



**JAYRA DANTAS DE SOUZA**

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO  
PARCIAL DA LECTINA DE RAÍZ DE  
*Bauhinia monandra* (BmoRL)**

**Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Luana Cassandra B. B. Coelho**  
**Co-orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Adriana Carla C. M. Argolo**

**RECIFE -2007**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
MESTRADO EM BIOQUÍMICA**

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA  
LECTINA DE RAIZ DE *Bauhinia monandra* (BmoRL)**

**Jayra Dantas de Souza**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Luana Cassandra B.B. Coelho  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Adriana Carla C.M. Argolo**

**Recife – 2007**

Souza, Jayra Dantas de

Purificação e caracterização parcial da lectina de raiz de *Bauhinia monandra* (BmoRL). – Recife: A Autora, 2007.

v, 47 p.: il.

Inclui anexos

Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – UFPE. CCB

1. Lectina 2. *Bauhinia monandra* 3. atividade anti-fúngica

I. Título

577.112

CDU (2<sup>a</sup>. Ed.)

UFPE

572.6

CDD (22<sup>a</sup>. Ed.)

CCB – 2007 – 141

Ata da defesa de dissertação da Mestranda **Jayra Dantas de Souza**, realizada em 27 de fevereiro de 2007, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Às 14:05 minutos do dia 27 de fevereiro de 2007, foi aberto, no Auditório Prof. Marcionilo Lins - Depto. de Bioquímica/UFPE, o ato de defesa de dissertação da mestranda **Jayra Dantas de Souza**, aluna do Curso de Mestrado em Bioquímica/CCB/UFPE. Iniciando os trabalhos a Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva, Vice-Coordenadora do Curso supra citado, fez a apresentação da aluna, de sua orientadora, Profa. Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho, da sua Co-Orientadora, a Profa. Dra. Adriana Carla Cavalcante Malta Argolo, Pesquisadora CCB/UFPE, e da Banca Examinadora composta pelos professores doutores: Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho, na qualidade de Presidente, Maria Tereza dos Santos Correia, Patrícia Maria Guedes Paiva, os três do Depto. de Bioquímica, e a Profa. Dra. Rita de Cássia Moura do Nascimento, do Instituto de Ciências Biológicas - Universidade de Pernambuco. Após as apresentações, a Sra. Presidente convidou a aluna para a apresentação de sua dissertação intitulada: "**Purificação e caracterização parcial da lectina de raiz de *Bauhinia monandra* (BmoRL)**", e informou que de acordo com o Regimento Interno do Curso, a candidato disporia de até 50 (cinquenta) minutos para apresentação do trabalho e o tempo de arguição para cada examinador, juntamente com o tempo gasto pela aluna para responder às perguntas seria de 30 (trinta) minutos. A aluna procedeu à explanação e comentários acerca do tema em 35 (trinta e cinco) minutos. Após a apresentação da mestranda, a Sra. Presidente convidou a Banca Examinadora para ocupar seus lugares e passou a palavra ao primeiro examinador, a Profa. Dra. Rita de Cássia Moura do Nascimento, em seguida para a Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva, e finalmente para a Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia, os quais agradecerem o convite, fizeram alguns comentários e sugestões. Ao final de suas respectivas arguições, os referidos professores deram-se por satisfeitos. Em seguida, a Sra. Presidente usou da palavra para tecer alguns comentários, agradecer à Banca Examinadora e parabenizar a candidata. Finalmente, a sessão foi suspensa para proceder ao julgamento pela Banca Examinadora, a qual se reuniu na Secretaria do Curso. Após alguns comentários, a Banca decidiu, por unanimidade, conceder a menção "**Aprovada com Distinção**". Nada mais havendo a tratar, lavrei a presente ata que vai assinada por mim, Secretário, e demais membros da Banca Examinadora. Recife, 27 de fevereiro de 2007.

José Manoel de Sousa

Patrícia Maria Guedes Paiva  
Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho  
Adriana Carla Cavalcante Malta Argolo  
Rita de Cássia Moura do Nascimento  
Maria Tereza dos Santos Correia

**Jayra Dantas de Souza**

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA  
LECTINA DE RAIZ DE *Bauhinia monandra* (BmoRL)**

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

Aprovada por: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Fevereiro – 2007

A Deus, fonte de Fé e Luz na minha vida; aos meus pais, Ednice e Luiz Gonzaga, por serem meu alicerce e exemplo de vida; aos meus irmãos, Ludnice, Ludnise e Júnior por sempre me apoiar em todos os momentos da minha vida; A Cláudio pelo apoio, paciência e amor.

Ainda que eu tenha o dom de profetizar e conheça todos os mistérios e toda a ciência; ainda que eu tenha fé, a ponto de transportar montes, se não tiver amor nada serei.

**I CORÍNTIOS 13: 2**

## AGRADECIMENTOS

Em especial a Deus, por iluminar a minha vida em todos os momentos, dando-me forças para superar todos os momentos difíceis e por ser a fonte de todas as bênçãos alcançadas;

À Profa. Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho, pela orientação científica, confiança, oportunidade, aconselhamentos e o apoio prestado nos momentos em que precisei de sua fé, força e amizade, lhe sou muito grata;

À Profa. Dra. Adriana Carla C.M. Argolo, pela orientação, incentivos, atenção e amizade;

Às professoras Maria Tereza S. Correia, Patrícia M. G. Paiva e Vera Lúcia Menezes, pela atenção, apoio e confiança;

À Maria Barbosa Reis da Silva, pelo apoio científico, paciência e inestimável amor e amizade;

A Sr. João Virgínio, pela atenção, carinho, confiança e valiosa amizade;

À Neide, Miron, Albérico, Djalma, Sr. Ademar, D. Helena e demais funcionários do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco, pelo apoio, todo carinho, atenção e auxílio concedido sempre que solicitado;

A todos que fazem o Laboratório de Glicoproteínas do Departamento de Bioquímica da UFPE, pelo companheirismo e amizade formada neste período de convivência; em especial a Flávia, Regina, Amanda, Mariana, Lidiane, Gisele, Ana Carina, Thiago, Sandro, Rafael, Neila, Rodrigo, Cyntia, Vanessa, Nataly, Francis e Mariana Cristina;

Aos queridos companheiros e amigos Michele, José Roberto, Roberto, Romero e Fernando pela ajuda, atenção e toda paciência e amizade;

À Lucíola, Juliene, Fernanda, Paula pelo companheirismo e amizade;

À minhas amigas Érika, Chirleany, Flávia, Alessandra, Renata e Danielle, com as quais compartilhei momentos difíceis, mais também muitas alegrias jamais esquecidas;

À minha maravilhosa família, em especial aos meus pais Ednice e Luiz Gonzaga, por toda dedicação e amor; aos meus irmãos Ludnice, Ludnise e Júnior, por todos os bons e também momentos difíceis vividos, amo muito todos vocês e minhas alegrias nada mais são que: reconhecimento e o sucesso de todas as nossas lutas incansáveis por melhorias. Vocês são o que de mais valioso estimo;



À minha linda e adorada sobrinha Letícia, pela grande alegria que encontro em você, ao meu cunhado Sérgio Thiago, por sua atenção e amizade;

A meu grande amigo da Faculdade de Formação de Professores de Garanhuns – FFPG - UPE, Prof. Manuel de Souza Barros que foi a pessoa que me acompanhou e incentivou a fazer o mestrado em Bioquímica, muito obrigada por sua ajuda, apoio e amizade;

A Claudio Albuquerque das Neves, que fez e faz inquestionáveis esforços dedicados a minha pessoa e que sou eternamente grata pela sua existência em minha vida e pelos muitos momentos que passamos juntos, com toda certeza, esta vitória é fruto de uma linda caminhada desenvolvida com você;

A todos que contribuíram por mais esta conquista em vida.

## SUMÁRIO

	I
SUMÁRIO	I
LISTA DE FIGURAS	II
LISTA DE TABELAS	III
RESUMO	IV
ABSTRACT	V
CAPÍTULO 1	
1 INTRODUÇÃO	01
1.1 Lectinas	01
1.1.1 Histórico e distribuição na natureza	01
1.1.2 Detecção e especificidade	02
1.1.3 Classificação	03
1.1.4 Purificação	05
1.1.5 Caracterização	06
1.1.6 Aplicações biotecnológicas e importância fisiológica	07
1.2 Imobilização de Proteínas	08
1.3 Fungos	09
1.4 O gênero <i>Bauhinia</i> e a espécie <i>B. monandra</i>	10
CAPÍTULO 2	
2 JUSTIFICATIVA	11
CAPÍTULO 3	
3 OBJETIVOS	12
3.1 Objetivo geral	12
3.2 Objetivos específicos	12
CAPÍTULO 4	
4 ARTIGO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO <i>BIORESOURCE TECHNOLOGY</i>	13
4.1 Título: A NOVEL <i>Bauhinia monandra</i> GALACTOSE-SPECIFIC LECTIN PURIFIED IN MILLIGRAM QUANTITIES FROM SECONDARY ROOTS	14
CAPÍTULO 5	
5 CONCLUSÕES	36
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
7. ANEXOS	

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO

Figura 1. Representação esquemática da aglutinação de eritrócitos por lectinas.	02
Figura 2. Inibição da aglutinação de eritrócitos por lectinas em presença de carboidratos.	02
Figura 3: Aspectos de flores e folhas de <i>Bauhinia monandra</i> .	11

### ARTIGO: A NOVEL *Bauhinia monandra* GALACTOSE-SPECIFIC LECTIN PURIFIED IN MILLIGRAM QUANTITIES FROM SECONDARY ROOTS

Figure 1. Guar gel affinity chromatography of F 0-60% (P2) eluted with 0.05 M D-Galactose	29
Figure 2. SDS-PAGE of purified BmoRL	30
Figure 3. PAGE to basic protein (A) from purified BmoRL	31
Figure 4. Specific hemagglutinating activity (SHA) of BmoRL, at different temperatures.	32
Figure 5. Effect of pH on BmoRL specific hemagglutinating activity (SHA)	33
Figure 6. Inhibitory activity from <i>F. solani</i> mycelium growth with BmoRL	34
Figure 7. Antifungal activity of BmoRL toward <i>Fusarium</i> species	35

## LISTA DE TABELAS

### INTRODUÇÃO

Tabela 1. Especificidade de ligação a carboidratos das lectinas de plantas 04

### **Artigo: A NOVEL *Bauhinia monandra* GALACTOSE-SPECIFIC LECTIN PURIFIED IN MILLIGRAM QUANTITIES FROM SECONDARY ROOTS**

Table 1. Purification of *Bauhinia monandra* root lectin 28

## RESUMO

Lectinas, proteínas que reconhecem específica e reversivelmente carboidratos, podem ser purificadas por cromatografia de afinidade. O gênero *Bauhinia* (Fabaceae) inclui espécies nativas ou introduzidas, usadas no tratamento de diabetes. A atividade hemaglutinante (AH) detectada em várias espécies de *Bauhinia* está associada à presença de lectinas. Uma lectina específica para galactose (BmoLL) foi previamente purificada em folhas de *B. monandra* e disponível em quantidades de miligramas (Coelho & da Silva, *Phytochem. Anal.*, 11, 1-6, 2000). Este trabalho teve por objetivo isolar em elevada pureza uma lectina de raiz de *B. monandra* (BmoRL), bem como a avaliação de sua atividade antimicrobiana frente a fungos fitopatogênicos do gênero *Fusarium*. Raíz secundária de *B. monandra* foi extraída com tampão citrato-fosfato 10 mM, pH 6,5 (10 %, p/v), contendo NaCl 0,15 M (tampão selecionado), por 16 h, a 4 °C. O fracionamento salino foi realizado com sulfato de amônio (F 0-60%) durante 4 h, em temperatura ambiente; o precipitado foi dialisado em água destilada, seguido de tampão selecionado. Cromatografia em coluna de gel de guar foi efetuada para purificar a lectina; o suporte foi equilibrado com tampão selecionado e a eluição da proteína foi procedida com galactose 0,05 M em tampão selecionado. Eletroforese em gel de poliácridamida (SDS-PAGE, 12%, p/v) revelou a pureza de BmoRL; BmoRL é uma glicoproteína, como detectado pela coloração com reagente de Schiff. BmoRL apresentou elevada AH específica (AHE) com eritrócitos de coelho (17.430) e não foi estimulada em presença de íons ( $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Mg}^{+2}$ ). BmoRL revelou melhor AHE com os tampões citrato fosfato 10 mM em pH 7,0, contendo NaCl 0,15 M e fosfato de sódio 10 mM em pH 6,5 e 7,5. Ensaio em diferentes temperaturas revelou que BmoRL perdeu a atividade a 70 °C. BmoRL foi totalmente inibida por D(+)-galactose e D(+)-raffinose; asocaseína, ovoalbumina e asialofetuína inibiram parcialmente a AH da lectina. Sob condições desnaturantes e redutoras, BmoRL apresentou uma única banda glicosilada, com aparente massa molecular de 26 kDa. BmoRL mostrou atividade contra fungos fitopatogênicos, especialmente, *F. solani* com inibição do crescimento de 30%. O perfil cromatográfico de BmoRL indica que uma lectina pode ser purificada de raízes secundárias de *B. monandra* com gel de guar, em quantidades de miligramas, com atividade antifúngica.

**Palavras chaves:** lectina, *B. monandra*, atividade anti-fúngica;

## ABSTRACT

Lectins, proteins that recognize carbohydrates specifically and reversibly, can be purified by affinity chromatography. The genus *Bauhinia* (Fabaceae) includes native or introduced species that have been used in the treatment of diabetes. Hemagglutinating activity (HA) species of *Bauhinia* detected in various is associated with lectin presence. A galactose-specific leaf lectin (BmoLL) has been previously purified from *B. monandra* and available in milligram quantities (Coelho & da Silva, *Phytochem. Anal.*, 11, 1-6, 2000). The aim of this work was the isolation in highest purity of *B. monandra* root lectin (BmoRL), as well as, the evaluation the antifungal activity toward phytopathogenic fungi of the *Fusarium* genus. Secondary root powder of *B. monandra* was extracted in 10 mM citrate-phosphate buffer, pH 6.5 (10 %, p/v), containing 0.15 M sodium chloride (selected buffer), by 16 h at 4 °C. The saline fractionation was performed with ammonium sulphate (F 0-60%), by 4 h at room temperature; the precipitate was dialysed against distilled water, followed by the selected buffer. Chromatography on guar gel column was used to purify the lectin; the matrix was equilibrated with selected buffer and protein elution was performed with 0.05 M D-galactose in the selected buffer. Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE; 12 %, w/v) revealed the purity of BmoRL; BmoRL is a glycoprotein as detected by periodic acid-Schiff staining. BmoRL agglutinated at higher titers rabbit erythrocytes (17430) and was not stimulated in the presence of ions ( $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ). BmoRL revealed better SHA with 10 mM citrate-phosphate buffer, pH 7.0, containing 0.15 M sodium chloride and 10 mM sodium phosphate buffer, pH 6.5 and 7.5. Assay at different temperatures revealed that BmoRL is stable at 70 °C and lost its activity up to this temperature. BmoRL was totally inhibited by D(+)-galactose and D(+)-raffinose; azocasein, ovalbumin and azialofetuin partiality inhibited AH of the lectin. Under denaturing and reducing conditions BmoRL appeared as a unique glycosylated polypeptide of apparent MW 26 kDa. BmoRL showed activity against phytopathogenic fungi, specially, *F. solani* with growth inhibition of 30 %. The chromatographic pattern of BmoRL indicate that one lectin can be purified of secondary roots of *B. monandra* with guar gel column, in milligram quantities, with antifungal activity.

**Key words:** lectins, *B. monandra*, antifungal activity;

# CAPÍTULO 1

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Lectinas

### 1.1.1 Histórico e distribuição na natureza

O primeiro relato sobre lectinas foi descrito em 1888 por Stillmark, a partir de uma preparação protéica parcialmente pura, obtida de *Rinus communis* (mamona), a qual foi denominada ricina; ele testou seu efeito em sangue e observou que ao adicionar esta lectina à amostra sanguínea as células vermelhas se agrupavam (Beltrão, 2001).

O termo lectina, originado do latim “*lectus*” (significa selecionado, escolhido) foi introduzido por Boyd & Shapleigh no ano de 1954, para designar um grupo de proteínas que apresentam a característica de ligarem-se específica e seletivamente a resíduos de carboidratos de uma forma não covalente (Hong *et al.*, 2001). São também conhecidas como aglutinina devido à habilidade de aglutinar eritrócitos ou outras células (Peumans & Van Damme, 1995; Kennedy *et al.*, 1995; Matsui *et al.*, 2001). Em 1980, segundo Goldstein e colaboradores as lectinas foram definidas como proteínas ou glicoproteínas de origem não imune que possuem pelo menos dois sítios moleculares de ligação através dos quais interagem com carboidratos, aglutinam células e precipitam polissacarídeos, sem alterar suas estruturas.

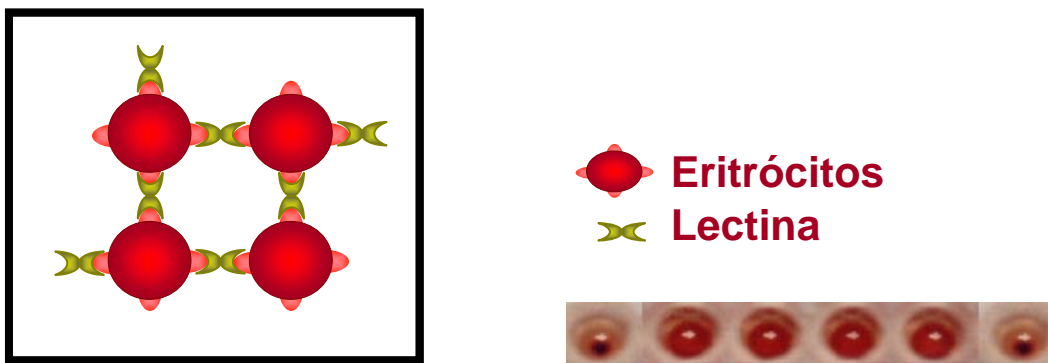
Atualmente, Peumans & Van Damme (1998) definiram lectinas como uma classe de proteínas ou glicoproteínas que contêm um ou mais sítios de ligação para carboidratos ou derivados sem apresentar função catalítica nem características estruturais imunológicas e que se ligam específica e reversivelmente a mono ou oligossacarídeos (Peumans & Van Damme, 1995; Ghosh *et al.*, 1999).

Lectinas são encontradas de forma ubíqua na natureza, desde microorganismos como bactérias (Böckelmann *et al.*, 2003), fungos (Bhowal *et al.*, 2005), vírus (Vijayan & Chandra, 1999); animais, como em protozoários (Babál *et al.*, 1999), insetos (Chen *et al.*, 1999), moluscos (Arreguín-Espinosa & Arreguín-Lozano, 1997), crustáceos (Alpuche *et al.*, 2005). Em plantas são principalmente encontradas em sementes (Sultan e Swamy, 2005), folhas (Coelho & Silva, 2000), tubérculos (Suseelan *et al.*, 2002), entrecasca (Huang *et al.*, 2002), flores (Liu *et al.*, 2002), frutos (Sampietro *et al.*, 2001), rizomas (Tateno *et al.*, 2003) e raízes (Naeem *et al.*, 2001).



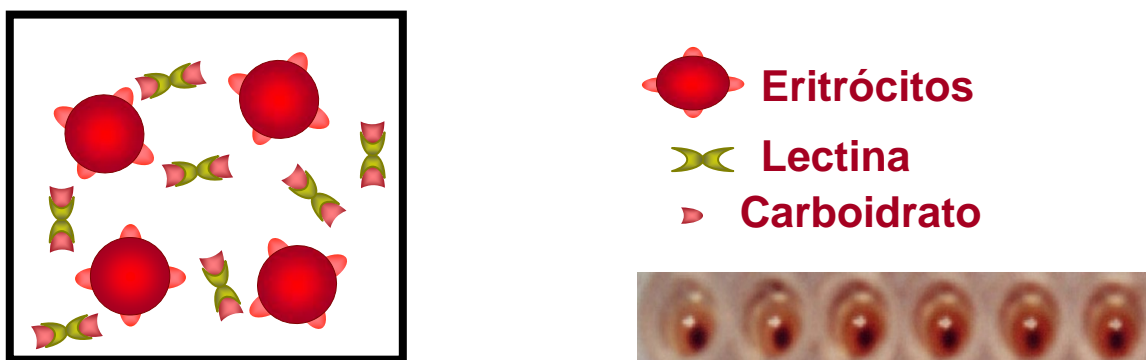
### 1.1.2 Detecção e especificidade

Normalmente, a avaliação da presença de lectinas em materiais biológicos é feita através de ensaios de aglutinação utilizando eritrócitos (Figura 1); a hemaglutinação pode ser testada com eritrócitos de animais e/ou humanos, onde estes podem ser não tratados ou tratados enzimaticamente (tripsina, papaína) ou quimicamente por glutaraldeído ou formaldeído, aumentando ou não a sensibilidade das células a lectinas. Este ensaio é realizado através de uma diluição sucessiva da lectina e posterior incubação com os eritrócitos (Coelho & Silva, 2000; Santos *et al.*, 2005).



**Figura 1. Representação esquemática da aglutinação de eritrócitos por lectinas.**

A confirmação da presença de lectina em uma amostra é feita através de ensaio de inibição da atividade hemaglutinante (AH) utilizando uma solução com carboidratos e/ou glicoproteínas (glicoconjugados). As lectinas ligam-se aos carboidratos ou glicoproteínas da solução teste em lugar de interagirem com os eritrócitos que ao ficarem livre, precipitam (Figura 2).



**Figura 2. Inibição da aglutinação de eritrócitos por lectinas em presença de carboidratos.**

Adicionalmente, a especificidade de uma lectina pode ser definida através do ensaio de inibição da AH, utilizando para este fim diferentes monossacarídeos que em menor concentração, possuam maior capacidade de inibir sua atividade de hemaglutinação ou precipitação de polissacarídeos ou glicoproteínas (Gabor *et al.*, 2001; Ng & Yu, 2001).

Existem lectinas que apresentam especificidade para mais de um carboidrato, aglutinando células de diferentes tipos e espécies. Também existem lectinas que só aglutinam as células em que houver a presença de um determinado carboidrato (Kabir, 1998; Saito *et al.*, 1993; Gabor *et al.*, 2001; Coutiño-Rodríguez *et al.*, 2001). Peumans & Van Damme (1998) observaram que lectinas de plantas exibem uma ampla especificidade para carboidrato, sendo que muitas apresentam maior afinidade para oligossacarídeos do que para açúcares simples ou têm especificidade direcionada contra glicanos (que não são próprios da planta); além disso, lectinas estruturalmente diferentes podem reconhecer o mesmo carboidrato.

### **1.1.3 Classificação**

Estudos estruturais visando à caracterização da especificidade de interação das lectinas com os diferentes carboidratos são fundamentais para o entendimento das diferentes propriedades dessas proteínas. As lectinas, por representar um grupo heterogêneo de proteínas, diferem fortemente em relação à estrutura molecular, especificidade ao carboidrato e atividades biológicas.

Vários critérios são utilizados para a classificação de lectinas, por exemplo, elas podem ser agrupadas dentro de famílias distintas de proteínas homólogas que apresentam propriedades estruturais comuns, sendo a família das leguminosas a mais estudada e caracterizada (Sharon, 1993; Cavada *et al.*, 1998). As lectinas de plantas exibem ampla variedade de especificidade de ligação a carboidratos como demonstrado na tabela 1 (Peumans & Van Damme, 1998).

Tabela 1. Especificidade de ligação a carboidratos das lectinas de plantas

<b>Especificidade</b>	<b>Exemplo de plantas</b>
<b>Grupo Fucose</b>	
Fucose	<i>Ulex europaeus I</i>
<b>Grupo Galactose/Nacetilgalactosamina</b>	
Galactose>>GalNAc	<i>Artocarpus integrifolia</i>
Gal=GalNAc	<i>Clerodendron trichotomum</i>
Gal<<GalNAc	<i>Glycine max</i>
<b>Grupo N-acetilglicosamina</b>	
GlcNAc	<i>Triticum aestivum</i>
(GlcNAc) <sub>n</sub>	<i>Urtica dioica</i>
<b>Grupo Manose</b>	
Manose	<i>Galanthus nivalis</i>
Manose/Glicose	<i>Canavalia ensiformis</i>
Manose/Maltose	<i>Calystegia sepium</i>
<b>Grupo Ácido siálico</b>	
Ácido siálico	<i>Triticum aestivum</i>
Neu5Ac $\alpha$ (2,6)gal/GalNAc	<i>Sambucus nigra</i>
Neu5Ac $\alpha$ (2,3)gal/GalNAc	<i>Maackia amurensis</i>
<b>Grupo Complexo glicano</b>	
Complexo com especificidade conhecida	<i>Phaseolus vulgaris</i>
Complexo com especificidade desconhecida	<i>Euonymus europaeus</i>

Uma outra classificação para lectinas de plantas baseia-se no número de ligação a carboidratos e outros de natureza não catalítica, dividindo-as em quatro principais tipos distintos: merolectinas, hololectinas, quimerolectinas, (Peumans & Van Damme, 1998) e superlectinas (Peumans *et al.*, 2001).

- Merolectinas: são proteínas formadas exclusivamente por um domínio de ligação a carboidrato e, por conta de sua natureza monovalente, são incapazes de precipitar glicoconjugados ou aglutinar células.

- Hololectinas: são proteínas formadas exclusivamente de domínio de ligação a carboidrato que contêm dois ou mais destes domínios idênticos ou muito semelhantes. Este grupo compreende as lectinas que possuem múltiplos sítios de ligação, com capacidade de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados.

- Quimerolectinas: compreende as proteínas que possuem um domínio de ligação a carboidrato e um domínio não relacionado que atua de forma independente.
- Superlectinas: compreende as proteínas com dois sítios de ligação a carboidratos, estruturalmente diferentes, reconhecendo carboidratos distintos.

#### 1.1.4 Purificação

Geralmente a etapa inicial para purificação de lectinas consiste na extração de proteínas com solução salina ou tampão (Mladenov *et al.*, 2002) e com temperatura e tempo de extração pré-definidos. A preparação obtida apresentando atividade hemaglutinante é dita extrato bruto, o qual será avaliado quanto à concentração protéica e submetido à purificação parcial por fracionamento salino com sulfato de amônio (Paiva & Coelho, 1992).

O fracionamento salino é um processo que se baseia no princípio de que a solubilidade da maioria das proteínas é diminuída em elevadas concentrações de sais. O sulfato de amônio é comumente utilizado devido à sua elevada solubilidade. Esse efeito é chamado *salting-out*. Este processo, além de purificar parcialmente lectinas porque retira a sua camada de solvatação fazendo com que as mesmas precipitem, estabiliza a atividade hemaglutinante da proteína, mesmo após longos períodos de armazenamento (Kennedy *et al.*, 1995).

Outro processo muito usado na purificação de proteínas é a de uma membrana (celulose) semipermeável (Kabir *et al.*, 1998), diálise, técnica que separa as lectinas de moléculas pequenas. O principal método cromatográfico para purificar lectinas leva em consideração à afinidade específica de ligação a carboidratos.

A cromatografia de afinidade separa as proteínas por suas especificidades de ligação a grupamentos químicos específicos existentes no suporte insolúvel. As lectinas podem ser purificadas por este método mais eficazmente devido à sua propriedade de ligar-se a carboidratos, como por exemplo, lectinas que reconhecem resíduos de glicose em Sephadex, matriz formada por dextrana, um polímero formado por unidades de glicose (Brazil & Enticher, 1999). A lectina desejada é obtida com alto grau de pureza (Ye & Ng, 2002), alterando-se as condições de pH (Datta *et al.*, 2001), força iônica (Chung *et al.*, 2001) ou pela eluição com solução contendo um competidor (Lima *et al.*, 1997).

Lectinas com especificidade para galactose e seus derivados podem ser purificadas utilizando suportes com géis de agarose, como Sepharose, como a lectina de

*Bauhinia purpurea* alba (Yamamoto *et al.*, 2000) e o gel de guar, o qual promoveu a purificação da lectina das folhas de *B. monandra*, BmoLL (Coelho & Silva, 2000).

### **1.1.5 Caracterização**

Os métodos de caracterização para lectinas são relacionados com a estrutura e a atividade biológica da molécula.

O pH pode ter grande importância sobre a AH de lectinas o que torna imprescindível o conhecimento sobre a faixa de pH onde a proteína se mantém estável e desempenhando sua função, uma vez que o pH altera a carga líquida das proteínas, provocando repulsão eletrostática e rompimento de algumas pontes de hidrogênio. A verificação da faixa de estabilidade do pH pode ser feita submetendo-se a lectina a tampões em diferentes valores de pH (Machuka *et al.*, 1999). Em alguns casos diferenças significativas no pH pode não afetar a atividade de lectinas (Wittsuwannakul *et al.*, 1998) e em outros a lectina perde sua atividade em pequena variação de pH, como é o caso da lectina de *Erythrina speciosa* (Konozy *et al.*, 2003).

A temperatura pode causar alterações extremas na estrutura tridimensional de uma proteína, processo denominado desnaturação. Esse efeito do calor na estrutura ocorre em virtualmente todas as proteínas globulares independente do tamanho ou da função biológica. Algumas lectinas permanecem estáveis até 55-65 °C e a partir de então, com a elevação da temperatura, a atividade hemaglutinante diminui até ser abolida, como no caso das lectinas de *Luetzelburgia auriculata* e *E. speciosa* (Oliveira *et al.*, 2002; Konozy *et al.*, 2003). A Lectina de *Helianthus tuberosus* após aquecimento a 95 °C também foi isolada (Suseelan *et al.*, 2002).

Muitas lectinas contêm metais em suas estruturas e são chamadas de metaloproteínas, pois em alguns casos precisam de íons para exercer sua atividade (Sharon & Lis, 1990). Quanto à atividade biológica, as lectinas são avaliadas através do ensaio de inibição e da atividade hemaglutinante, utilizando monossacarídeos ou carboidratos complexos e eritrócitos de diferentes espécies animais testados para evidenciar a especificidade para o tipo sangüíneo, respectivamente.

### **1.1.6 Aplicações biotecnológicas e importância fisiológica**

Lectinas são utilizadas como importantes ferramentas em processos biotecnológicos, bem como em pesquisas nas áreas das ciências biológicas, bioquímica,

farmacológicas e médicas. Elas têm sido aplicadas na determinação de tipos sanguíneos (Khang *et al.*, 1990; Mo *et al.*, 2000), na detecção e separação de glicoconjugados, onde podem ser usadas para explorar superfícies celulares, ligando-se a porção carboidrato de glicoproteínas ou glicolípídeos que se projeta na célula (Sarkar *et al.*, 1991) e, portanto no diagnóstico em processos de desenvolvimento, diferenciação e transformação neoplástica (Remani *et al.*, 1994).

Por causa do efeito danoso dos agentes quimioterápicos na terapia do câncer, tem sido dada uma atenção especial aos inibidores de crescimento de origem natural e, portanto tem aumentado consideravelmente o interesse de lectinas nos efeitos anti-tumoral (Abdukllaev & Demejia, 1997). As lectinas já são usadas na avaliação de linhagens de células de câncer mamário humano (Schumacher *et al.*, 1995), na atividade anti-proliferativa sobre células tumorais da leucemia (L1210 e M1) (Ngai & Ng, 2004), para distinguir o câncer de próstata e a hiperplasia benigna neste órgão (Basu *et al.*, 2003), como marcadores de tecidos tumorais, em ensaio histoquímicos e imunohistoquímicos para detecção de resíduos glicosilados em superfícies tecidual de humanos e animais (Beltrão *et al.*, 1998; Meyer *et al.*, 2000; Barou *et al.*, 2002; Pedini *et al.*, 2002).

A propriedade de ligação a carboidratos das lectinas pode ser também utilizada em análise de mudanças que ocorrem sobre a superfície celular durante processos fisiológicos e patológicos desde células normais a células transformadas à malignidade (Sharon & Lis, 2001). São também empregadas como moléculas bioadesivas no endereçamento de drogas (Bies *et al.*, 2004). Como ferramentas para a produção dos chamados medicamentos-inteligentes, onde, estes medicamentos diferem-se dos tradicionais por atuarem em células específicas do organismo evitando efeitos colaterais, do tipo provocado pela quimioterapia (Clark *et al.*, 2000; Torchilin *et al.*, 2001; Woodley, 2001).

Algumas lectinas de plantas apresentam ação inseticida contra larvas de insetos, que causam danos à produção agrícola resultando em grandes perdas econômicas, o que possibilita o uso destas proteínas como bio-inseticidas (Yáskara *et al.*, 2005). A lectina de folhas de *Bauhinia monandra*, BmoLL, atuou como inseticida biológico contra larvas de *Anagasta kuehniell*, *Zabrotes subfasciatus* e *Callosobruchus maculatus* (Macedo *et al.*, 2006), outras possuem efeito inibitório no crescimento de fungos (Freire *et al.*, 2002), na purificação, isolamento e caracterização e análise de glicoconjugados (Young & Oomen, 1992; Sánchez & Cabezas, 1998) e na análise de imunoglobulinas humanas (Daziell *et al.*, 1999; Fassina *et al.*, 2001).

As funções biológicas das lectinas ainda não são bem conhecidas. Nas plantas

atuam no mecanismo de defesa inibindo o crescimento de bactérias fitopatogênicas, contra ataques de vírus, fungos e insetos, na relação simbiótica planta/microorganismo (Pochel & Irache, 1998; Cavada *et al.*, 2000; Ratanapo *et al.*, 2001; Limpens & Bisseng, 2003), estimulação, proliferação e crescimento celular (Wititsuwannkul *et al.*, 1998), na interação parasita/hospedeiro, simbiose e estoque de proteínas (Van Damme *et al.*, 1997).

Nos animais, discute-se seu papel fisiológico nos processos de endocitose, transporte intracelular de carboidratos e glicoproteínas, apoptose, nos processos de aderência e reconhecimento celular, na função estrutural e como receptores celulares para glicoproteínas (Appenzeler *et al.*, 1999; Rudiger *et al.*, 2000). Lectinas parecem apresentar função de defesa antimicrobiana especialmente em sistemas imunes de aves e mamíferos (Holmskov *et al.*, 1997). Em microorganismos, as lectinas fariam a ligação com células hospedeiras e atuariam como determinantes de reconhecimento em processo imunológico e fagocitose (Pochel & Irache, 1998). O papel das lectinas em fungos continua desconhecido (Kawagishi *et al.*, 2001), para bactérias e protozoários foi sugerido que as lectinas têm uma função importante facilitando sua adesão no epitélio intestinal. Em humanos elas se ligam a eritrócitos e outras células pelo reconhecimento do N-acetil neuramínico presente na superfície celular e que é um pré-requisito para o início da infecção (Singh *et al.*, 1999).

## **1.2 Imobilização de Proteínas**

Proteínas imobilizadas podem ser definidas como moléculas que estão fisicamente confinadas ou localizadas em uma região definida do espaço. Estabelece-se em torno delas um micro-ambiente distinto daquele que é observado na proteína nativa e solúvel. São estas circunstâncias micro-ambientais que originam a alteração das suas propriedades e que dependem da sua natureza, do suporte e dos outros intervenientes, tais como substratos e inibidores.

A imobilização de proteínas em suportes inertes tem sido objeto de estudo nas últimas décadas e conseqüentemente, muitas metodologias e uma vasta gama de aplicações têm sido sugeridas, porque os derivados protéicos obtidos retêm parte ou a totalidade das suas propriedades biológicas. As proteínas têm sido imobilizadas em estruturas poliméricas, insolúveis em meio aquoso, de maneira que conjugados biotecnologicamente ativos são obtidos (Carneiro-da-Cunha *et al.*, 2002); o método visa o aumento da estabilidade da molécula protéica e a re-utilização do produto obtido (Chagas, 2001).

A cromatografia de afinidade utilizando lectinas como suporte, é utilizada para o isolamento de glicoproteínas como método de purificação, além de servir como instrumento de pesquisas biotecnológicas. A imobilização de lectinas é efetuada, principalmente, em Sepharose CL-4B ativada com brometo de cianogênio e ligação ocorre através da reação dos grupos amino das lectinas aos resíduos imidocarbonados da Sepharose. Sepharose é um gel de agarose em forma de grãos, possuindo elevada porosidade com hidroxilas livres que permitem a ligação covalente com o ligante. A presença de ligações cruzadas lhe confere um aumento na estabilidade, sendo denominada Sepharose CL (*Cross Linked*) e de acordo com a sua concentração pode ser classificada como 2B, 4B, e 6B (Pharmacia Biotech). Suportes de afinidade com lectinas comerciais imobilizadas são largamente utilizados; um inibidor de tripsina de sementes de *Echinodorus paniculatus* foi isolado utilizando cromatografia de afinidade sobre uma preparação contendo isolectinas de *Cratylia mollis* imobilizada em Sepharose CL-4B (Paiva *et al.*, 2003). Concanavalina A, Con A, imobilizada em Sepharose, Con A-Sepharose foi utilizada como suporte de afinidade para a purificação de peroxidase (Franguas *et al.*, 2004).

### 1.3 Fungos

Os fungos são protistas, não-fotossintéticos que crescem como uma massa de filamentos entrelaçados e ramificados, conhecida como micélio. Os fungos filamentosos possuem uma parede celular constituída por celulose ou quitina (Jawetz *et al.*, 1991). Estes microrganismos são ubíquos, encontrados no solo, água, vegetais, homem e detritos em geral (Trabulsi, 2000). Muitos dão origem a doenças em plantas, contudo somente cerca de 100 dos milhares de espécies conhecidas de leveduras e fungos filamentosos provocam doenças em seres humanos ou em animais (Meyer *et al.*, 2000).

Algumas lectinas possuem a capacidade de se ligar especificamente a hifas fúngica e atuar impedindo o consumo de nutrientes e a incorporação de precursores necessários para crescimento do fungo. Atuam ainda sobre a germinação de esporos fúngicos, provavelmente num estágio muito inicial do processo, inibindo-a, de modo que há um prolongamento do período latente que precede a germinação (Lis & Sharon, 1981). Atividade antifúngica foi observada em uma lectina isolada de sementes de *Castanea mollissima*, frente aos fungos *Botrytis cinérea*, *Mycosphaerella arachidicola*, *Physalospora piricola* (Wang & Ng, 2003); bem como na lectina de *Talisia esculenta* que inibiu o crescimento dos fungos *Fusarium*



*oxysporum*, *Colletotrichum lindemuthianum* e *Saccharomyces cerevisiae* através da interação da lectina com as estruturas dos fungos (Freire *et al*, 2002).

#### 1.4 O gênero *Bauhinia* e a espécie *B. monandra*

Encontrado em regiões tropicais e subtropicais do hemisfério ocidental e oriental, *Bauhinia* é um gênero com vários representantes da família das Fabaceae (Caesalpinioideae). No total são mais de 200 espécies (Lewis, 1987), embora sejam de origem do continente Asiático, existem espécies nativas. A árvore pode atingir até 10 m de altura, crescer em solos secos e pobres, seu fruto é tipicamente um legume, chamado de vagem e também tem sido usada como forrageiras. Na medicina popular é utilizada para o tratamento de diabetes e como diurético. Este gênero encontra-se bem distribuído nas cidades brasileiras e contém numerosas espécies ornamentais; devido a suas flores vistosas são muito utilizadas no paisagismo e na arborização urbana.

Uma característica peculiar do gênero *Bauhinia*, devido ao formato bifoliado de suas folhas é conhecida popularmente por “Pata-de-vaca, Unha-de-vaca e Orquídea dos pobres”. Em Pernambuco, podem ser encontradas espécies nativas como *B. acuruana* Moric, *B. breviola* Benth, *B. chelantha* Stend, *B. forficata* Link, *B. heterandra* Benth, *B. membranacea* Benth, *B. monandra* Kurz, entre outras. A espécie *B. monandra* é uma árvore anã distribuída pela zona tropical do mundo inteiro. O nome da espécie “monandra” refere-se ao fato de possuírem apenas um estame. A floração é espetacular e a árvore fica coberta de flores que se assemelham a orquídeas. As flores dão origem a vagens que amadurecem no outono.



**Figura 3: Aspectos de flores e folhas de *Bauhinia monandra*.**

## CAPÍTULO 2

## 2 JUSTIFICATIVA

As plantas têm sido amplamente utilizadas como fonte de medicamentos naturais, em decorrência do alto custo de medicamentos industrializados, associado às dificuldades de assistência médica adequada para a população de baixa renda. Manipulações caseiras de diversos tipos de plantas têm sido empregadas na tentativa de combater diversas doenças, dentre elas diabetes tipo II.

Infusões de folhas do gênero *Bauhinia* são bastante utilizadas na medicina popular por apresentar efeito hipoglicemiante e diurético. O interesse na espécie *Bauhinia monandra* surgiu com o conhecimento de que um extrato hidroetanólico das folhas da planta induziu efeito hipoglicêmico em ratos. Na época, diferentes tecidos da planta foram avaliados como fonte potencial para purificação de lectina. Uma lectina de folhas de *B. monandra*, BmoLL, galactose específica, foi então purificada à homogeneidade (Coelho & Silva, 2000). As preparações da folha de *B. monandra* que contêm BmoLL já têm revelado propriedades hipoglicemiantes em ratos (Pedrosa *et al.*, unpublished data). O comportamento interfacial de BmoLL e sua habilidade interagir com os monocamadas de lipídios foi estudado por medidas de tensão de superfície (Rosilio *et al.*, 2004). Além disso, extratos etanólicos de folhas *B. monandra* mostraram atividades antioxidantes (Argolo *et al.*, 2004). BmoLL apresentou atividade inseticida contra *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotes subfasciatus* e *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) (Macedo *et al.*, 2006).

Preparações de raízes secundárias de *B. monandra* resultaram em valores elevados de comprovada atividade lectínica despertando o interesse na sua purificação. O uso de raízes secundárias não prejudica o bom desenvolvimento da planta, de ampla distribuição em cidades brasileiras como ornamental também denominada árvore orquídea.

A importância do trabalho encontra diretrizes quanto à utilização da lectina de raízes secundárias de *B. monandra* (BmoRL) em futuros testes de atividades biológicas que permitam avaliar seu papel como agente hipoglicemiante possibilitando, também, a redução de possíveis efeitos adversos decorrentes da utilização de um extrato que contém numerosos compostos além da substância de interesse, determinando uma concentração padrão na relação droga-resposta, evitando possíveis riscos de superdosagem. BmoRL poderá igualmente servir à caracterização celular de superfícies transformadas malignamente, como também, servir como matriz de afinidade, após imobilização em um suporte, para purificar glicoproteínas de interesse comercial. A lectina poderá apresentar atividade antimicrobiana dentre tantas outras aplicações biotecnológicas.

## CAPÍTULO 3

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Identificar lectina em raízes secundárias de *B. monandra*, bem como purificar, caracterizar e aplicar a proteína.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- ✓ Extrair a lectina de raízes secundárias de *B. monandra*;
- ✓ Isolar a lectina através de fracionamento salino;
- ✓ Purificar a lectina através de cromatografia de afinidade;
- ✓ Avaliar a atividade hemaglutinante da lectina pura frente a eritrócitos tratados com glutaraldeído, de coelho e humanos;
- ✓ Avaliar o efeito de íons, do pH e da temperatura na atividade hemaglutinante da lectina pura;
- ✓ Inibir a atividade hemaglutinante da lectina usando diferentes carboidratos e glicoproteínas;
- ✓ Caracterizar a lectina pura através de eletroforese;
- ✓ Imobilizar a lectina em Sepharose CL-4B para purificar glicoproteínas de interesse biotecnológico;
- ✓ Avaliar a atividade anti-fúngica da lectina (BmoRL) frente a fungos fitopatogênicos do gênero *Fusarium*.

## CAPÍTULO 4

**4 Artigo ser submetido ao periódico Bioresource Technology**

**A NOVEL *Bauhinia monandra* GALACTOSE-SPECIFIC LECTIN PURIFIED IN  
MILLIGRAM QUANTITIES FROM SECONDARY ROOTS**

**COELHO, L.C.B.B.; SOUZA, J. D.; SILVA, M.B.R. & ARGOLO, A. C. C.**

#### **4.1 A NOVEL *Bauhinia monandra* GALACTOSE-SPECIFIC LECTIN PURIFIED IN MILLIGRAM QUANTITIES FROM SECONDARY ROOTS**

**COELHO, L.C.B.B.; SOUZA, J. D.; SILVA, M.B.R. & ARGOLO, A. C. C.**

Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Av. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Recife, 50670-420, Pernambuco, Brazil.

#### **ABSTRACT**

A leaf lectin, specific to galactose, has already been highly purified in milligram amounts from *Bauhinia monandra* Kurz (pata-de-vaca, pulse), BmoLL (Coelho & Silva, *Phytochem. Anal.*, 11, 1-6, 2000). Secondary root powder of *B. monandra* was extracted (10 %, w/v) in 10 mM citrate-phosphate buffer, pH 6.5, containing 0.15 M sodium chloride (selected buffer) by 16 h at 4 °C followed by ammonium sulphate fractionation (F 0-60 %). The fraction was inhibited by  $\beta$ -D-galactose, trehalose, saccharose and D(+)-cellobiose. Two lectin peaks were obtained when 20 mg of F 0-60% were submitted to guar gel affinity chromatography. A major amount of hemagglutinating activity was recovered as unadsorbed protein; a peak eluted with galactose contained 6.2 mg of highly pure root lectin (BmoRL). Native lectin was resolved as a single broad band on non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis to acidic or basic proteins. Under denaturing and reducing conditions, it appeared as a unique glycosylated polypeptide of apparent MW 26 kDa. The highest agglutination activity of BmoRL was found with glutaraldehyde treated rabbit erythrocytes; treated human erythrocytes of blood groups A, B and AB were also agglutinated. BmoRL showed activity antifungal against phytopathogenic fungi, specially, *Fusarium solani* with inhibition of 30 %. BmoRL also showed antifungal activity against *F. decemcellulare* (20 %) and *F. oxysporum* (17 %); low antifungal activity was detected against *F. moniliforme* and *F. lateritium*. This report indicates that at least one lectin can be purified from fresh secondary roots of *B. monandra* with guar gel, in milligram amounts. The hemagglutination activity, carbohydrate bind specificity, polypeptide molecular mass of the lectin and antifungal activity are reported.

Key words: *Bauhinia monandra* lectin; root lectin, nonseed lectin; guar gel; affinity chromatography; antifungal activity.



## 4.2 INTRODUCTION

Lectins are proteins or glycoproteins with ability to recognize and bind mono- or oligosaccharides (Van Damme *et al.*, 1995; Lis & Sharon, 1998) without inducing change in the carbohydrate bond (Sharon & Lis, 2001). They are distributed in plants (Yan *et al.*, 2005; Wong & Ng, 2006), animals (Alpuche *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2007) and microorganisms (Bhowal *et al.*, 2005; Khan *et al.*, 2007) and interact with free or bound carbohydrates through a particular site structure and non-covalent principles. Carbohydrate interactions allow lectins agglutinate cells and precipitate complex carbohydrates, polysaccharides and glycoconjugates (Sarkar *et al.*, 1991; Sharon & Lis, 2001). Lectins have been used in various applications because of their structural diversity and high specificity of binding, promoting blood typing (Mo *et al.*, 2000), purification of cells and glycoproteins (Young & Oomen, 1992; Sánchez & Cabezas, 1998) and to distinguish between microbial cells (Ye *et al.*, 2001; Trindade *et al.*, 2006).

Legume lectins are a group of highly conserved proteins and are the subject of interest because of their varied physiological roles in plants, such as recognition of the nitrogen-fixing bacteria at the surface of roots, inhibition of growth of pathological organisms, and transport of sugars, hormones or glycoproteins (Barondes 1981; Goldstein & Etzler, 1983; Wang & Ng, 2001). Though plant lectins are mainly isolated from dry seeds, its occurrence in other vegetative tissues like leaves (Coelho & Silva, 2000), rhizomes (Kaur *et al.*, 2005), tubers (Kaur *et al.*, 2006) and roots (Wong & Ng, 2006) have been reported. In addition, plant lectins serve as mediators of the symbiosis between nitrogen fixing microorganisms and leguminous plants (Van Rhijn *et al.*, 1998).

Plant lectins, in particular root lectins, have been extensively studied in a number of aspects, for instance, their antifungal activity. A lectin from *Astragalus mongholicus* roots has been shown to inhibit the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Colletorichum* sp. and *Drechslera turcia* (Yan *et al.*, 2005). On the other hand, galactose-binding lectins with antifungal activity have scarcely been reported (Yan *et al.*, 2005). Plant lectins have broad applications in biotechnology, among them purification and characterization of glycoconjugates and monitoring the expression of cell-surface carbohydrates (Goldstein & Portez, 1986; Cummings, 1997). The isolation and characterization procedures for these proteins often involve screening for the ability to agglutinate cells and precipitate glycoconjugates, followed by the isolation on affinity columns with specific ligands (Villanueva, 2002). Lectins, when immobilized in inert

supports, act as affinity matrices to glycoconjugate isolation (Paiva *et al.*, 2003; Anilyte *et al.*, 2006).

*Bauhinia monandra* Kurz (pata-de-vaca, pulse) is a fabaceae ornamental species whose leaves are used in popular medicine for the treatment of diabetes. A leaf lectin specific to galactose, have already been highly purified from *B. monandra*, BmoLL (Coelho & Silva, 2000). The aim of this work was to isolate in high purity a secondary root lectin from *B. monandra* (BmoRL), in milligram amounts. The hemagglutination activity, carbohydrate bind specificity, polypeptide molecular mass of the lectin and antifungal activity are reported.

## **4.3 MATERIALS AND METHODS**

### **4.3.1 Preparations of *Bauhinia monandra* Lectin (BmoRL) from secondary roots**

Secondary root was harvested from the Germplasm Bank of Medicinal Plants at the Experimental Station of Itapirema, Goiana City, or from the roads of Olinda and Recife cities, State of Pernambuco, Northeast of Brazil. A sample of the collected material is under voucher specimen number 57462, IPA, kept at the Herbarium “Dárdano de Andrade Lima”, from the Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária, Recife. Secondary root was well washed in tap water followed by distilled water, cut into small pieces and left to dry at room temperature for 2-3 days. The fine powder obtained in a multiprocessor was used to extract BmoRL.

Root powder extracts (10 %, w/v) were obtained by overnight gentle shaking at 4 °C, in 0.01 M citrate phosphate buffer (pH 6.5), containing 0.15 M NaCl (the selected buffer). The extract (P1) was passed through gauze and centrifuged at 8000 rpm (15 min). P1 was submitted to a 60 % (w/v) ammonium sulphate fractionation by adding the solid salt. After 4 h at room temperature, the resuspended precipitate was dialysed against distilled water, followed by the selected buffer (F 0-60 %, P2).

### **4.3.2 Hemagglutination activity (HA) assays**

Fresh erythrocytes were obtained as described by Bukantz *et al.* (1946), from human (A, B, O and AB types) and rabbit. Glutaraldehyde-treated erythrocytes (Bing *et al.*, 1967) were also used. In general the hemagglutinating activity (HA) was assayed with glutaraldehyde-treated rabbit erythrocytes.

The HA assays were performed according to Correia & Coelho (1995); HA was defined as the last sample dilution showing hemagglutination, and the specific HA (SHA) corresponded to the HA divided by the protein concentration.

#### **4.3.3 BmoRL purification protocols**

BmoRL was purified according to Coelho & Silva (2000). The affinity matrix was made by cross-linking refined guar gum (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), guaran, with epichlorohydrin in a mixture of water and 2-propanol, according to Gupta *et al.* (1979). A sample (20 mg) of P2 containing BmoRL was applied to a 10 mL guar gel column. The affinity column was washed with the selected buffer until  $A_{280}$  was zero. Then, the adsorbed lectin was eluted with 0.05 M D-galactose in the buffer (P3). The fractions with high activity were bulked together and dialysed with 2 changes of 0.01 M citrate phosphate buffer, pH 6.5, containing 0.15 M NaCl (1 mL/100 mL/2 h). HA and protein were measured and the material was kept at -20 °C.

#### **4.3.4 Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) of native and denatured protein.**

PAGE was performed for native acidic and basic protein according to the methods of Davis (1964) and Reisfeld *et al.* (1962), respectively. Denatured and reduced samples were evaluated by the method of Laemmli (1970). The standard marker proteins were galactosidase (116 kDa), phosphorylase b (97.4 kDa), bovine serum albumin (66.2 kDa), alcohol dehydrogenase (37.6 kDa), carbonic anhydrase (28.5 kDa), myoglobin (18.4 kDa) and lysozyme (14 kDa), purchased from Pharmacia Fine chemicals (Pharmacia Biotechnology, Uppsala, Sweden). The gels were stained either for protein with Coomassie Brilliant Blue Laemmli, (1970), or for carbohydrate using the Schiff reagent (Sigma) according to Pharmacia Fine Chemicals (1980).

#### **4.3.5 Protein measurement**

Whenever necessary, the protein concentrations were measured according to Lowry *et al.* (1951) and by absorbance at 280 nm.

#### 4.3.6 Hemagglutination activity inhibition assays

The carbohydrate-binding specificity of BmoRL was determined by inhibition assay using glycoproteins (asialofetuin, asocasein, avidin, casein, ferritina, fetuin, bovine fetal serum, peroxidase, ovalbumin, thyroglobulin) and sugars D(+)-galactose, D(+)-raffinose, *N*-acetyl-D-galactosamine, L(+)-rhamnose, trehalose, D(+)-cellobiose and sucrose. The inhibition assays were performed in microtiter plates: 50  $\mu$ L of a solution containing either carbohydrate (25-200 mM) in 0.15 M sodium chloride, or glycoprotein (500  $\mu$ g/mL) in 0.15 M sodium chloride were applied in wells, except on the second well where was applied a solution with twice as concentration tested. Following, 50  $\mu$ L of lectin preparation (10  $\mu$ g/mL) was distributed in the second well and successive dilutions were performed. After 15 min at room temperature, 50  $\mu$ L of a 2.5 % (v/v) suspension of rabbit erythrocytes was added in a final volume of 100  $\mu$ L. The result was recorded visually after 45 min at room temperature.

#### 4.3.7 Effects of ions, pH and temperature on BmoRL-induced hemagglutination

BmoRL was incubated at room temperature with  $\text{CaCl}_2$  and  $\text{MgCl}_2$  (0.02 and 0.04 M), submitted to the thermal treatment at 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 and 100  $^\circ\text{C}$  for 30 min, and evaluated at different pH values. The lectin (50  $\mu$ L) was diluted in 0.01 M Tris-hydrochloric acid buffer (pH values of 7.5, 8.0, 8.5, 9.0 and 9.5), 0.01 M sodium phosphate buffer (pH values of 6.5, 7.0, and 7.5), and 0.01 M citrate-phosphate buffer (pH values of 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 and 7.0). HA was determined before and after incubation using rabbit erythrocytes.

#### 4.2.8 Antifungal activity assay with *Fusarium strains*

Isolates of *Fusarium solani* (URM-2480), *F. oxysporum* (URM-2489), *F. moniliforme* (URM-3226), *F. decemcellulare* (URM-3006) and *F. lateritium* (URM-2491) were obtained from Culture Collections of *Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco*, Brazil.

Antifungal activity was determined by a modified assay based on the method described by Wong & Ng (2005). Fungal mycelia were cultured in 100 x 15 mm petri dishes containing 10 mL potato dextrose agar medium. Purified lectin (120  $\mu$ g) was added in

medium and a fungal mycelium disk (0.625 cm in diameter) was disposed in the center of a petri plate (100 x 15 mm). All assays were carried out in triplicate. A 0.01 M citrate phosphate buffer (pH 6.5), containing 0.15 M NaCl saline solution and 10 ppm Cercobin were used as negative and positive controls, respectively. The plates were incubated at 28 °C for 72 h. Antifungal activity was indicated by a reduction of fungi growth halo in the plates.

#### 4.3 RESULTS AND DISCUSSION

A crescent interest in *B. monandra* has been raised since a galactose specific lectin was found in a hypoglycemic leaf preparation. BmoLL and also hemagglutinating activity inhibited by D-galactose have already been detected in preparations of *B. monandra* petioles, branches of stems, stems, buds, flowers as well as secondary roots. Coelho & Silva (2000) obtained preparations from the latter source with very high SHA values (7282, whole extracts).

The present report represents the first investigation on the purification and antifungal activity of a lectin from the secondary roots of *B. monandra*. A lectin from root extract of *B. monandra* was purified in a single step by affinity chromatography column using guar gel beads to isolate BmoRL in milligram amounts. The purification protocol of this lectin is summarized in Table 1. The unretained fraction was eluted with selected buffer, and showed no hemagglutinant activity in the presence of any tested erythrocytes. The chromatographic profile revealed a proteic peak eluted with 0.05 M galactose. Highest HA was detected only on fractions obtained after elution (Figure1). Another galactose-specific lectin from the seeds of *Dolichos lablab* was also purified by affinity chromatography column using Sepharose–galactose gel (Latha *et al.*, 2005). In addition, a lectin (nominated PjLec) was isolated from haemolymph of the shrimp *Penaeus japonicus* by affinity chromatography with fetuin-Sepharose (Yang *et al.*, 2007).

SDS-PAGE of active fraction revealed that guar gel column was efficient on BmoRL purification; the lectin showed the same pattern in the presence or absence of  $\beta$ -mercaptoethanol reducing agent (Figure 2). BmoRL on PAGE for native basic proteins gave a single band (Figure 3). BmoRL is a glycoprotein as detected by periodic acid-Schiff staining. It has been reported that a novel galactose-binding lectin, purified from roots of *Astragalus mongholicus* (AMML), is a glycoprotein with antifungal activity (Yan *et al.*, 2005).

The effect of divalent cation on BmoRL SHA revealed that  $\text{Ca}^{+2}$  or  $\text{Mg}^{+2}$  did not stimulate the lectin. This behavior has been observed in other lectins as for example the lectin from *Arundo donax* rhizomes (Kaur et al., 2005). In addition, a lectin from roots of *Astragalus mongholicus* (AMML) did not require metal ions for its hemagglutination activity (Yan et al., 2005). BmoRL activity was heat stable at 60 °C but no activity was detected above this temperature (Figure 4). The lectin from *A. donax* rhizomes (ADL) is stable up to 55 °C for 15 min and lost its activity by 20 % at 60 °C; beyond 85 °C no activity was observed (Kaur et al., 2005). The effect of pH on BmoRL hemagglutinating activity showed that the lectin was more active in 0.01 M citrate-phosphate buffer, pH 6.5. The lectin was also active with 0.01 M Tris-HCl buffer, pH 7.0 to 7.5, and 0.01 M sodium phosphate buffer, pH 7.0 to 7.5 (Figure 5). This behavior has been observed in other lectins, as demonstrated by *Salvia bogotensis* seed lectin where a maximum pH stability was reached at pH 7.0 and 8.0, but its activity below pH 2.0 and above 12.5 was completely inhibited (Vega & Pérez, 2006). BmoRL showed high affinity with all tested erythrocytes, except type O human erythrocytes. The HA of BmoRL with rabbit (8192) and human B, AB was 512, A 1024 and O was zero, suggesting that BmoRL recognizes the structure of carbohydrate specificity comprising the surface of erythrocyte membranes.

BmoRL was totally inhibited by D(+)-galactose and D(+)-raffinose and partially inhibited by trehalose (1024), sucrose and L(+)-rhamnose (2048). It has been reported that the lectin from roots of *Astragalus mongholicus* (AMML) is galactose-specific (Yan et al., 2005). On the other hand, the hemagglutinating activity of *Pseudostellaria heterophylla* root lectin remained unaltered in the presence of D-fructose, L-arabinose, D-arabinose, L-rhamnose, D-xylose, L-sorbose, inositol, lactose, D-galactose, inulin, inositol, cellobiose, glucose, D-mannose, raffinose, D-melibiose, D-galactosamine,  $\alpha$ -methyl-D-galactopyranoside, and  $\alpha$ -methyl-D-glucopyranoside (Wang & Ng, 2006).

Purified BmoRL showed antifungal activity against various fungal species of the phytopathogenic fungi, namely *Fusarium* species (Figure 6). The lectin inhibited *F. solani* growth at the percentage of inhibition of 30 % (Figure 7). The lectin also showed antifungal activity against *F. decemcellulare* (20 %) and *F. oxysporum* (17 %), when compared with positive control (Cercobin); low antifungal activity was detected against *F. moniliforme* and *F. lateritium* (Figure 7). This behavior has been observed in other lectins, for example *Astragalus mongholicu* root lectin revealed antifungal activity against various species of the phytopathogenic fungi (Yan et al., 2005). *In vitro* studies demonstrated that two novel chitin-binding lectins seeds of *Artocarpus integrifolia* inhibited the growth of *F. moniliforme*

and *Saccharomyces cerevisiae* (Trindade *et al.*, 2006). In contrast, *Pseudostellaria heterophylla* lectin did not display antifungal activity (Wang & Ng, 2006).

In conclusion, an efficient protocol was developed to purify a *B. monandra* secondary root lectin (BmoRL), in milligram quantities, with antifungal activity.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors express their gratitude to the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)* for research grants and fellowship (LCBBC).ACCA thanks *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Pernambuco (FACEPE)* for post-doctoral support.

## REFERENCES

- ALPUCHE J., PEREYRA A., AGUNDIS C., ROSAS C., PASCUAL C., SLOMIANNY M. C., VÁZQUEZ L. & ZENTENO E., 2005. Purification and characterization of a lectin from the white shrimp *Litopenaeus setiferus* (Crustacea decapoda) hemolymph. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1724: 86-93.
- ANIULYTE, J., LIESIENE J. & NIEMEYER B., 2006. Evaluation of cellulose-based biospecific adsorbents as a stationary phase for lectin affinity chromatography. *Journal of Chromatography B*, 831, 24–30.
- BARONDES, S.H., 1981. Lectins: Their multiple endogenous cellular functions, *Annu. Rev. Biochem.* 50, 207–231.
- BHOWAL, J., GUHA, A. K. & CHATTERJEE, B. P., 2005. Purification and molecular characterization of a sialic acid specific lectin from the phytopathogenic fungus *Macrophomina phaseolina*. *Carbohydrate Research* 340, 1973–1982.
- BING, D. H., WEYAND, J. G. M. & STAVITSKY, A. B., 1967. Hemagglutination with aldehyde-fixed erythrocytes for assay of antigens and antibodies. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 124, 1166-1170.
- BUKANTZ, C. S. C., REIN, L. C. C. R. & KENT, J. F., 1946. Studies in complement fixation. II. Preservation of sheep's blood in citrate dextrose mixtures (modified Alsever's solution) for use in the complement fixation reaction. *J. Lab. Clin. Med.* 31, 349-399.
- COELHO, L. C. B. B. & SILVA, M. B. R., 2000. Simple method to purify milligram quantities of the galactose-specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*. *Phytochemical Analysis*, v. 11, 1-6.
- CORREIA, M. T. S. & COELHO, L. C. B. B., 1995. Purification of a glucose/mannose specific lectin, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu bean). *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 55, 261-273.
- CUMMINGS, R.D., 1997. In: *Affinity Separations: A Practical Approach*; P. Matejtschuk (Ed.); IRL Press, Oxford, 123–139.
- DAVIS, B. J., 1964. Disc electrophoresis II: Method and application to human serum proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences* 121, 404-427.
- GOLDSTEIN, I.J & ETZLER, M.E., 1983. *Chemical Taxonomy, Molecular Biology and Function of Plant Lectins*, Alan. Liss, New York.



- GOLDSTEIN, I. J. & PORTEZ, R. D., 1986. In Lectins: Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine; Liner, I. E., Sharon, N., Goldstein, I. J., Eds.; Academic Press: Orlando, FL, New York, 33–247.
- GUPTA, K. C., SAHNI, M.K., RATHAUR, B. S., NARANG, C. K. & MATHUR, N. K., 1979. Gel filtration medium derived from guar gum. *Journal of Chromatography*, 169, 183-190.
- KAUR, A.; SINGH, J.; KAMBOJ, S. S.; SEXANA, A. K.; PANDITA, R. M. & SHAMNUGAVEL, M., 2005. Isolation of an N-acetyl-D-glucosamina specific lectin from the rhizomes of *Arundo donax* with antiproliferative activity. *Phytochemistry*, v. 66, 1933-1940.
- KAUR, G.; ALAM, M. S.; JABBAR, Z.; JAVED, K. & ATHAR, M., 2006. Evaluation of antioxidant activity of *Cássia siamea* flowers. *Journal of Ethnopharmacology*, 108, 340-348.
- KHAN, F., ABSAR AHMAD, M. & ISLAM KHAN., 2007. Purification and characterization of a lectin from endophytic fungus *Fusarium solani* having complex sugar specificity. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 457, 243–251.
- LAEMMLI, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- LATHA, V. L.; RAO, R. N. & NADIMPALLI, S. K., 2005. Affinity purification, physicochemical and immunological characterization of a galactose-specific lectin from the seeds of *Dolichos lablab* (Indian lablab beans). *Protein Expression and Purification*, v. 45, 296-306.
- LIS, H., & SHARON, N., 1998. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. *Chemical Reviews* 98, 637-674.
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. & RANDALL, R. J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193, 265-275.
- MELISSA B. TRINDADE , JOSÉ L.S. LOPES, ANDRÉA SOARES-COSTA, ANA CRISTINA MONTEIRO-MOREIRA, RENATO A. MOREIRA, MARIA LUIZA V. OLIVA & LEILA M. BELTRAMINI., 2006. Structural characterization of novel chitin-binding lectins from the genus *Artocarpus* and their antifungal activity. *Biochimica et Biophysica Acta* 1764, 146 – 152.
- MO, H.; WINTER, H. C.; & GOLDSTEIN, I. J., 2000. Purification and characterization of a neu5Aalpha2-6Galbeta1-4Glic/GlcNAc-specific lectin from the fruiting body of the

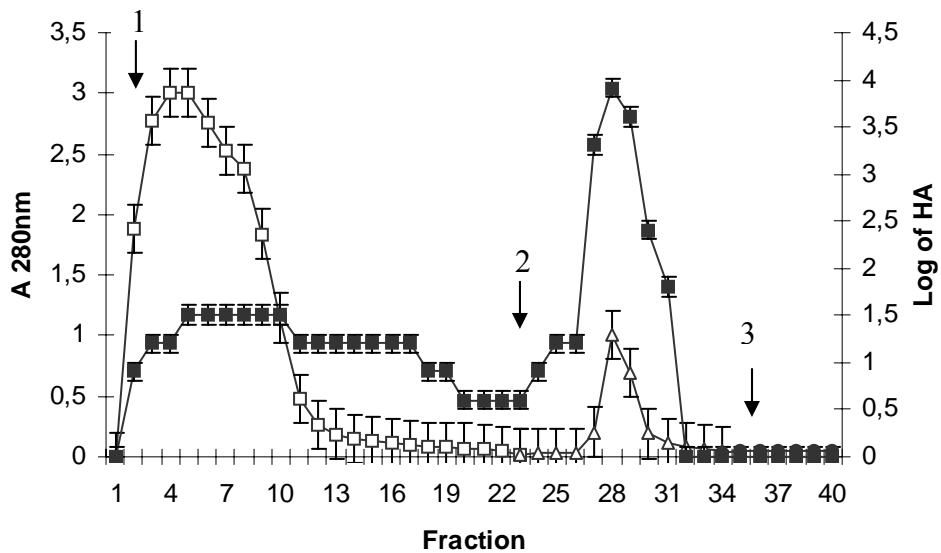
- polypore mushroom *Plyporus squamosus*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 275, 10623-29.
- PAIVA P. M.; SOUZA A.F.; OLIVA M.L.; KENNEDY J.F.; CAVALCANTI M.S.M.; COELHO LC & SAMPAIO C. A., 2003. Isolation of trypsin inhibitor from *Echinodorus paniculatus* seeds by affinity chromatography on immobilized *Cratylia mollis* isolectins. *Bioresource Technology*; 88 (1): 75-79.
- PHARMACIA FINE CHEMICALS., 1980. Polyacrylamide electrophoresis; Laboratory techniques. Uppsala, 72.
- REISFELD, R. A., LEWIS, U. J. & WILLIAMS, D. E., 1962. Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. *Nature* 195, 281-283.
- SHARON, N. & LIS, H., 2001. The structural basis for carbohydrate recognition by lectins. In: *The molecular immunology of complex carbohydrates-2*. (Wu A. M. Ed.), 1-15. Kluwer Academic.
- SARKAR, M.; MAJUMDER, G. C. & CHATTERJEE, T., 1991. Goat sperm membrane lectin binding sites of sperm surface and lectin affinity-chromatography of the mature sperm membrane antigens. *Biochemistry and Biophysical Acta*, v. 1070, n. 1, 196-204.
- SÁNCHEZ, M. M & CABEZAS, J. A., 1998. Use of two lectins for characterization of glycoconjugates from human, porcine and bovine sera. *Biochemical Education*, v. 26, 309 – 312.
- VAN DAMME, E. J. M., BARRE, A., SMEETS, K., TORREKENS, S., VAN LEUVEN, F., ROUGÉ, P. & PEUMANS, W. J., 1995. The bark of *Robinia pseudoacacia* contains a complex mixture of lectins. Characterization of the proteins and the cDNA clones. *Physiologia Plantarum* 107, 833-843.
- VAN RHIJIN P, GOLDBERG R.B, & HIRSCH A.M., 1998. *Lotus corniculatus* nodulation specificity is changed by the presence of a soybean lectin gene. *The Plant Cell*; 10: 1233-49.
- VEGA N, & PÉREZ GERARDO., 2006. Isolation and characterisation of a *Salvia bogotensis* seed lectin specific for the Tn antigen. *Phytochemistry* 67: 347-355.
- VILLANUEVA, MA., 2002. Elimination of artefacts on native Western blots arising from endogenous lectin activity. *Journal of Biochemical and Biophysical methods* 50: 141-9.
- WANG, H.X. & NG, T.B., 2001. A novel lectin from *Pseudostellaria heterophylla* roots with sequence similarity to Kunitz-type soybean trypsin inhibitor. *Life Sciences* 69: 327–333.

- WANG, H.X. & NG, T.B., 2006. Concurrent isolation of a Kunitz-type trypsin inhibitor with antifungal activity and a novel lectin from *Pseudostellaria heterophylla* roots. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 342, 349–353.
- WONG, J.H., & NG, T.B., 2006. Isolation and characterization of a glucose/mannose-specific lectin with stimulatory effect on nitric oxide production by macrophages from the emperor banana. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 38, 234–243.
- YAN Q., JIANG Z., YANG S., DENG W. & HAN L., 2005. A novel homodimeric lectin from *Astragalus mongholicus* with antifungal activity. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 442, 72–81.
- YANG , TIAN LUO, FANG LI, SHAOJING LI, & XUN XU., 2007. Purification and characterisation of a calcium-independent lectin (PjLec) from the haemolymph of the shrimp *Penaeus japonicus*. *Haijie Fish & Shellfish Immunology* 22, 88-97.
- YE, X.Y.; NG, T.B.; TSANG, P.W. & WANG, J., 2001. Isolation of a homodimeric lectin with antifungal and antiviral activities from red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds, *Journal of Protein Chemistry* 20, 367–375.
- YOUNG, N. M. & OOMEN, R. P., 1992. Analysis of sequence variation among legume lectins – A ring of Hypervariable residues forms the perimeter of the carbohydrate-binding site. *Journal of Molecular Biology*, v. 228, 924-934.

Table 1. Purification of *Bauhinia monandra* root lectin

Prep	Titer	Total volume, ml	Protein, mg/mL	SHA	Total AH	Yield %
P1	1024	785.0	1.96	523	803840	100
P2	4096	36.5	3.6	1141	149504	19.0
P3	8192	2.0	0.47	17430	16384	71.4

Hemagglutinating activity (HA) was made with 2.5 % v/v suspension of glutaraldehyde treated rabbit erythrocytes. SHA, Specific HA: titer<sup>-1</sup>/ protein. BmoRL yield corresponded to total activity obtained from P2 (5.6 mL) applied to guar gel column.



**Figure 1.** Guar gel affinity chromatography of F 0-60 % (P2) eluted with 0.05 M D-Galactose. The lectin sample (5.6 mL of P2 containing 20 mg of protein and hemagglutinating activity of  $4,096^{-1}$ ) was applied to a 10 mL column. Fractions (2 mL) were collected at 20 mL/h. The column was subsequently eluted with the selected buffer (1), followed by the buffer containing: (2) 50 mM D-Galactose, P3, and (3) 1 M NaCl. (□) A 280 nm; (■) log AH.

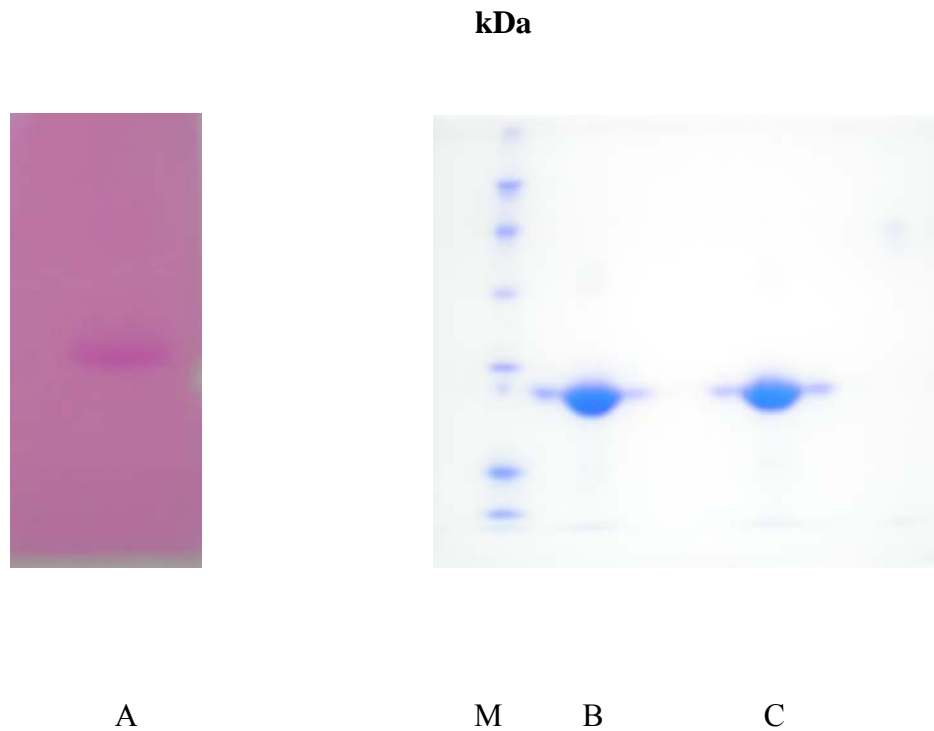


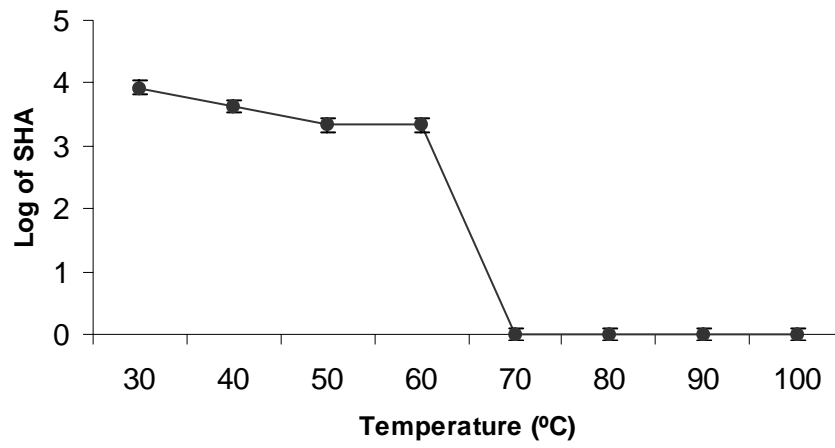
Figure 2. SDS-PAGE of purified BmoRL treated with (B) and without  $\beta$ -mercapthoethanol (C). The gel was stained with Schiff reagent (A) and Coomassie Brilliant Blue (B and C). Lane M corresponds to standard marker proteins (molecular weights shown in kDa). The standard marker proteins were: galactosidase (116 kDa), phosphorylase b (97.4 kDa), bovine serum albumin (66.2 kDa), alcohol dehydrogenase (37.6 kDa), carbonic anhydrase (28.5 kDa), myoglobin (18.4 kDa) and lysozyme (14 kDa).



*A*

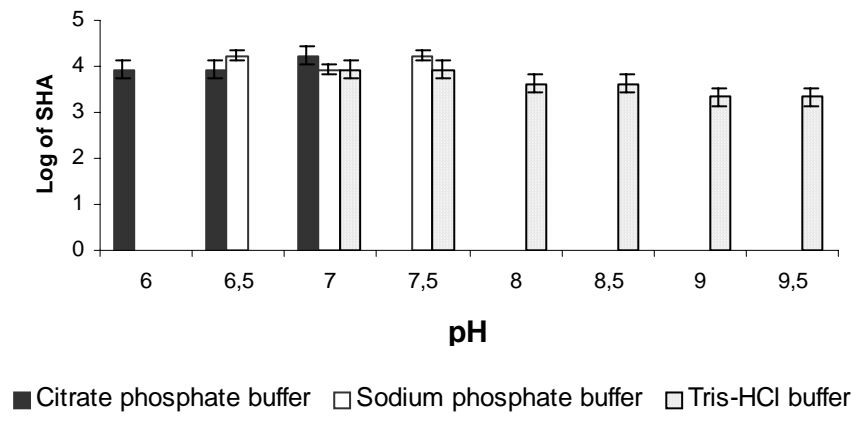
*B*

**Figure 3.** PAGE to basic protein (A) from purified BmoRL. Lane B corresponds to standard marker cytochrome C. The gels were stained with starch black.

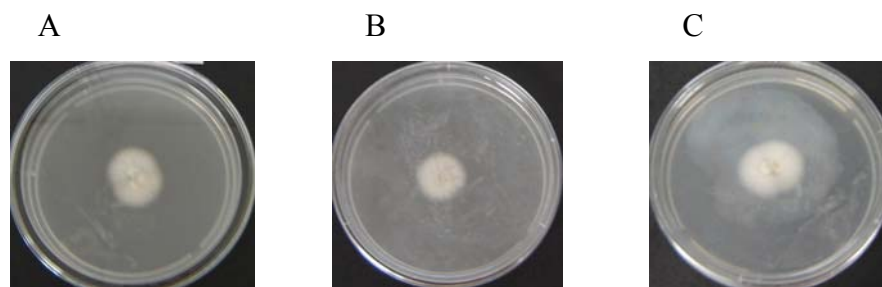


**Figure 4.** Specific hemagglutinating activity (SHA) of BmoRL, at different temperatures. SHA: titer<sup>-1</sup>/protein (mg/mL)

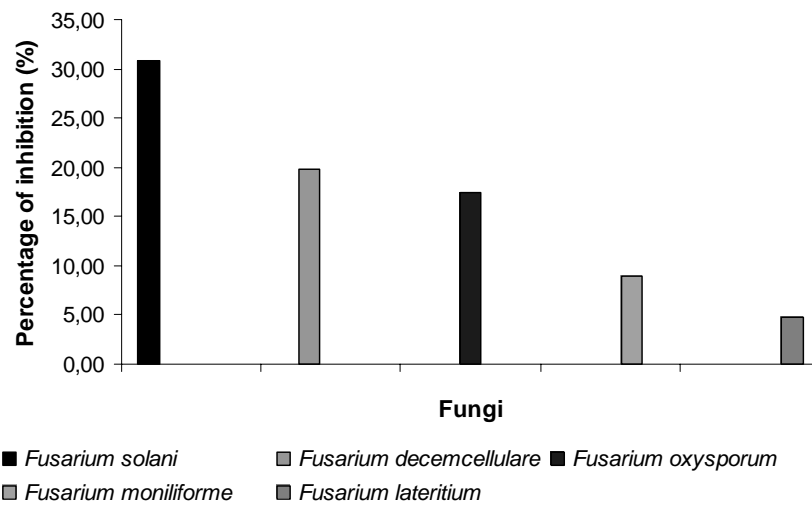




**Figure 5.** Effect of pH on BmoRL specific hemagglutinating activity (SHA).



**Figure 6.** Inhibitory activity from *F. solani* mycelium growth with BmoRL. (A) BmoRL (120  $\mu$ g), (B) Positive control (Cercobin at 10 ppm), and (C) Negative control (0.01 M citrate phosphate buffer (pH 6.5) in 0.15 M NaCl). All assays were carried out in triplicate.



**Figure 7.** Antifungal activity of BmoRL toward *Fusarium* species. All assays were carried out in triplicate and results are given as mean  $\pm$  S.E.

## CAPÍTULO 5

## 5 CONCLUSÕES

- Ensaios de hemaglutinação com eritrócitos de coelho revelaram que tampão citrato fosfato 0,01 M, pH 6,5, contendo NaCl 0,15 M (tampão selecionado) foi eficiente para extração da lectina.
- F0-60% contendo maior AHE foi o material de escolha para purificação da proteína.
- Raízes secundárias de *B. monandra* apresentam uma lectina (BmoRL) purificada por cromatografia de afinidade em gel de guar com alta atividade hemaglutinante específica.
- BmoRL não teve sua atividade hemaglutinante aumentada em presença de íons  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Mg}^{+2}$ .
- Aquecimento da proteína demonstrou que BmoRL é uma lectina termosensível mantendo atividade até 60 °C.
- SDS-PAGE revelou a purificação de BmoRL apresentando massa molecular relativa de 26 kDa.
- BmoRL possui atividade anti-fúngica, com inibição de mais de 30 % do crescimento de *Fusarium solani*.

## CAPÍTULO 6

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULLAEV, F. I. & DeMEJIA, G. Antitumor activity of natural substances lectins and saffron. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, 47(3):195-202, 1997.

ALPUCHE, J., *et al.* Purification and characterization of a lectin from the white shrimp *Litopenaeus setiferus* (*Crustacea decapoda*) hemolymph. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1724, p.86-93, 2005.

APPENZELER, C. *et al.* The lectin ERGIC-53 is a cargo transport receptor for glycoproteins. **Natural Cellular Biology**, v. 1, n. 6, p. 330 – 334, 1999.

ARGOLO, A. C.C.; SANT'ANA, A. E. G.; PLETSH, M.; & COELHO, L. C. B. B. Antioxidant activity of leaf extracts from *Bauhinia monandra*. **Bioresource Technology**, 95, p. 229-233, 2004.

ARREGUÍN-ESPINOSA, R & ARREGUÍN-LOZANO, B. Biochemical properties of hemagglutinins in the mollusk *Pomacea flagellata*. **International Biochemistry and Molecular Biology**, v. 43, n. 6, p. 33-36, 1997.

BABÁL, P., *et al.* Sialic acid-specific lectin from *Tritrichomonas foetus*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 428, p. 106-116, 1999.

BAROU, O.; MEKRALDI, S.; VICO, L.; BOIVIN, G.; ALEXANDRE, C. & LAFAGEPROUST, M. H. Relationships between trabecular bone remodeling and bone vascularization: a quantitative study. **Bone**, v. 30, n.4, p. 604-612, 2002.

BASU, P. S.; MAJHI, R. & BATABYAL, S. K. Lectin and serum-PSA interaction as a screening test for prostate cancer. **Clinical Biochemistry**, v. 36, p.373-376, 2003.

BELTRÃO, E. I. C; CORREIA, M. T. S.; SILVA, J. F. & COELHO, L. C. B. B. Binding evaluation of isoform 1 from *Cratylia mollis* lectin to human mammary tissues. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 74:125-134, 1998.

BELTRÃO, E. I.C. Caracterização parcial e aplicação da lectina de sementes de *Parkia pendula* (visgueiro). Tese de doutorado, Universidade de Federal de Pernambuco, Recife, 2001.

BHOWAL, J.; GUHIA, A. K. & CHATTERJEE, B. P. Purification and molecular characterization of a sialic acid specific lectin from the phytopathogenic fungus *Macrophomina phaseolina*. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 1973-1982, 2005.

BIES, C.; LEHR, C. M. & WOODLEY, J. F. Lectin-mediated drug targeting: history and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p. 435, 2004.

BÖCKELMANN, U.; SZEWZYK, U. & GROHMANN, E. A new enzymatic method for the detachment of particle associated soil bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 55, p. 202-211, 2003.

BOYD, W C & SAHAPLEIGH, E. Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). **Science**, Washington, v. 119, p.419, 1954.

BRAZIL, V. & ENTLICHER, G. Complexity of lectins from the hard roe of perch (*Perca fluviatilis* L.). **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 31, p. 431-442, 1999.

CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G.; ROCHA, J. M. S.; CABRAL, J. M. S.; GIL, M. H. & GARCIA, F. A. P. Covalent immobilization of lipase on different supports. **Latin American Applied Research**, v. 32, p. 69-72, 2002.

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

CAVADA, B. S.; Madeira, s. v.; caL VETE, J. J.; SOUZA, L. A.; BOMFIM, L. R.; DANTAS, A. R.; LOPES, M. C.; GRANGEIRO, T. B.; FREITAS, B. T.; PINTO, V. P.;



LEITE, K. B. & RAMOS, M. V. Purification, chemical and immunochemical properties of a new lectin from *Mimosaideae* (*Parkia discolor*). **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 30, p. 271-280, 2000.

CHEN, C.; RATCLIFFE, E. & ROWLEY, A. F. Detection, isolation and characterization of multiples lectins from the hemolymph of the cockroach *Blaberus discodalis*. **Journal of Biochemistry**, v. 294, p. 181-190, 1999.

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

CLARK, M. A.; HIRST, B. H. & JEPSON, M. Lectin-mediated mucosal delivery of drugs and microparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 43, p. 207-223, 2000.

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

COUTIÑO-RODRÍGUEZ, R.; HERNÁNDEZ-CRUZ, P. & GILES-RÍOS, H. Lectins in fruits having gastrointestinal activity: Their participation in the hemagglutinating property of *Escherichia coli* 0157:H7. **Archives of Medical Research**, v. 32, p. 251-257, 2001.

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

DAZIEL, M.; McFARLANE, I. & AXFORD, J. S. Lectin analysis of human immunoglobulin G N-glycansylation. **Glycoconjugate Journal**, v. 16 (12), p. 801-807, 1999.

FASSINA, G.; RUVO, M.; PALOMBO, G.; VERDOLIVA, A. & MARINO, M. Novel ligands for affinity-chromatographic purification of antibodies. **Journal Biochemical and Biophysical Methods**, v. 49, p. 481-490, 2001.

FRAGUAS, L. F.; BATISTA-VIERA, F. & CARLSSON, J. Preparation of high-density Concanavalina A adsorbent and its use for rapid, high-yield purification of peroxidase from roots. **Journal of Chromatography B**, 803, 237-241, 2004.

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

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

GOLDSTEIN, I. J.; HUGHES, R. C.; MONSIGNY, M.; OSAWA, T. & SHARON, N. What should be called a lectin? **Nature**, v. 255, p.66, 1980.

HOLMSKOV, U.; *et al.* Isolation and characterization of a new member of the scavenger receptor superfamily, glycoprotein-340 (gp-340), as a lung surfactant protein-D binding molecule. **Journal of Biological Chemistry**, v. 13743-13749, 1997.

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

HUANG, R. H., *et al.* Two novel antifungal peptides distinct with a five-disulfite motif from the bark of *Eucommia ulmoides* Oliv. **FFBS Letters**, v. 521, p. 87-90, 2002.

JAWETZ, E.; MELNICK, J. L.; ALDELBERG, E. A.; BROOKS, G. F.; BUTEL, J. S. & ORNSTON L. N. **Microbiologia Médica**, 18<sup>a</sup> ed., Ed. Guanabara – Koogan, Rio de Janeiro, **1991**.

KABIR, S. Jacalin: a jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seed-derived lectin of versatile applications in immunobiological research. **Journal of Immunological Methods**, v. 212, p. 193-211, 1998.

KAWAGISHI, H., et al. Purification and characterization of a lectin from the mushroom *Mycocleptodonoides aitchisonii*. **Phytochemistry**, v. 56, p. 53-58, 2001.

KENNEDY, J. F.; PAIVA, P. M. G.; CORREIA, M. T. S.; CAVALCANTE, M. S. M. & COELHO, L. C. B. B. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 26, p. 219-230, 1995.

KHANG, N. Q.; JEAN-LEUE, G. & JOHAN, H. A blood group A specific lectin from the seeds of *Crotalaria striata*. **Biochemistry and Biophysical Acta**, v. 1033, n. 2, p. 210-213, 1990.

KONOZY, E. H. E., et al. Isolation, purification and physicochemical characterization of galactose-binding lectin from seeds of *Erythina speciosa*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 410, p. 222-229, 2003.

LEWIS, G. P. Legumes of Bahia. **Kew Botanic Gardens**, 369, 1987.

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

LIMPENS, E. & BISSELING, T. Signaling in symbiosis. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, p. 343-350, 2003.

LIS, H. & SHARON, N. Lectins in higher plants. In: MARCUS, A. The Biochemistry of Plants, a Comprehensive Treatise. Proteins and nucleic acids, New York, **Academic Press**, v. 6, p. 371-447, 1981.

LIU, W., et al. Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a novel mannose-binding lectin from *Gastrodia elata* with antifungal properties. **Acta Crystallogr. D-Biological Crystallography**, v. 58, p. 1833-1835, 2002.

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

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

MATSUI, T.; HAMAKO, J.; OZEKI, Y. & TITANI, K. Comparative study of blood group-recognizing lectins toward ABO blood group antigens on neoglycoproteins, glycoproteins and complex-type oligosaccharides. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1525, p. 50-57, 2001.

MEYER, W.; BOLLHORN, M. & STEDE, M. Aspects of general antimicrobial properties of skin secretion in the common seal *Phoca vitulina*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 41, n.1, p. 77-79, 2000.

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

MO, H.; WINTER, H. C. & GOLDSTEIN, I. J. Purification and characterization of a neu5Acalpha2-6Galbeta1-4Glic/GlcNAc-specific lectin from the fruiting body of the polypore mushroom *Plyporus squamosus*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 10623-29, 2000.

NAEEM, A., et al. Purification of *Cajanus cajan* roots lectin and its interaction with rhizobial lipopolysaccharide as studied by different spectroscopic techniques. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 396, p. 99-105, 2001.

NG, T. B. & YU, Y. L. Isolation of a novel heterodimeric agglutinin from rhizomes of *Smilax glabra*, the Chinese medicinal material tufuling. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 33, p. 269-277, 2001.

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

OLIVEIRA, J.T. A., *et al.* Purification and physicochemical characterization of a cotyledonary lectin from *Luetzelburgia auriculata*. **Phytochemistry**, v.61, p.301-310, 2002.

PAIVA, P. M. G. & COELHO, L. C. B. B. Purification and partial Characterization of two lectins isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu Bean). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 36, p. 113-118, 1992.

PAIVA, P. M.; SOUZA, A. F.; OLIVA, M. L.; KENNEDY, J. F.; CAVALCANTI, M. S. M.; COELHO, L. C. & SAMPAIO, C. A. Isolation of trypsin inhibitor from *Echinodorus paniculatus* seeds by affinity chromatography on immobilized *Cratylia mollis* isolectins. **Bioresource Technology**, v. 88, n. 1, p. 75-70, 2003.

PEDINI, V.; SCOCCO, P.; GARGIULO, A. M.; CECCARELLI, P. & LORVIK, S. Glycoconjugate characterization in the intestine of *Umbrina cirrosa* by means of lectin histochemistry. **Journal of Fish Biology**, v. 61, p. 1363-1372, 2002.

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

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

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M.; BARRE, A. & ROUGÉ, P. Classification of plant lectins in families of structural and evolutionary related proteins. In: **The molecular**

**Immunology of Complex Carbohydrates-2, (Wu A. M. ed.),** p. 27-54. Kluwer Academic, 2001.

PONCHEL, G. & IRACHE, J. M. Specific and non-specific bioadhesive particulate systems for oral delivery to the gastrointestinal tract. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 34, p. 191-219, 1998.

RATANAPO, S.; NGAMJUNYAPORN, W. & CHULAVATNATOL, M. Interaction of a leaf lectin with a phytopathogenic bacterium, *Pseudomonas syringae pv mori*. **Plant Science**, v. 160, p. 739-744, 2001.

REMANI,P.; PILLAI, K. R.; HASEENABEEVI, V. M. & ANKATHIL, R. Lectin cytochemistry in the exfoliative cytology of uterine cervix. **Neoplasma**, Índia, v. 41, n.1, p. 39-42, 1994.

ROSILIO, V.; BOISSONNADE, Marie-Martine; COELHO, L. C. B. B.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; ANDRADE, C. A. S. & BASZKIN, A. 2004. Interaction of *Bauhinia monandra* lectin (BmoLL) with lipid monolayers. **Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 250, p. 491-497.

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

SAITO, K.; KOMAE, A.; KAKUTA, M.; VAN DAMME, E. J. M.; PEUMANS, W. J.; GOLDSTEIN, I. J. E. & MISAKI, A. The  $\alpha$ -mannosyl-binding lectin from leaves of the orchid twayblade (*Listera ovata*). Application to separation of  $\alpha$ -D-mannans from  $\alpha$ -D-glucans. **European Journal of Biochemistry**, v. 217 p. 677-681, 1993.

SAMPIETRO, A. R., et al. An N-acetylglucosamine oligomer binding agglutinin lectin from ripe *Cyphomandra betacea* Sendt. Fruits. **Plant Science**, v. 160, p. 650-667, 2001.

SÁNCHEZ, M. M & CABEZAS, J. A. Use of two lectins for characterization of

glycoconjugates from human, porcine and bovine sera. **Biochemical Education**, v. 26, p. 309-312, 1998.

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

SARKAR, M.; MAJUMDER, G. C. & CHATTERJEE, T. Goat sperm membrane lectin binding sites of sperm surface and lectin affinity-chromatography of the mature sperm membrane antigens. **Biochemistry and Biophysical Acta**, v. 1070, n. 1, p. 196-204, 1991.

SCHUMACHER, U.; ADAM, E.; BROOKS, S. A. & LEATHEM, A. J. Lectin binding properties of human cancer cell lines and human milk with particular reference to Helix pomatia agglutinin. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 43, n. 3, p. 275-81, 1995.

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

SHARON, N & LIS, H. Legumes lectins – a large family of homologous proteins. **Federation American Societies Experimental Journal**, v. 4, p. 3198-3208, 1990.

SHARON, N & LIS, H. The structural basis for carbohydrate recognition by lectins. In: **The Molecular Immunology of Complex Carbohydrates-2**. (Wu A. M. Ed.), p. 1-9, 2001.

SINGH, R. S.; TIWRY, A. K. & KENNEDY, J. F. Lectins sources and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 19, p. 145-178, 1999.

SULTAN, N. A. M. & SWAMY, M. J. Fluorescence quenching and time-resolved fluorescence studies on *Trichosanthes dioica* seed lectin. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 80, p. 93-100, 2005.

SUSEELAN, K. N., *et al.* Purification and characterization of a lectin from wild sunflower (*Helianthus tuberosus* L.) tubers. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 407, p.241-247, 2002.

TATENO, H., et al. Purification, characterization molecular cloning and expression of novel members of jacalin-related lectins from rhizomes of the true fern *Plebidium aureum* (L) J. Smith (Polypodiaceae). **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 10891-10899, 2003.

TORCHILIN, V. P.; LEVECHENKO, T. S.; LUKYNOV, A. N.; KHAW, B. A.; KLIBANOV, A. L.; RAMMOHAN, R.; SAMOKHIN, G. P. & WHITEMAN, K. R. p-Nitrophenylcarboxyl-PEG-PE-liposomes: fast and simple attachment of specific ligands, including monoclonal antibodies, to distal ends of PEG chains via p-nitrophenylcarbonyl groups. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1511, p. 397-441, 2001.

TRABULSI, R. **Microbiologia**. 3<sup>a</sup> ed. Ed. Guanabara-Koogan: Rio de Janeiro 2000.

VAN DAMME, E. J. M.; BARRE, A.; ROUGÉ, P. & PEUMANS, W. Molecular cloning of the bark and seed lectins from the Japanese pagoda tree (*Sophora japonica*). **Plant Molecular Biology**, v. 33, p. 523-536, 1997.

VIJAYAN, M. C. & CHANDRA, N. Lectins. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 9, p. 707-714, 1999.

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

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

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

YAMAMOTO, K.; KOMANI, Y. & OSAWA, T. A chimeric lectin formed from *Bauhinia purpurea* lectin and *Lens culinaris* lectin recognizes unique carbohydrate structure. **Journal of Biochemistry**, v. 127, p. 129-135, 2000b.



YÁSKARA, F. M. M. L.; SILVA, L. M. C. M.; AMORIM, R. C. N.; FREIRE, E. A.; JORGE, D. M. M.; GRANGEIRO, T. B. & BENEVIDES, N. M. B. Purification of a lectin from the marine red alga *Gracilaria 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.

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

YOUNG, N. M. & OOMEN, R. P. Analysis of sequence variation among legume lectins– A ring of Hypervariable residues forms the perimeter of the carbohydrate-binding site **Journal of Molecular Biology**, v. 228, p.924-934, 1992.

## ANEXOS

## BIORESOURCE TECHNOLOGY

### *Submission of papers:*

For North and South America: By Mail: Manuscripts (3 copies plus a soft copy on CD) accompanied by a covering letter should be sent to the relevant submission address.

### *Submission address:*

Papers from North and South America only: Dr S.C.Ricke, Food Science Dept., University of Arkansas, 2650 North Young Avenue, Fayetteville, AR 72704-5690, USA;

Papers from Asia-Pacific region and Europe only: Please use Elsevier's online submission system to submit to the journal. The direct link is <http://ees.elsevier.com/bite/> The Asia-Pacific region editor is Prof. Ashok Pandey and the European editor is Prof. V.A. Dodd.

*Submission language:* English (Link to the Oxford English Dictionary <http://dictionary.oed.com/entrance.dtl>)

*English language help service:* Upon request Elsevier will direct authors to an agent who can check and improve the English of their paper (before submission). Please contact [authorsupport@elsevier.com](mailto:authorsupport@elsevier.com) for further information.

*Types of contributions:* Original research papers, review articles, case studies, short communications, book reviews.

*Corresponding author:* Clearly indicate who is responsible for correspondence at all stages of refereeing and publication, including post-publication. Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Full postal addresses must be given for all co-authors. Please consult a recent journal paper for style if possible.

*Original material:* Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the Publisher.

*Editor's requirements:* No special requirements for this journal.

Detailed instructions on manuscript preparation and artwork instructions can be found below. The editor reserves the right to return manuscripts that do not conform to the instructions for manuscript preparation and artwork instruction, as well as paper that do not fit the scope of the journal, prior to refereeing.

[Back to the contents list](#)

### **Manuscript Preparation:**

#### *General:*

Editors reserve the right to adjust style to certain standards of uniformity. Original manuscripts are discarded one month after publication unless the Publisher is asked to return original material after use. An electronic copy of the manuscript on disk should accompany the final accepted version. Please use Word, Word Perfect or LaTeX files for the text of your manuscript. (For further information about LaTeX submission, please go to <http://www.elsevier.com/locate/latex>.) [Back to contents list](#)

#### *Structure:*

Follow this order when typing manuscripts: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Main text, Acknowledgements, Appendix, References, Vitae, Figure Captions and then Tables. For submission in hardcopy, do not import figures into the text - see Illustrations. The corresponding author should be identified with an asterisk and footnote. All other footnotes (except for table footnotes) should be avoided. Collate

acknowledgements in a separate section at the end of the article and do not include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. [Back to the contents list](#)

*Text Layout:*

Use double spacing and wide (3 cm) margins on white paper. (Avoid full justification, i.e., do not use a constant right-hand margin.) Ensure that each new paragraph is clearly indicated. Present tables and figure legends on separate pages at the end of the manuscript. If possible, consult a recent issue of the journal to become familiar with layout and conventions. Number all pages consecutively, use 12 or 10 pt font size and standard fonts. If submitting in hardcopy, print the entire manuscript on one side of the paper only.

[Back to the contents list](#)

*Corresponding author:*

Clearly indicate who is responsible for correspondence at all stages of refereeing and publication, including post-publication. Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Full postal addresses must be given for all co-authors. Please consult a recent journal paper for style if possible. [Back to the contents list](#)

*Abstract:*

Each paper should be provided with an Abstract of about 100-150 words, reporting concisely on the purpose and results of the paper. [Back to the contents list](#)

*Keywords:*

Immediately after the abstract, provide a maximum of ten keywords (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible.

[Back to the contents list](#)

*Symbols:*

Abbreviations for units should follow the suggestions of the British Standards publication BS 1991. The full stop should not be included in abbreviations, e.g. m (not m.), ppm (not p.p.m.), '%' and '/' should be used in preference to 'per cent' and 'per'. Where abbreviations are likely to cause ambiguity or not be readily understood by an international readership, units should be put in full.

*Units:*

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If, in certain instances, it is necessary to quote other units, these should be added in parentheses. Temperatures should be given in degrees Celsius. The unit 'billion' is ambiguous and must not be used. [Back to the contents list](#)

*Maths:*

Authors should make clear any symbols (e.g. Greek characters, vectors, etc.) which may be confused with ordinary letters or characters. Duplicated use of symbols should be avoided where this may be misleading. Symbols should be defined as they arise in the text and separate Nomenclature should also be supplied.

*References:*

All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript.

Text: All citations in the text should refer to:

1. Single author: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. Two authors: both authors' names and the year of publication;
3. Three or more authors: first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: "as demonstrated (Allan, 1996a, 1996b, 1999; Allan and Jones, 1995). Kramer et al. (2000) have recently shown ...."

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters "a", "b", "c", etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2000. The art of writing a scientific

article. J. Sci. Commun. 163, 51-59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 1979. The Elements of Style, third ed. Macmillan, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 1999. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), Introduction to the Electronic Age. E-Publishing Inc., New York, pp. 281-304.

[Back to the contents list](#)

#### *Colour Costs and Queries:*

For colour illustrations, a colour printing fee is charged to the author per colour page. Further information concerning colour illustrations and costs is available from Author Support at [authorsupport@elsevier.ie](mailto:authorsupport@elsevier.ie), and at <http://authors.elsevier.com/locate/authorartwork>. [Back to the contents list](#)

#### *FREE ONLINE COLOUR*

If, together with your accepted article, you submit usable colour and black/white figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in colour on the web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. 'Usable' means the formats comply with our instructions. See the information about Illustrations at <http://authors.elsevier.com/locate/authorartwork>. For colour illustrations in the print journal see Colour Costs above. [Back to the contents list](#)

#### *Tables:*

Tables should be numbered consecutively and given suitable captions and each table should begin on a new page. No vertical rules should be used. Tables should not duplicate results presented elsewhere in the manuscript (for example, in graphs). Footnotes to tables should be typed below the table and should be referred to by superscript lowercase letters. [Back to the contents list](#)

#### *Electronic Annexes*

We strongly encourage you to submit electronic annexes, such as short videos, computer-enhanced images, audio clips and large databases. Please refer to the Artwork Instructions (Multimedia files) at <http://authors.elsevier.com/locate/authorartwork> for details on file types to be used. If you are submitting on hardcopy, please supply 3 disks/CD ROMs containing the electronic annex to the editor for review. In the text of your article you may wish to refer to the annex. This is not mandatory, however, if you do wish to refer to the annex in the text then please do so using this example: "?see Electronic Annex 1 in the online version of this article." Production will insert the relevant URL at the typesetting stage after this statement.

[Back to the contents list](#)

#### *Supplying Final Accepted Text on Disk:*

Once the paper has been accepted by the editor, an electronic version of the text should be submitted together with the final hardcopy of the manuscript. **The electronic version must match the hardcopy exactly.** We accept most wordprocessing formats, but Word, WordPerfect or LaTeX (see also <http://www.elsevier.com/locate/latex>) is preferred. Always keep a backup copy of the electronic file for reference and safety. Label the disk with your name, the journal title and any software used. Save your files using the default extension of the program used. Electronic files can be stored on 3.5 inch diskette, ZIP-disk or CD (either MS-DOS or Macintosh). [Back to the contents list](#)

#### **Notification:**

Authors will be notified of the acceptance of their paper by the editor. The Publisher will also send a notification of receipt of the paper in production. [Back to the contents list](#)

#### **Copyright:**

All authors must sign the Transfer of Copyright agreement before the article can be published. This transfer agreement enables Elsevier to protect the copyrighted material for the authors, but does not relinquish the authors' proprietary rights. The copyright transfer covers the exclusive rights to reproduce and distribute the article, including reprints, photographic reproductions, microfilm or any other reproductions of similar nature

and translations. Authors are responsible for obtaining from the copyright holder permission to reproduce any figures for which copyright exists.

For more information please go to our copyright page <http://authors.elsevier.com/copyright>.

[Back to the contents list](#)

#### **PDF Proofs:**

One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author, to be checked for typesetting/editing. The corrections should be returned within 48 hours. No changes in, or additions to, the accepted (and subsequently edited) manuscript will be allowed at this stage. Proofreading is solely the author's responsibility. Any queries should be answered in full. Please correct factual errors only, or errors introduced by typesetting.

For more information on proofreading please go to our proofreading page

<http://authors.elsevier.com/quickguide>. Please note that once your paper has been proofed we publish the identical paper online as in print. [Back to the contents list](#)

#### **Author Benefits:**

*No page charges:* Publication in this journal is free of charge.

*Free offprints:* Twenty-five offprints will be supplied free of charge. Corresponding authors will be given the choice to buy extra offprints before printing of the article. Authors who pay for colour illustrations will receive an extra fifty offprints free of charge.

*Author discount:* Contributors to Elsevier journals are entitled to a 30% discount on all Elsevier books. See <http://www.elsevier.com/homepage/booksbutler> for more information.

## ANTIFUNGAL EFFECT OF BMO LL (*BAUHINIA MONANDRA* LEAVES) AND CLAVELL (*CLADONIA VERTICILLARIS* LICHEN) LECTINS ON *FUSARIUM* SPECIES

Silva, M.D.C.<sup>1</sup>; Silva, M.C.C.<sup>1</sup>; Souza, J.D.<sup>1</sup>; Argolo, A.C.C.M.<sup>1</sup>; Melo, C.M.L.<sup>2</sup>; Gusmão, N.B.<sup>2</sup>; Correia, M.T.S.<sup>1</sup>; Coelho, L.C.B.B.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica, <sup>2</sup>Departamento de Antibióticos, CCB, UFPE, Pernambuco, Brasil

Lectins are carbohydrate recognition proteins with important applications in biological and biotechnological researches. Antifungal effect of BmoLL and ClaveLL pure lectins were evaluated on *Fusarium* species. BmoLL (purified from *Bauhinia monandra* leaves) and ClaveLL (isolated from *Cladonia verticillaris* lichen) were applied on petri plate surfaces containing 10 ml of Yeast Nitrogen Base (YNB) agar medium; a fungal mycelium disk containing different *Fusarium* species (*F. solani*, *F. oxysporum*, *F. moniliforme*, *F. decemcellulare*, *F. lateritium*, *F. fusarioides* and *F. verticiloides*) was placed in the middle of plates. Lectin buffers and Cercobin constituted the negative and positive control, respectively. Plates were incubated at 28 °C for 72 h and fungi growth halos were measured. BmoLL inhibited strongly the growth of *F. solani* (72.5 %) and *F. lateritium* (57.15 %); *F. fusarioides* (27.8 %), *F. moniliforme* (24 %) and *F. verticiloides* (14.3 %) were less inhibited. ClaveLL showed antifungal activity to *F. verticiloides* (20 %), *F. fusarioides* (17.4 %) and *F. moniliforme* (11.1 %). The lectins, fungal growth inhibitors from different *Fusarium* species, will be evaluated with other fungal species parasites from plants and humans.

Keywords: lectin; antifungal activity; *Bauhinia monandra*; *Cladonia verticillaris*; *Fusarium*.

## **IMMOBILIZATION OF *BAUHINIA MONANDRA* LEAF LECTIN (BmoLL) ON SEPHAROSE CL-4B (BmoLL-SEPHAROSE) AND ITS EVALUATION FOR GLYCOPROTEIN PURIFICATION**

Souza, J.D.<sup>1</sup>; Silva, M.B.R.<sup>1</sup>; Argolo, A.C.C.<sup>1</sup> and Coelho, L.C.B.B.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Depto de Bioquímica, CCB, UFPE, PE

Plant lectins, a heterogeneous group of carbohydrate-binding proteins, differ from each other with respect to molecular structures and biological activities. A galactose-specific leaf lectin has been highly purified from *B. monandra* (BmoLL). The present study describes a simple immobilization protocol of BmoLL on Sepharose CL-4B (BmoLL-Sepharose) and its evaluation to isolate glycoproteins. The lectin was immobilized on CNBr-activated Sepharose and BmoLL-Sepharose was analyzed for binding of fetal bovine serum glycoproteins, asialofetuin and ovalbumin (0.5 mg) as well as glycoproteins from egg white crude extract and hog thyroid crude homogenate (0.5 ml). Chromatography was performed by application of samples into a 1 ml lectin column, at room temperature; fractions (1 ml) were collected. Unbound material was washed with 0.01 M citrate-phosphate buffer, pH 6.5, containing 0.15 M sodium chloride (selected buffer) until baseline absorbance readings. Adsorbed fractions were eluted with 0.05 M galactose in selected buffer followed by 1 M sodium chloride. No protein peaks were obtained with 0.05 M galactose but, after this previous stage, glycoprotein elution was performed with 1.0 M sodium chloride. BmoLL-Sepharose was efficient to adsorb bioselectively asialofetuin and ovalbumin as well as glycoproteins from fetal bovine serum, egg white and hog thyroid. Thus, BmoLL affinity matrix can be used to isolate glycoconjugates.

**Supported by:** CNPq, PRONEX/FACEPE, MCT/CNPq/PADCT.

**Key words:** lectins, *B. monandra*, glycoproteins