA, P.M.; NASCIMENTO, A.E.; NAPOLEÃO, T.H. Evaluation of using aluminum sulfate and water-soluble *Moringa oleifera* seed lectin to reduce turbidity and toxicity of polluted stream water. **Chemosphere**, v. 163, p. 133-141, 2016. doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.08.019.

FUX, C.A.; COSTERTON, J.W.; STEWART, P.S.; STOODLEY, P. Survival strategies of infectious biofilms. **Trends Microbiol.** v. 3, p. 34-40, 2005.

GABIUS, H-J. The magic of the sugar code. **Trends Biochem Sci**, v. 40, p. 341, 2015.

GABIUS, H-J, ROTH, J. An introduction to the sugar code. **Histochem Cell Biol**, v. 147, v. 2, 2017. doi:10.1007/s00418-016-1521-9

GABOR, F.; KLAUSEGGER, U.; WIRTH, M. The interaction between wheat germ agglutinin and other plant lectins with prostate cancer cells Du-145. **Int. J. Pharm.**, v. 221, p. 35-47, 2001.

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

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

GAMBLIN, S.J.; HAIRE, L.F.; RUSSELL, R.J. et al. The structure and receptor binding properties of the 1918 influenza hemagglutinin., **Science**, v. 303, n. 5665, p. 1838-1842, 2004.

GENTRY, A. H. Diversity and floristic composition of neotropical dry forests. P. 146-193 in: H. Bullock, H. A. Mooney & E. Medina (eds.) **Seasonally Dry Tropical Forests**. Cambridge: Cambridge University Press, 1995.

GEMEINER, P.; MISLOVICOVÁ, D.; TKÁČ, J. et al. Lectinomics: II. A highway to biomedical/clinical diagnostics. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 1-15, 2009.

GENTRY, A. H. Four neotropical rainforests. New Haven, **Yale University Press**, 1990.

GENTRY, A. H. Changes in plant community diversity and floristic composition on environmental gradients. **Annals of Missouri Botanical Garden**, v. 75, p. 1-34, 1988.

- GIRENNAVAR, B.; CEPEDA, M.L.; SONI, K.A. et al. Grapefruit juice and its furocoumarins inhibits autoinducer signaling and biofilm formation in bacteria, **International Journal of Food Microbiology**, v. 125, p. 204–208, 2008.
- GOMES, F.S.; PROCÓPIO, T.F.; NAPOLEÃO, T.H.; COELHO, L.C.; PAIVA, P.M. Antimicrobial lectin from *Schinus terebinthifolius* leaf. **J Appl Microbiol.**, v. 114, n. 3, p. 672-9, 2013.
- GONÇALVES, L.C.; RUPPELT, B.M.; PEREIRA, N.A. Atividade antiofídica da *Apuleia leiocarpa* (jutaí, garapa) e de alguns de seus constituintes. **Rev. Bras. Farm.**, v. 72, p. 81-84. 1991.
- GRAHAM, K.; KELLER, K.; EZZELL, W.J.; DOYLE, J.R. Enzyme-linked lectinosorbent assay (ELLA) for *Bacillus anthracis*. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, n. 3, p. 210-212, 1984.
- GREEN, K.; BRAND, M.D.; MURPHY, M.P. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. **Diabetes**, v. 53, Suppl 1, p. 110-118, 2004.
- GUERRERO, L.; CASTILLO, J.; QUIÑONES, M.; GARCIA-VALLVÉ, S.; AROLA, L.; PUJADAS, G.; MUGUERZA, B. Inhibition of angiotensin-converting enzyme activity by flavonoids: structure-activity relationship studies. **Plos One**, v. 7, n. 11, e49493, 2012. doi: 10.1371
- GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L.S.; PUPO, M.T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes, **Química Nova**, v. 33, n. 3, p.667–679, 2010.
- HALLIWELL B, WHITEMAN M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **Br J Pharmacol.**, v. 142, n. 2, p. 231-55, 2004.
- HALL-STOODLEY, L.; STOODLEY, P. Evolving concepts in biofilm infections. **Cell. Microbiol.**, v. 11, p. 1034–1043, 2009.
- HAN, J.W. JUNG, M. G.; KIM, M. J.; YOON, K. S.; LEE, K. P.; KIM, G.H. Purification and characterization of a D-mannose specific lectin from the green marine alga, *Bryopsis plumosa*. **Phycological Research**, v. 58, p. 143-150, 2010.
- HANDWERGER, S.; TOMASZ, A. Antibiotic tolerance among clinical isolates of bacteria. **Rev Infect Dis**, v. 7, p. 368–86, 1985.
- HARBORNE, J.B. **Introduction to Ecological Biochemistry**, 2 ed. NY: Academic Press, , 1982.
- HARBORNE, J.B. **Phytochemical Methods. A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis**. London: Chapman & Hall, 1998.
- HEDSTROM, L. Serine protease mechanism and specificity. **Chemical reviews**, v. 102, n. 12, p. 4501-4524, 2002.

HEINRICH, M.; ANKLI, A.; FREI, B.; WEIMANN, C.; STICHER, O. Medicinal plants in Mexico: healers' consensus and cultural importance. **Social Science & Medicine**, v. 47, p. 1859–1871, 1998.

HERINGER, E.P.; FERREIRA, M.B. Árvores úteis da Região Geo-Econômica do Distrito Federal. **Cerrado**, Brasília, v. 19, p. 20-24, 1973.

HIJWEGEN, T. Autonomous and induced pterocarpanoid formation in the Leguminosae. **Phytochemistry**, v. 12, p. 375 – 380, 1973.

HODGKINSON, J.T.; WELCH, M.; SPRING, D.R. Learning the language of bacteria. **ACS Chemical Biology**, v. 2, p. 715-717, 2007.

HØIBY, N.; BJARNSHOLT, T.; GIVSKOV, M. et al. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents* 35:322–32. 2010.

HOGENKAMP, A.; VAN, E.M.; VAN, D.A. et al. Characterization and expression sites of newly identified chicken collectins. **Molecular Immunology**, v. 43, p. 1604-1616, 2006.

HONG, M.; CASSELY, A.; MECHREF, Y.; NOVOTNY, M.V. Sugar-lectin interactions investigated through affinity capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography B. Biomed Sci Appl.** v. 752, p. 207-216, 2001.

HUANG, Y.; ZHAO, J.; ZHOU, L. et al. Antifungal Activity of the Essential Oil of *Illicium verum* Fruit and its Main Component Trans-Anethole. **Molecules**, v. 15, n. 11, p. 7558-7569, 2010.

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

JAMAL, F.; SINGH, D.; KHAN, M.Y. Serine protease inhibitors in plants: Nature's arsenal crafted for insect predators. **Phytochem. Rev.**, v. 12, p. 1–34, 2013.

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. **Carbohydrate Polymers**, n. 26, p. 219-230, 1995.

KHAFAGI, I.K.; DEWEDAR, A. The efficiency of random versus ethno-directed research in the evaluation of Sinai medicinal plants for bioactive compounds. **Journal of Ethnopharmacology**, v., 71, p. 365–37, 2000.

KING, S. R.; AMBIKA, R. Allelopathic plants. 5. *Chromolaena odorata* (L.). **Allelopathy Journal**, v. 9, n.1, p.35-41, 2002.

KISS, J.; KUNSTÁR, A.; FAJKA-BOJA, R. et al. A novel anti-inflammatory function of human galectin-1: Inhibition of hematopoietic progenitor cell mobilization. **Exp Hematol**, n. 35, p. 305–313, 2007.

KLEIN, R.C.; FABRES-KLEIN, M.H.; DE OLIVEIRA, L.L. et al. A C-Type Lectin from *Bothrops jararacussu* Venom Disrupts Staphylococcal Biofilms. **PLoS One**, v. 10, 2015.

KOBLINSKI, J. E.; AHRAM, M.; SLOANE, B. F. Unraveling the role of proteases in cancer. **Clinica chimica acta**, v. 291, n. 2, p. 113-135, 2000.

KODAMA, D.H.; GONCALVES, A.E.; LAJOLO, F.M.; GENOVESE, M.I. Flavonoids, total phenolics and antioxidant capacity: Comparison between commercial green tea preparations. **Cienc Tecnol Aliment**, v. 30, p. 1077-1082, 2010.

KONG, P.; WANG, L.; ZHANG, H. et al. A novel C-type lectin from bay scallop *Argopecten irradians* (AiCTL-7) agglutinating fungi with mannose specificity. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 30, p. 836-844, 2011.

KONOZY, E. H.; BERNARDES, E.S.; ROSA, C. et al. Isolation, purification, and physicochemical characterization of a D-galactose-binding lectin from seeds of *Erythrina speciosa*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 410, p. 222-229, 2003.

KOVÁCS-SÓLYOM, F.; BLASKÓ, A.; FAJKA-BOJA, R. et al. Mechanism of tumor cell-induced T-cell apoptosis mediated by galectin-1. **Immunol**, n. 127, p. 108–118, 2010.

KWEIFIO-OKAI, G.; DE MUNK, F.; RUMBLE, B.A.; MACRIDES, T.A.; CROPLEY, M. Antiarthritic mechanisms of amyrin triterpenes. **Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.**, v. 85, p. 45–55, 1994.

LAREDO, A.R.L.; AGUIRRE, Y.A.G.; PEREZ, V.M.; MORALES, G.S.; JIMENEZ, G.S.; TAPIA, G. T. Variation in antioxidant properties and phenolics concentration in different organs of wild growing and greenhouse cultivated *Castilleja tenuiflora* Benth. **Acta Physiol Plant**, v. 34, p.2435-2442, 2012.

LEE, J.H.; CHO, H.S.; KIM, Y.G. et al. J. Indole and 7-benzyloxyindole attenuate the virulence of *Staphylococcus aureus*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 97, p. 4543–4552, 2013.

LEHR, C.M. Lectin-mediated drug delivery: the second generation of bioadhesives. **J Control Release**. v. 65, p. 19-29, 2000.

LEID, J.G., SHIRTLIFF, M.E., COSTERTON, J.W., STOODLEY, P. Human leukocytes adhere to, penetrate, and respond to *Staphylococcus aureus* biofilms. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 6339–6345, 2002.

LEITE, Y .F. M. M.; SILVA, L.M.; AMORIM, R.C. et al. Purification of a lectin from the marine red alga *Gracilaria ornata* and its effect on the development of the cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1724, p. 137-145, 2005.

LEONIDAS, D. D.; SWAMY, B.M.; HATZOPOULOS, G. N.; GONCHIGAR, S. J.; CHACHADI, V. B.; INAMDAR, S. R.; ZOGRAPHOS, S. E.; OIKONOMAKOS, N. G. Structural basis for the carbohydrate recognition of the *Sclerotium rolfsii* lectin. **Journal Mol Biol.**, v. 368, p. 1145-1161, 2007.

LEVISON, M. E. Pharmacodynamics of antimicrobial drugs. **Infect Dis Clin N Am**, v. 18, p. 451–465, 2004.

LEWIS, G.; SCHRIRE, B.; MACKINDER, B. et al. Legumes of the World. UK Kew: **Royal Botanic Gardens**, p. 577, 2005.

LI, H.B.; WONG, C.C, W.; CHENG, K.W.; CHEN, F. Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. **LWT - Food Science and Technology**, v.41, n. 3, p.385-390, 2008.

LILJEMARK, W.F.; BLOOMQUIST, C.G.; GERMAINE, G.R. Effect of bacterial aggregation on the adherence of oral streptococci to hydroxiapatite. **Infect. Immun.**, v. 31, p. 935-941, 1981.

LIMA, A.L.R.; CAVALCENTI, C.C.; SILVA, M.C. et al. Histochemical Evaluation of human prostatic tissues with *Cratylia mollis* seed lectin. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, 2010.

LUO, C.T.; MAO, S.S.; LIU, F.L.; YANG, M.X.; CHEN, H.; KURIHARA, H. et al . Antioxidant xanthones from *Swertia mussotii*, a high altitude plant. **Fitoterapia**, v. 91, p. 140-147, 2013.

LIU, B.; BIAN, H.J.; BAO, J.K. Plant lectins: Potential antineoplastic drugs from bench to clinic. **Cancer Lett.**, v. 287, p. 1–12, 2010.

LIS, H.; SHARON, N. Applications of lectins. In: Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine, Leiner, I.F., Sharon, N., Goldstein, I.J. (eds.), p. 294-357, Academic Press, New York. 1986.

LÓPEZ, O.F.L.; BUJÁN J.J.G.; LOSADA J. D.P.; CAPDEVILA E. F. Airborne allergic contact dermatitis caused by *Apuleia leiocarpa* in a parquet fitter. **Contact Dermatitis**, v. 74, n. 2, p. 122-123, 2016.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**, 4 ed., v.1, Nova Odessa: Plantarum, 2002, 368 p.

LUNA, J.M.; RUFINO, R.D.; SARUBBO, L.A. et al. Evaluation antimicrobial and antiadhesive properties of the biosurfactant Lunasan produced by *Candida sphaerica* UCP 0995. **Curr Microbiol**, v. 62, p. 1527– 1534, 2011.

MACBRIDE, J. F. 1 **Notes on certain Leguminosae. *Apuleia leiocarpa* (Vogel) comb. nov.** Contr. Gray Herb., n.s. v. 59, n. 23, 1919.

MACEDO, M. L. R.; FREIRE, M.G.M.; SILVA, M.B; COELHO, L.C. Insecticidal action of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotes subfasciatus* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology**, v. 146, n. 4, p. 486-498, 2007.

MACIEL, E.V.M.; ARAÚJO-FILHO, V.S.; NAKAZAWA, M. et al. Mitogenic activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes. **Biologicals**, v. 32, p. 57-60, 2004.

MARCHIORI, J. N. C. **Dendrologia das angiospermas: leguminosas**. Santa Maria: Ed. UFSM, 200 p. 1997.

MARQUES, L.L.R.; CERI, H.; MANFIO, G.P.; REID, D.M.; OLSEN, M.E. Characterization of biofilm formation by *Xylella fastidiosa* *in vitro*, **Plant Dis.**, n. 86, p. 633–638, 2002.

MARQUES, L.L.R.; DE BOER, S.H.; CERI, H.; OLSEN, M.E. Evaluation of biofilms formed by *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, **Phytopathology**, n. 93, p. S57, 2003.

MARTINELLI, G.; MORAES, M. A (orgs). **Livro vermelho da flora do Brasil** tradução Flávia Anderson, Chris Hieatt. - 1. ed. - Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013. 1100 p.

MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M.; CATELLANE, D.C.; DIAS, J.E. **Plantas Medicinais**. Editora Universidade/UFV, Viçosa, 2000.

MARTIUS, C. V. 178 *Apuleia praecox* Mart. Herbarium Florae Brasiliensis. **Flora 20 Beibl.**: v. 123, 1837.

MARTORANA, M.; ARCORACI, T.; RIZZA, L.; CRISTANI, M.; BONINA, F.P.; SAIJA, A. et al. In vitro antioxidant and in vivo photoprotective effect of pistachio (*Pistacia vera* L., variety Bronte) seed and skin extracts. **Fitoterapia**, v. 85, p. 41-48, 2013.

MARTZ, W. Plants with a reputation against snakebite. **Toxicon**, v. 30, p. 1131–1142, 1992.

MATTOS, N.F.; GUARANHA, J. **Contribuição ao estudo da grápia (*Apuleia leiocarpa*)**. Boletim Técnico 12. Porto Alegre: Instituto de Pesquisas de Recursos Naturais Renováveis “AP”, 25 p., 1983.

MAYHALL, C.G.; MEDOFF, G.; MARR, J.J. Variation in the susceptibility of strains of *Staphylococcus aureus* to oxacillin, cephalothin, and gentamicin. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 10, p. 707–12, 1976.

MEDEIROS, P.; ALMEIDA, A.; SILVA, T.; ALBUQUERQUE, U. Pressure Indicators of Wood Resource Use in an Atlantic Forest Area, Northeastern Brazil. **Environmental Management**, v. 47, n. 3, p. 410-424, 2011.

MELO, C.M.L.; CASTRO, M.C.; OLIVEIRA, A.P. et al. Immunomodulatory response of Cramoll 1,4 lectin on experimental lymphocytes. **Phytotherapy Research**, v. 24, p. 1631-1636, 2010.

MENALE, B.; CASTRO, O.; CASCONI, C.; MUOIO, R. Ethnobotanical investigation on medicinal plants in the Vesuvio National Park (Campania, Southern Italy). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 192, p. 320-349, 2016. doi: 10.1016/j.jep.2016.07.049

MENTZ, L.A.; LUTZEMBERGER, L.C.; SCHENKEL, E.P. Da flora medicinal do Rio Grande do Sul: notas sobre a obra de D'Ávila (1910). **Caderno de Farmácia**, v. 13, n. 1, p. 25-48, 1997.

MITAINE, C. personal communication. Laboratoire de Pharmacognosie UPRESA 6013 CNRS, Centre de Recherche en Physico-chimie et Biotechnologies, Moulin de la Housse-BP 1039-51687 Reims cedex 2-France, 1998.

MITAINE-OFFER, A. C.; HORNEBECK, W.; SAUVAIN, M.; ZÈCHES-HANROT, M. Tripterpenes and Phytosterols as Human Leucocyte Elastase Inhibitors. **Plant Med.**, v. 68, p. 930-932, 2002.

MONTEIRO, J.M.; ALBUQUERQUE, U.P.; LINS-NETO, E.M.F.; ARAÚJO, E.L.; AMORIM, E.L.C. Use patterns and knowledge of medicinal species among two rural communities in Brazil's semi-arid northeastern region. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, p. 173–183, 2006.

MORAES, C. S.; OLIVEIRA-JUNIOR, F.O.R.; MASSON, G.; REBELLO, K.M. et al. Série em biologia celular e molecular - Métodos experimentais no estudo de proteínas. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, ed. 1, 84 p., 2013.

MOREIRA, R. A.; CASTELO-BRANCO, C.C; MONTEIRO, A.C. et al. Isolation and partial characterization of a lectin from *Artocarpus incisa* L. seeds. **Phytochemistry**, v. 47, n. 7, p. 1183-1188, 1998.

MORENO, F. B. M. B. Estudos estruturais de uma lectina presente em sementes de *Lotus tetragonolobus*. Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. São José do Rio Preto, 119 f., 2008.

MONROE, D. Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms. **PLoS Biol.**, v. 5, n. 11:e307, 2007.

MOTRAN, C.C.; MOLINDER, K.M.; LIU, S.D.; POIRIER, F.; MICELI, M.C. Galectin-1 functions as a Th2 cytokine that selectively induces Th1 apoptosis and promotes Th2 function. **Eur J Immunol.**, n. 38, p. 3015–3027, 2008.

MOURA, R.M.; QUEIROZ, A.F.; FOOK, J.M. et al. CvL, a lectin from the marine sponge *Cliona varians*: Isolation, characterization and its effects on pathogenic bacteria and *Leishmania* promastigotes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A, Molecular & Integrative Physiology**, v. 145, p. 517-523, 2006.

MUELLER-HARVEY, I. Analysis of hydrolysable tannins. **Anim Feed Sci Technol**, v. 91, p. 3–20, 2001.

MUKHTAR, M.H.; ANSARI, S.H.; ALI, M.; WANI, F.A. Antimicrobial activity of *Betula pendula*. **Hamdard Med.**, v. 45, p. 41–43, 2002.

MUÑOZ, V.; SAUVAIN, M.; BOURDY, G.; CALLAPA, J. et al. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach: Part I. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Chacobo Indians. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 69, n 2, p. 127-137, 2000.

MURI, E. M. F. Proteases virais: importantes alvos terapêuticos de compostos peptídomiméticos. **Quím. Nova**, v. 37, n. 2, p. 308-316, 2014.

NAEEM, A.; AHMAD, E.; ASHRAF, M.T.; KHAN, R.H. Purification and characterization of mannose/glucose-specific lectin from seeds of *Trigonella foenumgraecum*. **Biochemistry (Mosc)**, v. 72, p. 44-48, 2007a.

NAEEM, A.; SALEEMUDDIN, M.; KHAN, R.H. Glycoprotein targeting and other applications of lectins in biotechnology. **Curr. Prot. Pept. Sci.**, v. 8, p. 261–271, 2007b.

NASCIMENTO, C.O.; COSTA, R.M.P.B.; ARAÚJO, R.M.S.; CHAVES, M.E.C. et al. Optimized extraction of a lectin from *Crataeva tapia* bark using AOT in isooctane reversed micelles. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 779–782, 2008.

NASCIMENTO, G.G.F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P.C.; SILVA, G.L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria, **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 4, p. 247–256, 2000.

NELSON, D. L. **Princípios de bioquímica de Lehninger** [recurso eletrônico] / David L. Nelson, Michael M. Cox; [tradução: Ana Beatriz Gorini da Veiga ... et al.]; revisão técnica: Carlos Termignoni ... [et al.]. – 6. ed. – Dados eletrônicos. – Porto Alegre: Artmed, 2014.

NEUTSCH, L.; PLATTNER, V.E.; POLSTER-WILDHOFEN, S.; ZIDAR, A. et al. Lectin mediated biorecognition as a novel strategy for targeted delivery to bladder cancer. **J Urol.**, v. 186, p. 1481–1488, 2011.

NICOLOSO, F. T.; ZANCHETTI, F.; GARLET, A.; FOGAÇA, M.A.F. Exigências nutricionais da grábia (*Apuleia leiocarpa* Vog. Macbride) em solo Podzólico vermelho amarelo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.29, n.2, p.225-231, 1999.

NICOLSON, G.L. The interactions of lectins with animal cell surfaces. **International Review of Cytology**, 39, 89-190, 1974.

NISHIMURA, C.; DYSON, H.J.; WRIGHT, P.E. Identification of native and non-native structure in kinetic folding intermediates of apomyoglobin. **J Mol Biol.** v. 355, p. 139-156, 2006.

NISHIUMI, S.; MIYAMOTO, S.; KAWABATA, K.; OHNISHI, K.; MUKAI, R.; MURAKAMI, A.; ASHIDA, H.; TERAOKA, J. Dietary flavonoids as cancer preventive and therapeutic biofactors. **Front. Biosci.**, v. 3, p. 1332-1362, 2011.

NOFERI, M.; MASSON, E.; MERLIN, A.; PIZZI, A.; DEGLISE, X. Antioxidant characteristics of hydrolysable and polyflavonoid tannins: An ESR kinetics study. **J Appl Polymer Sci**, v. 63, p. 475–482, 1997.

NOLTE, S.; DAMASIO, D.D.C.; BAREA, A.C. et al. BJcuL, a lectin purified from *Bothrops jararacussu* venom, induces apoptosis in human gastric carcinoma cells accompanied by inhibition of cell adhesion and actin cytoskeleton disassembly. **Toxicon**, v. 59, p. 81-85, 2012.

NOVICK, R. P. Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. **Mol. Microbiol.**, v. 48, p. 1429–1449, 2003.

NUNES, E. S.; SOUZA, M.A.; VAZ, A.F. et al. Purification of a lectin with antibacterial activity from *Bothrops leucurus* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B, Biochemistry and Molecular Biology**, v. 159, p. 57-63, 2011.

NUNES, E. S.; SOUZA, M.A.; VAZ, A.F. et al. Cytotoxic effect and apoptosis induction by *Bothrops leucurus* venom lectin on tumor cell lines. **Toxicon**, v. 59, p. 667-671, 2012.

OJALA, T.; REMES, S.; HAANSUU, P.; VUORELA, H. et al. Antimicrobial activity of some coumarin containing herbal plants growing in Finland. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, p. 299–305, 2000.

OKUDA, T. Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. **Phytochemistry**, v. 66, p. 2012–2031, 2005.

OLA, M.S.; TABISH, M.; KHAN, F.H.; BANU, N. Purification and some properties of galectin-1 derived from water buffalo (*Bubalus bubalis*) brain. **Cell Biology International**, v. 31, p. 578-85, 2007.

OLIVEIRA, C.F.R.; LUZ, L.A.; PAIVA, P.M.G. et al. Evaluation of seed coagulant *Moringa oleifera* lectin (cMoL) as a bioinsecticidal tool with potential for the control of insects. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 498-504, 2011.

OLIVEIRA, M.D.L.; ANDRADE, C.A.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. et al. Purification of a lectin from *Eugenia uniflora* L. seeds and its potential antibacterial activity. **Letters in Applied Microbiology**, v. 46, p. 371-376, 2008.

OLIVA, M.L.V.; SOUZA-PINTO, J.C.; BATISTA, I.F.C.; ARAUJO, M.S.; SILVEIRA, V.F.; AUERSWALD, E.A.; MENTELE, R.; ECKERSKORN, C.; SAMPAIO, M.U.; SAMPAIO, C.A.M. *Leucaena leucocephala* serine proteinase inhibitor: Primary structure and action on blood coagulation, kinin release and rat paw edema Dedicated to Prof. Hans Neurath. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1477, p. 64–74, 2000.

O'TOOLE, G.A.; KOLTER, R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. **Molecular Microbiology**, v. 30, p. 295-304, 1998.

O'TOOLE, G.; KAPLAN, H.B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development, **Annu. Rev. Microbiol.** n, 54, p. 49–79, 2000.

OTTO, M. Staphylococcal biofilms. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.** v. 322, p. 207–228, 2008.

OURTH, D.D.; NARRA, M.B.; CHUNG, K.T. Isolation of mannose-binding C-type lectin from *Heliothis virescens* pupae. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 335, p. 1085-1089, 2005.

PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. B. B. Purification and partial characterization of two lectina isoforms for *Cratylia mollis* Mart (Camaratu bean). **Appl. Biochem. Biotechnol.** v. 36, p.113-118, 1992.

PAIVA, P.M.G.; NAPOLEÃO, T.H.; SANTOS, N.D.L. et al. Plant compounds with *Aedes aegypti* larvicidal activity and other biological properties. In: LIONG, M.-T. (ed.). **Bioprocess Sciences and Technology**. New York: Nova Publishers Inc., pp. 271-296, 2011a.

PAIVA, P.M.G.; NAPOLEÃO, T.H.; SÁ, R.A.; COELHO, L.C.B.B. Insecticide activity of lectins and secondary metabolites. In: PERVEEN, F. (ed.). **Insecticides – Advances in Integrated Pest Management**. Rijeka: InTech, pp. 579-598, 2011b.

PANKEY, G. A.; SABATH, L. D. Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of gram-positive bacterial infections. **Clinical Infectious Diseases**, v.38, n. 6, p.864-870, 2004.

PARSEK, M.R.; SINGH, P.K. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis, **Ann Rev Microbiol**, v. 57, p. 677–701, 2003.

PATTO, M.C. V.; et al. Achievements and challenges in improving the nutritional quality of food legumes. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 34, n. 1–3, p. 105-143, 2015.

PATHAN, J.; MONDAL, S.; SARKAR, A.; CHAKRABARTY, D. Daboialectin, a C-type lectin from Russell's viper venom induces cytoskeletal damage and apoptosis in human lung cancer cells in vitro. **Toxicon**, v. 127, p. 11-21, 2017.

PAVITHRA, D.; DOBLE, M. Biofilm formation, bacterial adhesion and host response on polymeric implants-issues and prevention. **Biomedical Materials**, v. 3, p. 1-13, 2008.

PEDINI, V.; SCOCCO, P.; GARGIULO, A.M.; CECCARELLI, P. Carbohydrate histochemistry of lamb duodenum. **Acta Histochemica**, v. 103, p. 315-323, 2001.

PEREIRA, N.A.; PEREIRA, B.M.; DO NASCIMENTO, M.C.; PARENTE, J.P.; MORS, W.B. Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as snake venom antidotes; IV. Protection against jararaca venom by isolated constituents. **Planta Medica**, v. 60, p. 99-100, 1994.

PEREIRA, E.P.; RIBEIRO, P.R.; LOUREIRO, M.B.; DE CASTRO, R.D.; FERNANDEZ, L.G. Effect of water restriction on total phenolics and antioxidant properties of *Amburana cearensis* (Fr. Allem) A.C. Smith cotyledons during seed imbibition. **Acta Physiol Plant**, v.36, p. 1293-1297, 2014.

PESSOA-JÚNIOR, A.; KILIKIAN, B. V. Purificação de produtos biotecnológicos. Barueri: **Manole**, 440 p, 2005.

PETERSON, L.R.; SHANHOLTZER, C.J. Tests for bactericidal effects of antibacterial agents: technical performance and clinical relevance. **Clin Microbiol Rev**, v. 5 , p. 420-32, 1992.

PETERSON, L.R.; GERDING, D.N.; HALL, W.H.; SCHIERL, E.A. Medium-dependent variation in bactericidal activity of antibiotics against susceptible *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 13, p. 665-8, 1978.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**, v. 109, n. 2, p. 347-352, 1995.

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

PEUMANS, W. J.; ROUGÉ, P.; VAN DAMME, E. J. M. The tomato lectin consists of two homologous chitin-binding modules separated by an extensin-like linker. **Biochemical Journal**, v. 376, p. 717-724, 2003.

PICHERSKY, E.; GANG, D.R. Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective, **Trends Plant Sci**, v. 5, p. 439-445, 2000.

PONTES, C. A.; LIMA-E-BORGES, E. E.; BORGES, R. C.G.; SOARES, C. P. B. Mobilização de reservas em sementes de *Apuleia leiocarpa* (vogel) J.f. Macbr. (garapa) durante a embebição. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v.26, n.5, p. 593-601, 2002.

POPINIGIS, F. Fisiologia da semente. Brasília: **AGIPLAN**, 289 p., 1977.

POPOVA, M.P.; CHINOU, I.B.; MAREKOV, I.N.; BANKOVA, V.S. Terpenes with antimicrobial activity from Cretan propolis. **Phytochemistry**, v. 70, p. 1262–1271, 2009.

PRABHAKAR, J.; SENTHILKUMAR, M.; PRIYA, M.S.; MAHALAKSHMI, K.; SEHGAL, P.K.; SUKUMARAN, V.G. Evaluation of antimicrobial efficacy of herbal alternatives (Triphala and green tea polyphenols), MTAD, and 5% sodium hypochlorite against *Enterococcus faecalis* biofilm formed on tooth substrate: an in vitro study. **Journal of Endodontics**, v. 36, p. 83–86, 2010.

PRAUD-TABARIES, A.; DOMBROWSKY, L.; BOTTZEK, O.; BRIAND, J.; BLACHE, Y. Synthesis of a polyprenyl-type library containing 1,4-disubstituted-1,2,3-triazoles with anti-biofilm activities against *Pseudoalteromonas* sp. **Tetrahedron Letters**, v. 50, p. 1645–1648, 2009.

PRASAD, A.S.; BECK, F.W.J.; BAO, B. et al. Zinc supplementation decreases incidence of infections in the elderly: effect of zinc on generation of cytokines and oxidative stress. **Am J Clin Nutr.**, v. 85, n. 3, p. 837-44, 2007.

RASKO, D.A.; SPERANDIO, V. Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. **Nat Rev Drug Discov.**, v. 9, p. 117–28, 2010.

REEDER, N.J.; EKSTEDT, D.R. Study of the interaction of Concanavalin A with staphylococcal teichoic acids. **Journal of Immunology**, n. 106, p. 334-340, 1971.

REITZ, R.; KLEIN, R. M.; REIS, A. **Projeto Madeira do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: SUDESUL, 525p., 1988.

REYNOSO-CAMACHO, R.; DE MEJÍA, G. E.; LOARCA-PIÑA, G. Purification and acute toxicity of a lectin extracted from tepary bean (*Phaseolus acutifolius*). **Food and Chemical Toxicity**, v. 41, p 21-27, 2003.

RODRÍGUEZ, E.; WEST, J.E. International research on biomedicines from the tropical rain forest. **Interciencia**, v. 20, suppl. 3, p. 140-3. 1995. ISSN 0378-1844

RÜDIGER, H.; SIEBERT, H.C.; SOLÍS, D. et al. Medicinal chemistry based on the sugar code: fundamentals of lectinology and experimental strategies with lectins as targets. **Curr Med Chem.** v. 7, p. 389-416, 2000.

RÜDIGER, H.; GABIUS, H.J. Plant lectins: occurrence, biochemistry, functions and applications. **Glycoconj J.**, v. 18, p. 589-613, 2001.

- RÜDIGER, H.; GABIUS, H.J. The history of lectinology. In: Gabius H-J (ed) **The sugar code. Fundamentals of glycosciences**. Wiley, Weinheim, pp 261–268, 2009a.
- RUFINO, R.; LAPA-E-SILVA, J. R. Cellular and biochemical bases of chronic obstructive pulmonary disease. **J. Bras. Pneumol**, v. 32, n. 3, p. 241-8, 2006.
- RUPPELT, B. M.; PEREIRA, E.F. R.; GONÇALVES, L.C.; PEREIRA, N.A. Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as anti-snake venom: I. Analgesic and anti-inflammatory activities. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 86 (supl.2), p. 203-205, 1991.
- SÁ, N.C.; CAVALCANTE, T.T.; ARAÚJO, A.X. et al. Antimicrobial and antibiofilm action of casbane diterpene from *Croton nepetaefolius* against oral bacteria. *Arch Oral Biol* 57: 550–555, 2012.
- SÁ, R.A.; NAPOLEÃO, T. H.; SANTOS, N. D. L.; GOMES, F. S.; ALBUQUERQUE, A. C.; XAVIER, H. S.; COELHO, L. C. B. B.; BIEBER, L. W.; PAIVA, P. M. G. Induction of mortality on *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae) by *Myracrodruon urundeuva* heartwood lectin. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 62, p. 460-464, 2008.
- SÁ, R. A.; GOMES, F.S.; NAPOLEÃO, T.H. et al. Antibacterial and antifungal activities of *Myracrodruon urundeuva* heartwood. **Wood Science and Technology**, v. 43, p. 85-95, 2009a.
- SÁ, R.A.; SANTOS, N.D.; SILVA, C.S.; NAPOLEÃO, T.H.; GOMES, F.S. et al. Larvicidal activity of *Myracrodruon urundeuva* lectins on *Aedes aegypti*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C, Toxicology and Pharmacology**, v. 149, p. 300-306, 2009b.
- SALAŁA, M.; SOBCZAK, M.; FICHNA, J. Inhibition of proteases as a novel therapeutic strategy in the treatment of metabolic, inflammatory and functional diseases of the gastrointestinal tract. **Drug Discovery Today**, v. 18, n. 15–16, p. 708-715, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2013.03.004>.
- SAMPAIO, F.C; PEREIRA, M.S.; DIAS, C.S.; COSTA, V.C.; CONDE, N.C.; BUZALAF, M.A. In vitro antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits against oral pathogens. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 124, p. 289–294, 2009.
- SANTANA, G.M.S.; ALBUQUERQUE, L.P.; SIMÕES, D.A. et al. Isolation of lectin from *Opuntia ficus-indica* cladodes. **Acta Horticulturae**, v. 811, p. 281-286, 2009.
- SANTANA, G.M.S.; ALBUQUERQUE, L.P.; NAPOLEÃO, T.H. et al. Electrochemical potential of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin. **Bioelectrochemistry**, v. 85, p. 56-60, 2012.
- SATO, Y.; MORIMOTO, K.; HIRAYAMA, M.; HORI, K. High mannose-specific lectin (KAA-2) from the red alga *Kappaphycus alvarezii* potently inhibits influenza virus infection in a strain-independent manner. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 405, p. 291-296, 2011.

SANTI-GADELHA, T.; ALMEIDA-GADELHA, C.A.; ARAGÃO, K.S. et al. Purification and biological effects of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) seed lectin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 350, n. 4, p.1050-1055, 2006.

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

SANTOS, A.F.S.; LUZ, A.L.; ARGOLO, A.C.C. et al. Isolation of a seed coagulant *Moringa oleifera* lectin. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 504-508, 2009.

SANTOS, S.C.; MELLO, J.C.P. Taninos. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Simões, C.M.O., Guerra, M.P. et al. (Orgs.) 5 (edição, revisada, ampliada, primeira reimpressão – Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, p. 1096, 2004.

SARAIVA, A. M.; CASTRO, R. H. A.; CORDEIRO, R. P. et al. In vitro evaluation of antioxidant, antimicrobial and toxicity properties of extracts of *Schinopsis brasiliensi* Engl. (Anacardiaceae). **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 5, n.14, p.1724–1731, 2011.

SCHILLACI, D.; ARIZZA, V.; PARRINELLO, N.; DI STEFANO, V.; FANARA, S. et al. Antimicrobial and antistaphylococcal biofilm activity from the sea urchin *Paracentrotus lividus*. **J Appl Microbiol**, v. 108, p. 17–24, 2010.

SCHITO, A.M.; PIATTI, G.; STAUDER, M.; BISIO, A.; GIACOMELLI, E.; ROMUSSI, G.; PRUZZO, C. Effects of demethylfruticuline A and fruticuline A from *Salvia corrugate* Vahl. on biofilm production in vitro by multiresistant strains of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Enterococcus faecalis*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 2010. doi:10.1016/j.ijantimicag.2010.10.016

SCHNEIDER, C.D.; OLIVEIRA, A.R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **RBME**, v. 10, n. 10. p. 308-13, 2004.

SCHOFIELD. P.; MBUGUA. D.M.; PELL, A.N. Analysis of condensed tannins: a review. **Animal Feed Sci Technol**, v. 91, p. 21–40, 2001.

SCHWAB, W. Metabolome diversity: too few genes, too many metabolites? **Phytochemistry**, v. 62, p. 837-849, 2003.

SHAMI, N.J.I.E.; MOREIRA EAM. Licopeno como agente antioxidante. **Rev Nutr.**, v. 17, n. 2, p. 227-36, 2004. doi: 10.1590/S1415-52732004000200009

SHARON, N.; LIS, H. Legumes lectins – a large family of homologous proteins. **Faseb J**, v. 4, p. 3198-3208, 1990.

SHARON, N.; LIS, H. Carbohydrates in cell recognition. **Scientific American**, vol. 268, p. 82-88, 1993.

SHARON, N.; LIS, H. Lectins-proteins with a sweet tooth: Function in cell recognition. **Essays Biochemistry**, v. 30, p. 59-75, 1995.

SHARON, N.; LIS, H. The structural basis for carbohydrate recognition by lectins. In: Wu, ed. *The Molecular Immunology of Complex Carbohydrates-2*. Taiwan: **Kluwer Academic/Plenum Publishers**, p. 1-16, 2001.

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

SHERRIS, J.C. Problems in in vitro determination of antibiotic tolerance in clinical isolates. **Antimicrob Agents Chemother**, v, 30, p. 633-7, 1986.

SILVA, A.C.O.; SANTANA, E.F.; SARAIVA, A.M. et al. Which approach is more effective in the selection of plants with antimicrobial activity? **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 9, 2013.

SILVA, C.G.; MARINHO, M.G.V.; LUCENA, M.F.A.; COSTA, J.G.M. Ethnobotanical survey of medicinal plants in the caatinga area in the community of sitio Nazaré, Milagres, Ceará, Brazil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v.17, n.1, p.133-142, 2015.

SILVA, L. N.; TRENTIN, D. S.; ZIMMER, K. R.; TRETER, J. et al. Anti-infective effects of Brazilian Caatinga plants against pathogenic bacterial biofilm formation. **Pharmaceutical biology**, v. 53, n. 3, p. 464-468, 2015.

SILVA, M.D.C.; SÁ, R.A.; NAPOLEÃO, T.H. et al. Purified *Cladonia verticillaris* lichen lectin: Insecticidal activity on *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae). **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, p. 334-340, 2009.

SILVA, N. L. G.; FERREIRA, F. S.; COUTINHO, H. D. M.; ALVES, R. R. N. Zooterapicos utilizados em comunidades rurais do municipio de Sume, semiárido da Paraíba, Nordeste do Brasil, in **Zooterapia: Os Animais na Medicina Popular Brasileira**, Costa-Neto, E. M., Alves, R. R. N., Eds., Recife: NUPEEA, ed. 1, v. 2, p. 243-267, 2010.

SILVEIRA, G.P.F.; GESSER, J.C.; SÁ, M.M. Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. *Química Nova*, v. 29, n. 4, p.844-855, 2006.

SIMÕES, C. M. O. (Org.) et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: UFRGS, 1102 p., 2007. ISBN 9788570259271

SLIFKIN, M.; GIL, G.M. Identification of group C streptococcal antigen extracts with lectin-bound polystyrene particulates. **Journal of Clinical Microbiology**, n. 19, p. 83-84, 1984.

SMYTH, T.; RAMACHANDRAN, V.N.; SMYTH, W.F. A study of the antimicrobial activity of selected naturally occurring and synthetic coumarins, **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 33, p. 421–426, 2009.

SOL, F. G.; CAVADA, B.S., CALVETE, J. J. Crystal structures of *Cratylia floribunda* seed lectin at acidic and basic pHs. Insights into the structural basis of the pH-dependent dimer-tetramer transition. **Journal of Structural Biology**, v. 158, p. 1-9, 2007.

SOUSA, F.S.T.; LEWIS, G.P.; HAWKINS, J.A. **Kew Bulletin**, v. 65, n. 2, p. 225, 2010. doi:10.1007/s12225-010-9213-4

SOUZA, J.D.; SILVA, M.B.R.; ARGOLLO, A.C.C. et al. A new *Bauhinia monandra* galactose-specific lectin purified in milligram quantities from secondary roots with antifungal and termiticidal activities. **Intenational Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, p. 696-702, 2011.

SOUZA, L. A. G.; VARELA, V. P.; BATALHA, L. F. P. Tratamentos pré-germinativos em sementes florestais da Amazônia: VI – Muirajuba (*Apuleia leiocarpa* (Vog.) Macb. var. *molaris* SPR. ex BENTH.(LEGUMINOSAE). **Acta Amazônica**, v. 24, n1/2, p.81-90. 1994.

SPARG, S.G.; LIGHT, M.E.; VAN STADEN, J. Biological activities and distribution of plant saponins, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, p. 219–243, 2004.

SPILATRO, S. R.; COCHRAN, G.R.; WALKER, R.E. et al. Characterization of a new lectin of soybean vegetative tissues. **Plant Physiology**, v. 110, p. 825-834, 1996.

STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, D.G.; COSTERTON, J.W. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Review of Microbiology**, v. 56, p. 187-209, 2002.

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

SUTHERLAND, I.W. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. **Microbiology**, v. 147, p. 3–9, 2001a.

SUTHERLAND, I.W. The biofilm matrix—an immobilised but dynamic microbial environment. **Trends Microbiol.** v. 9, p. 222–227, 2001b.

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

TALHOUK, R.S.; KARAM, C.; FOSTOK, S.; EL-JOUNI, W.; BARBOUR, E.K. Antiinflammatory Bioactivities in Plant Extracts. **Journal of Medicinal Food**, n. 10, p. 1–10, 2007.

TAYLOR, P.C.; SCHOENKNECHT, F.D.; SHERRIS, J.C.; LINNER, E.C. Determination of minimum bactericidal concentrations of oxacillin for *Staphylococcus aureus*: influence and significance of technical factors. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 23, p.142–50, 1983.

TEIXEIRA, E.H.; NAPIMOGA, M.H.; CARNEIRO, V.A.; DE OLIVEIRA, T.M.et al. *In vitro* inhibition of Streptococci binding to enamel acquired pellicle by plant lectins. **J. Appl. Microbiol.**, v. 101, p. 111-116, 2006.

TERADA, T.; WATANABE, Y.; TATENO, H. et al. Structural characterization of a rhamnose-binding glycoprotein (lectin) from Spanish mackerel (*Scomberomorus niphonius*) eggs. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1770, n. 4, p. 617-629, 2007.

TIMOSHENKO, A.V.; CHERENKEVICH, S.N.; GABIUS, H.J. *Viscum album* agglutinin induced aggregation of blood cells and the lectin effects on neutrophil function. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 49, p. 153-158, 1995.

TRENTIN, D. S.; GIORDANI, R. B.; MACEDO, A. J. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate, **Revista Liberato**, v. 14, n. 22, p. 113-238, 2013.

VAZ, A.F.M.; COSTA, R.M.P.B.; MELO, A.M.M.A. et al. Biocontrol of *Fusarium* species by a novel lectin with low ecotoxicity isolated from *Sebastiania jacobinensis*. **Food Chemistry**, v. 119, p. 1507-1513, 2010.

VAN DAMME, E. J. M.; PEUMANS, W.J.; BARRE, A.; ROUGE, P. Plant Lectins: A Composite of Several Distinct Families of Structurally and Evolutionary Related Proteins with Diverse Biological Roles. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 17, n. 6, p. 575-592, 1998.

VISIOLI, F.; DE-LA-LASTRA, C. A.; ANDRES-LACUEVA, C.; AVIRAM, M. Polyphenols and human health: a prospectus. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v. 51, p. 524-546, 2011.

VOGEL, T.H. De Caesalpinieis Brasiliae. *Leptolobium ? leiocarpum*. **Linnaea**, v. 11, p. 393, 1837.

VU, B.; CHEN, M.; CRAWFORD, R. J.; IVANOVA, E. P. Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. **Molecules**, v. 14, p. 2535–2554, 2009.

VUONG, C., KOCIANOVA,S.; VOYICH, J. M.; YAO,Y.; FISCHER, E. R.; DELEO, F. R.; OTTO, M. A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm

formation, immune evasion, and virulence. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 54881– 54886, 2004. (Erratum, 280:12064, 2005)

VUUREN, S.F.V. Antimicrobial activity of South African medicinal plants. **J Ethnopharmacol**, v. 119, p. 462–472, 2008.

XIE, M.; HU, J.; LONG, Y.M., ZHANG, Z.L. et al. Lectin-modified trifunctional nanobiosensors for mapping cell surface glycoconjugates. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, p. 1311-1317, 2009.

XU, W.T.; WANG, X.W.; ZHANG, X.W. et al. A new C-type lectin (FcLec5) from the Chinese white shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. **Amino Acids**, v. 39, p. 1227-1239, 2010.

WANG, C. Z.; MEHENDALE, S. R.; CALWAY, T.; YUAN, C. S. Botanical flavonoids on coronary heart disease. **Am. J. Chin. Med.**, v. 39, p. 661- 671, 2011.

WANG, H.X., OOI, V.E.; NG, T.B.; CHIU, K.W.; CHANG, S.T. Hypotensive and vasorelaxing activities of a lectin from the edible mushroom *Tricholoma mongolicum*. **Pharmacology & Toxicology**, v. 79, n. 6, p. 318-323, 1996.

WANG, S.Y.; RAO, P.F. A leguminous trypsin-chymotrypsin inhibitor Limenin with antifungal activity from *Phaseolus limensis*. **Eur. Food Res. Technol.**, v. 231, p. 331–338, 2010. doi: 10.1007/s00217-010-1285-8.

WANG, W.; TAO, R.; TONG, Z.; DING, Y.; KUANG, R. et al. Effect of a novel antimicrobial peptide chrysophsin-1 on oral pathogens and *Streptococcus mutans* biofilms. **Peptides**, v. 2012, p. 212–219, 2012.

WHO: World Health Organisation, **The selection of essential drugs**. Second report of the WHO Expert Committee. WHO Technical Report Series, v. 641, p. 1–44, 1979.

WITITSUWANNAKUL, R.; WITITSUWANNAKUL, D.; SAKULBORIRUG, C. A lectin from the bark of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*). **Phytochemistry**, v. 47, n. 2, p. 183-187, 1998.

WROBLEWSKI, S.; BERESON, M.; KOPECKOVÁ, P.; KOPECEK, J. Potencial of lectin-N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide copolymerdrug conjugates for the tratament of pre-cancerous conditions. **Lournal of Controlled Release**, v. 74, p. 283-293, 2001.

WU, J. H.; SINGH, T.; HERP, A.; WU, A.M. Carbohydrate recognition factors of the lectin domains present in the Ricinus communis toxic protein (ricin). **Biochimie**, v. 88, n. 2, p. 201-217, 2006.

ZENTENO, E.; VÁZQUEZ, L.; CHÁVEZ, R. et al. Specificity of the isolectins from the plant cactus *Machaerocereus eruca* for oligosaccharides from porcine stomach mucin. **Glycoconjugate Journal**, v. 12, p. 699–706, 1995.

ZUANAZZI, J.A.S.; MONTANHA, J.A. Flavonóides. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Simões, C.M.O., Guerra, M.P. et al. (Orgs.) 5 ed., revisada, ampliada, primeira reimpressão – Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC, 2004.

APÊNDICE

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Screening of Caatinga plants as sources of lectins and trypsin inhibitors

José Héilton Vasconcelos Arcoverde^a, Aline de Souza Carvalho^a, Fernanda Pacífico de Almeida Neves^a, Bianca Paiva Dionízio^a, Emmanuel Viana Pontual^a, Patrícia Maria Guedes Paiva^a, Thiago Henrique Napoleão^{a,*}, Maria Tereza dos Santos Correia, Márcia Vanusa da Silva, and Maria das Graças Carneiro-da-Cunha

^a*Departamento de Bioquímica, CCB, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brasil.*

Abstract

Although it is one of the most threatened areas in the Earth, there are few studies on the biotechnological potential of the Caatinga. This work evaluated 36 extracts from 27 Caatinga plants for lectin and trypsin inhibitor activities. The presence of lectin was detected in 77.7% of samples by haemagglutinating assay. The highest values of specific haemagglutinating activity were found to extracts of leaves from *Mimosa lewesii*, *Bauhinia acuruana* and *Manilkara rufula* and of branches from *Myracrodruon urundeuva*. Trypsin inhibitor activity was detected in 63.9% of the tested extracts being strong inhibitory effect (> 70%) found in 11 samples. This work demonstrates that Caatinga is a potential source of bioactive plant proteins that can be isolated and studied for several applications. The biochemical prospecting of Caatinga is essential for collection of bioactive principles so as to add conservation value to the region.

Keywords: biochemical prospecting; Caatinga; lectin; plant proteins; protease inhibitor.

Experimental

Plant material

The plants were collected at several sites in the Vale do Catimbau National Park (*PARNA do Catimbau*) in Pernambuco, Brazil. Botanical specimens were identified at the Herbarium of the *Instituto Agrônômico de Pernambuco* (IPA), where a voucher for each species was deposited. The species studied are listed in Table S1 with their respective scientific names, common names in Portuguese, voucher numbers and uses.

Extracts and protein concentration

The aerial parts of plants (leaves, fruit), the bark of the stems and the roots were dried in an oven at 45 °C for 2-3 days. The dry material was ground into powder using a bench grinder. The powders were added to a 0.15 M NaCl solution at a ratio of 10% (w/v), under constant and gentle agitation for 4 h, at 4 °C or 28 °C. The mixtures were passed through filter paper and centrifuged (9,000 *g*, 4 °C, 10 min) and the supernatant corresponded to extracts. The extracts were then assessed for protein concentration and haemagglutinating and trypsin inhibitor activities. The estimation of protein concentration was carried out according to Lowry et al. (1951), using a standard curve of bovine serum albumin (BSA), with values between 31.25 and 500 µg/ml.

Haemagglutinating activity

The presence of lectins was determined in microtiter plates (Paiva & Coelho 1992) using a 2.5% (v/v) suspension of rabbit erythrocytes treated with glutaraldehyde (Bing et al. 1967). The haemagglutinating activity (HA) was determined by adding 50 µL of 0.15 M NaCl in all wells and 50 µL of the sample to be evaluated in the second well of the horizontal row, with successive dilutions until 1:2048 and disregarding the final 50 µL. Then 50 µL of the erythrocyte suspension were added to each well and the plate left to stand for 45 min at 28 °C. One haemagglutinating unit (titer⁻¹) was defined as the reciprocal of the highest dilution of the sample promoting full agglutination of erythrocytes. The specific HA corresponds to the ratio between titer and protein concentration in mg/mL.

Trypsin inhibitor activity

The inhibition of trypsin activity was evaluated according to Pontual et al. (2012) in microplates of 96 wells using 0.1 mg/mL of bovine trypsin in 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0), containing 0.02 M CaCl₂. The bovine trypsin (5 µl) was incubated (5 min, 37°C) with the extract (50 µl) in Tris-HCl pH 8.0 (150 µl). Subsequently, the synthetic substrate BApNA (N-benzoyl-arginine-p-nitroanilide), dissolved in dimethyl sulfoxide, was added (5 µl) and the mixture was incubated (30 min, 37 °C). The hydrolysis of the substrate was tracked by the measurement of absorbance at 405 nm. The inhibitory activity was determined by remaining hydrolytic activity and inhibition percentages were calculated as follows: % inhibition = 100 - [100 x (residual activity /activity in control)]. Assays were performed in triplicate. Inhibition effect was ranked as low (<30%), moderate (30-70%) and strong (>70%). Reaction blanks containing only substrate and/or extract were also performed.

2. References

- Agra MF, Baracho GS, Silva NK, Basílio IJLD, Coelho VPM. 2007a. Medicinal and poisonous diversity of the flora of “Cariri Paraibano”, Brazil. *Journal of Ethnopharmacology* 111:383–395.
- Agra MF, Freitas PF, Barbosa-Filho JM. 2007b. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Rev. Bras. Farmacogn.* 17:114–140.
- Alves JJA, Nascimento SS. 2010. Levantamento fitogeográfico das plantas medicinais nativas do cariri Paraibano. *Rev. Geogr. Acadêmica* 4:73-85.
- Bing DH, Weyand JG, Stavinsky AB. 1967. Hemagglutination with aldehyde-fixed erythrocytes for assay of antigens and antibodies. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 124:1166-1170.
- Braga R. 1976. Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará. Mossoró: ESAM.
- Ducke A. 1953. As leguminosas de Pernambuco e Paraíba. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 51: 417-461
- Ferraz JSF, Albuquerque UP, Meunier IMJ. 2006. Valor de uso e estrutura da vegetação lenhosa às margens do riacho Navio, Floresta, PE, Brasil. *Acta Bot. Bras.* 20:125-134.

- Foroughbakhch R, Haudt LA, Maiti RK, Rodriguez M, Hernandez-Pinheiro J, Baddi MH, Cespedes AE, Ponce-Moreno EE. 2000. Techniques of germination and growth potential of some fuelwood species in Northeastern Mexico. *Phyton* 69:17-22.
- Leal IR, Vicente A, Tabarelli M. 2003. Ecologia e conservação da Caatinga. Editora Universitária da UFPE. Herbivoria por caprinos na caatinga. p. 695-715.
- Loiola MIB, Paterno GBC, Diniz JA, Calada JF, Oliveira ACP. 2010. Leguminosae e seu potencial de uso em comunidades rurais de São Miguel do Gostoso – RN. *Rev. Caatinga* 23:59-70.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- Milano MS, Rizzi NE, Kaniaok VC. 2004. Princípios básicos de manejo e administração de áreas silvestres. Curitiba: Departamento de Recursos Naturais Renováveis, Instituto de Terras, Cartografia e Florestas.
- Moraes LG, Alonso AM, Oliveira-Filho EC. 2011. Plantas medicinais no tratamento do câncer: uma breve revisão de literatura. *Universitas: Ciências da Saúde*, 9:77-99.
- Moreira DL, Guarim-Neto G. 2009. Usos múltiplos de plantas do cerrado: um estudo etnobotânico na comunidade sítio Pindura, Rosário Oeste, Mato Grosso, Brasil. *Polibotânica* 27:159-190.
- Paiva PMG, Coelho LCBB. 1992. Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* Mart (camaratu bean). *Appl. Biochem. Biotechnol.* 36:113–118.
- Pereira SC, Gamarra-Rojas G, Lima M, Gallindo FAT. 2003. Plantas úteis do Nordeste do Brasil. Recife: Centro Nordestino de Informações sobre Plantas/Associação Plantas do Nordeste.
- Pinos-Rodríguez JM, Aguirre-Rivera JR, Mellado M, García-López JC, Álvarez-Fuentes G, Méndez-Villazana JC. 2007. Chemical and digestibility characteristics of some woody species browsed by goats in Central Mexico. *J. Appl. Animal Res.* 32: 149-153.
- Pontual EV, Napoleão TH, de Assis CR, Bezerra RS, Xavier HS, Navarro DMAF, Coelho LCBB, Paiva PMG. 2012. Effect of *Moringa oleifera* flower extract on larval trypsin and acetylcholinesterase activities in *Aedes aegypti*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 70:135-152.

- Queiroz CRAA, Morais SAL, Nascimento EA. 2002. Caracterização dos taninos da aroeira-preta (*Myracrodruon urundeuva*). Rev. Árvore 26:485-492.
- Ramírez RG, González-Rodríguez H, Ramírez-Orduña R, Cerrillo-Soto MA, Juárez-Reyes AS. 2006. Seasonal trends of macro and micro minerals in 10 browse species that grow in northeastern Mexico. Animal Feed Sci. Technol. 128:155–164.
- Salin TC. 2010. Caracterização de sistemas de produção no município de Ibimirim, região semiárida de Pernambuco: as bases para o planejamento agroflorestal. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco.
- Silva TMS, Lins ACS, Costa DA, Cavalcante JMS, Matias WN, Souza MFV, Filho RB. 2006. Constituintes químicos e atividade antioxidante de *Sida galheirensis* Ulbr. (Malvaceae). Quim. Nova 29:1250-1254.
- Silva VA, Andrade LHC. 2004. O significado cultural das espécies botânicas entre indígenas de Pernambuco: o caso Xucuru. Biotemas 17:79-94.
- Souza, M. A. 2011. Fitossociologia em áreas de caatinga e conhecimento etnobotânico do murici (*Byrsonima gardneriana* A. Juss.), Semiárido Alagoano. Areia: UFPB/CCA.
- Tokarnia CH, Peixoto PV, Dobereiner L. 1994. Intoxicação experimental por *Piptadenia macrocarpa* (Leg. Mimodoideae) em bovinos. Pesq. Vet. Bras. 14:57-63.

Table S1. Species collected in the Vale do Catimbau National Park (Caatinga of Pernambuco).

Scientific name	Common name (in Brazil)	Voucher	Ethnobotanical uses
<i>Abarema cochliacapos</i>	----		----
<i>Anadenanthera colubrina</i> var. <i>cebil</i>	Angico	IPA 84.039	Timber, fuel, animal feed, human food, construction, veterinary and technological use
<i>Apuleia leiocarpa</i>	Garapa, grápia	IPA 84.886	Timber, fuel, animal feed, ornamental use, reforestation
<i>Bauhinia acuruana</i>	Mororó	IPA 84.042	Timber, forrage, fuel
<i>Buchenavia capitata</i>	Tanimbuca		Landscaping
<i>Byrsonima gardneriana</i>	Murici	IPA 84.882	Fuel, veterinary use
<i>Chamaecrista desvauxii</i>	Camponesa	IPA 84.064	Fuel
<i>Commiphora leptophloeos</i>	Amburana	IPA 84.037	Timber
<i>Dioclea grandiflora</i>	Mucunã-de- caroço	IPA 84.057	Timber, animal feed, veterinary and medicinal use
<i>Eugenia brejoensis</i>	Cutia	IPA 84.033	----

<i>Harpochilus neesianus</i>	-----	IPA 84.879	-----
<i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>courbaril</i>	Jatobá	IPA 84.888	Fuel
<i>Ipomea brasiliana</i>	----	IPA 84.883	----
<i>Jacaranda rugosa</i>	Jacarandá	IPA 84.881	Landscaping
<i>Manilkara rufula</i>	Maçaranduba	IPA 84.889	Fuel, animal feed, veterinary use
<i>Mimosa lewesii</i>	----	IPA 84.053	----
<i>Myracrodruon urundeuva</i>	Aroeira preta	IPA 84.059	Timber, fuel, animal feed, landscaping, veterinary & apicultural use
<i>Myroxylum peruiferum</i>	Cabreúva	IPA 84.110	Timber, fuel, construction, perfume, ornamental use
<i>Ouratea blanchetiana</i>	-----	IPA 84.044	-----
<i>Parkinsonia aculeata</i>	Acácia, turco, junco	IPA 84.113	Fuel, reforestation, landscaping, apicultural & ornamental use

<i>Piptadenia viridiflora</i>	Espinheiro, icarapé	IPA 84.058	Fuel, animal feed
<i>Pityrocarpa moniliformis</i>	Canzenzo, quipembe	IPA 84.048	Timber, forrage, animal feed, human food, apicultural & medicinal use
<i>Poincianella microphylla</i>	Catingueira	IPA 84.880	Forrage, fuel, animal feed, human food, construction, medicinal & technological use
<i>Senna splendida</i>	Fedegoso grande	IPA 84.040	Fuel
<i>Sida galheirensis</i>	Malva branca	IPA 84.078	Medicinal use
<i>Sideroxylum obtusifolium</i>	Umbuzeiro, quixaba	IPA 84.076	Timber, fuel, veterinary use
<i>Stigmaphyllon paralias</i>	Amarelinho	IPA 84.090	-----

References: Agra et al. 2007a,b; Ducke 1953; Braga 1976; Tokarnia et al. 1994; Queiroz et al. 2002; Leal et al. 2003; Pereira et al. 2003; Milano et al. 2004; Silva et al. 2004; Foroughbakhch et al. 2005; Ferraz et al. 2006; Ramírez et al. 2006; Silva et al. 2006; Pinos-Rodríguez et al. 2007; Moreira & Guarim-Neto 2009; Alves & Nascimento 2010; Loiola et al. 2010; Salin 2010; Moraes et al. 2011; Souza 2011.