

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DOUTORADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Moléculas Bioativas de *Moringa oleifera*: Detecção,  
Isolamento e Caracterização**

**ANDRÉA DE FÁTIMA SILVA SANTOS**

**Recife - 2007**



**Moléculas Bioativas de *Moringa oleifera*: Detecção, Isolamento e Caracterização**

**ANDRÉA DE FÁTIMA SILVA SANTOS**

**Tese de doutoramento apresentada ao  
Doutorado em Ciências Biológicas da  
Universidade Federal de Pernambuco  
como pré-requisito para obtenção do  
título de Doutor em Ciências Biológicas,  
área de concentração em Biotecnologia.**

**Orientadora:** Profa. Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho

**Co-orientadora:** Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva

**Santos , Andréa de Fátima Silva.**

**Moléculas bioativas de Moringa Oleifera: detecção, isolamento e caracterização/ Andréa de Fátima Silva Santos. – Recife: O Autor, 2007.**

**vii, 112 folhas : il., fig., tab.**

**Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Biotecnologia. 2007.**

**Inclui bibliografia e anexo.**

**1. Moringa oleifera 2. Tratamento de água 3. Lectina 4. Atividade coagulante e antioxidante I. Título.**

**577.11 CDU (2.ed.)**

**UFPE**

**572 CDD (22.ed.)**

**CCB – 2007 - 030**

ATA DE DEFESA DE TESE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, NÍVEL DOUTORADO DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO.

Aos dezesseis dias do mês de fevereiro de dois mil e sete, às dez horas, no Auditório do Centro de Ciências Biológicas, realizou-se a defesa de tese apresentada pela doutoranda **Andréa de Fátima Silva Santos**, intitulada: "**Moléculas bioativas de *Moringa oleifera*: detecção, isolamento e caracterização**". A Banca Examinadora foi homologada em vinte e oito de dezembro de dois mil e seis, pela PROPESQ, tendo como membros titulares, os Professores: **Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho** (Orientador), Doutora PhD em Bioquímica, pela Universidade de Londres, Inglaterra, **Maria Tereza dos Santos Correia**, Doutora em Ciências Biológicas, pela Universidade Federal de São Paulo, **Adriana Carla Cavalcante Malta Argôlo**, Doutora em Ciências Biológicas, pela Universidade Federal de Pernambuco, **Maria das Graças Carneiro da Cunha**, Doutora em Biotecnologia, pela Universidade Técnica de Lisboa, **Rita de Cássia Moura do Nascimento**, Doutora em Ciências Biológicas, pela Universidade Federal de Pernambuco; **Vera Lúcia de Menezes Lima**, Doutora PhD em Bioquímica, pela Universidade de Londres, Inglaterra e **Patrícia Maria Guedes Paiva**, Doutora em Ciências Biológicas, pela Universidade Federal de São Paulo, como suplentes. A Prof<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Tereza Correia, Vice-Coordenadora deu início a Sessão para mais uma defesa de tese do Doutorado. Agradeceu pela presença dos convidados, em seguida passou a palavra para Prof<sup>a</sup>. Luana Coelho para continuar os trabalhos, que convidou à doutoranda para apresentação de sua tese, que efetuou durante quarenta e cinco minutos. Continuando, a presidenta solicitou à Banca Examinadora a ocupar seus lugares. A seguir procedeu-se à arguição na seguinte ordem: Dr.<sup>a</sup> Rita Cássia do Nascimento (1º examinador), Dr.<sup>a</sup> Maria das Graças Cunha (2º examinador), Dr.<sup>a</sup> Adriana Argôlo (3º examinador), Dr.<sup>a</sup> Tereza Correia (4º examinador), Dr.<sup>a</sup> Luana Coelho (5º examinador). Logo após, a presidenta teceu agradecimentos e em seguida solicitou dos convidados que se retirassem por alguns minutos a fim de proceder a avaliação da doutoranda. A Banca Examinadora atribuiu a **Andréa de Fátima Silva Santos** a seguinte menção: "**Aprovada com Distinção**" por unanimidade. Face ao resultado a mesma está apta a receber o grau de Doutor em Ciências Biológicas, Área **Biotecnologia** pela Universidade

Federal de Pernambuco. Nada mais havendo a tratar a sessão foi encerrada e para constar eu, Adenilda Eugênia de Lima, Secretária, lavrei, datei e assinei a presente ata que também assinam os demais presentes. Recife, 16 de fevereiro de 2007. 

Adriana Araújo.

Deuzia Correia  


Gláucia Aulino  


Matúcia de Queiroz Faria  


Andréia de Fátima Silva Santos

Lynthia de Oliveira Nascimento, Amanda Lucene R. de Lima

Felipe Roberto Bezerra Teixeira, Janyra D. S. Souza, Lucilda A.D.M.M. Kalim

Fabiana Bezerra de Melo, Regina Maria Sousa de Araújo,  
Marilena Brito Cabral Silva, Liane Salome de B. Santos

## **Agradecimentos**

A Deus pela vida e por todas as oportunidades que me proporciona sempre.

À Profa. Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho, pela orientação científica, experiência transmitida, amizade, conselhos, segurança, oportunidades, confiança depositada e por acreditar nos meus sonhos.

À Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva, pela orientação, incentivo, atenção, confiança, companheirismo e amizade.

À Coordenação, Professores e aos Funcionários do Doutorado em Ciências Biológicas.

Aos Professores e Funcionários do Departamento de Bioquímica, em especial as Professoras Maria Tereza dos Santos Correia e Maria das Graças Carneiro da Cunha, por todo apoio. A Maria Barbosa Reis, pela dedicação, amizade e colaboração, essenciais para realização deste trabalho e a João Virgínio, pela colaboração e amizade.

A todos os amigos do Laboratório de Glicoproteínas, por todos os momentos, conhecimentos compartilhados e amizade. Em especial à Cynthia, Michele, Vanessa, Danielly, Neyla, Cristina, Roberto, Fernando, Romero e à Luciana, pela dedicação, colaboração e confiança.

Em especial gostaria de agradecer a minhas amigas Adriana, Flávia, Mariana, Regina, Renata, Nathália e Priscila, por tudo e por provarem que a distância jamais poderá diminuir uma verdadeira amizade.

A todos os amigos do curso de Doutorado.

Ao Prof. Dr. José António Couto Teixeira pela oportunidade, apoio, orientação científica e confiança e à Profa. Dra. Regina de Oliveira Barros Nogueira, pelo acolhimento, orientação científica, experiência transmitida, incentivo, dedicação, confiança e amizade.

A todos do Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho (Braga/Portugal), pelo apoio e colaboração, especialmente à Ana Bela, Denise, Nelma, Lino, David e Daniel, pela amizade.

Agradeço especialmente aos amigos que fazem o Laboratório de Biofilmes: Alexandrina, Patrícia, Paula, Rui, Daniel e Gilberto, por todo apoio, carinho, experiência compartilhada e alegria constante que tornaram os meus dias em Portugal mais felizes.

Aos meus pais, Artur e Esmeraldina, aos quais não tenho palavras para expressar a minha eterna gratidão e admiração, me fazendo acreditar que vale sempre a pena tentar e acreditar que podemos. Aos meus irmãos, Saulo e Vivianne e aos meus cunhados Cláudia e Newton, por tudo. Ao meu sobrinho Luís Eduardo e aos afilhados Ian e Fernanda, que tornam minha vida mais feliz. A toda minha família, em especial às tias Fátima, Áurea, Vera, Jane e Neuza, pelo incentivo e força.

A António Rui por todo apoio, por tudo o que estamos vivendo e por me fazer acreditar que tudo vale a pena quando existe amor verdadeiro.

A todos os meus amigos pela torcida constante, em especial à Andreza, que mesmo distante, está sempre presente, e à Kika, por todo apoio e amizade.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Projeto Alfa VALNATURA pelo suporte financeiro.

**Valeu a pena? Tudo vale a pena  
Se a alma não é pequena.  
Quem quer passar além do Bojador  
Tem que passar além da dor.  
Deus ao mar o perigo e o abismo deu,  
Mas nele é que espelhou o céu.  
(Fernando Pessoa)**

**Aos meus pais.**

## SUMÁRIO

Sumário.....	i
Índice de Figuras.....	li
Índice de Tabelas.....	iv
Resumo.....	v
Abstract.....	vii
Capítulo 1 : Introdução.....	1
1.1 Lectinas.....	1
1.1.1 Propriedades Gerais.....	1
1.1.2 Purificação e Caracterização de Lectinas.....	4
1.1.3 Aplicações Biotecnológicas das Lectinas.....	7
1.2 Radicais Livres.....	9
1.3. Compostos Antioxidantes.....	10
1.4. Tratamento de Água.....	12
1.4.1 Coagulação.....	13
1.5 Substâncias Húmicas.....	15
1.5.1 Ácidos Húmicos.....	17
1.6 <i>Moringa oleifera</i> Lam.....	18
2. Objetivos.....	21
2.1. Objetivo Geral.....	21
2.2 Objetivos Específicos.....	21
3. Referências Bibliográficas.....	22
Capítulo 2: Isolamento de uma Lectina Coagulante de Sementes de <i>Moringa oleifera</i> .....	40
Capítulo 3: Isolation of a Coagulant Seed Lectin from <i>Moringa oleifera</i> .....	60
Capítulo 4: <i>Moringa oleifera</i> Lectin-binding Affinity to Humic Acids: Application to Water Treatment.....	79
Capítulo 5: Screening for Antioxidant Activity of <i>Moringa oleifera</i> .....	95
Capítulo 6: Conclusões e Perspectivas.....	111

## ÍNDICE DE FIGURAS

### Capítulo 1 – Introdução

Figura 1. Representação esquemática da aglutinação por lectinas.....	3
Figura 2. A: Cromatografia de troca iônica. B: Cromatografia de exclusão molecular. C: Cromatografia de afinidade.....	8
Figura 3. Estrutura hipotética do ácido húmico.....	17
Figura 4. Aspectos de <i>Moringa oleifera</i> . A: árvore; B: inflorescência; C: vagem; D: sementes; E: folha.....	20

### Capítulo 2 - Isolamento de uma lectina coagulante de sementes de *Moringa oleifera*

Figura 1. Purificação de lectina de sementes de <i>M. oleifera</i> (10 mg de proteínas) em coluna de gel de guar (10 x 1 cm).....	56
Figura 2. Eletroforese em gel de poliacrilamida (12%) de SSMoL (100 µg), tratada com β-mercaptoetanol (A) e desnaturada por aquecimento na presença de SDS (B).....	57
Figura 3. Peso molecular nativo de SSMoL em coluna de gel filtração Sephacryl S-300. Um pico de 30.000 daltons é representado.....	58
Figura 4. Atividade coagulante.....	59

### Capítulo 3 - Isolation of a coagulant seed lectin from *Moringa oleifera*

Figure 1. Purification of <i>M. oleifera</i> seed lectin (10 mg of protein) on a guar gel column (10.0 x 1.0 cm).....	75
Figure 2. Polyacrylamide gel electrophoresis (12%) of SSMoL (100 µg) β-mercapthoethanol treated (A) and without β-mercapthoethanol (B).....	76
Figure 3. SSMoL native molecular weight by Sephacryl S-300 gel filtration column.....	77
Figure 4. Coagulant activity of lectin preparations and SSMoL.....	78

#### **Capítulo 4 - *Moringa oleifera* lectin-binding affinity to humic acids: application to water treatment**

Figure 1. Comparison of the hemmaglutinating activity (HA) of <i>M. oleifera</i> lectin's preparations (black bars) with those obtained in the presence of a humic acid (white bars).....	91
Figure 2. Precipitation bands observed in an agarose gel corresponding to the interaction between a humic acid (C) and (A) <i>Moringa oleifera</i> extract, (B) (0-60)F, (D and E) SSMoL.....	92
Figure 3. Effect of the presence of mono- and divalent-ions on the hemmaglutinating activity (HA) of SSMoL measured in the presence of a humic acid.....	93
Figure 4. Coagulant activity with humic acid solution (10 mg/L of C).....	94

#### **Capítulo 5 - Screening for Antioxidant Activity of *Moringa oleifera***

Figure 1. Qualitative assay using silica gel TLC plates stained with 0.4 mM methanolic solution of DPPH.....	106
Figure 2. Kinetic behaviour of ethanolic extracts from <i>M. oleifera</i> . Reaction (515 nm) was performed with 5 mg/ml (A), 2.5 mg/ml (B) and 1.25 mg/ml (C) in a methanolic solution of DPPH.....	107
Figure 3. Chromatogram revealed with a methanolic solution of diphenylborinate-2-ethylamine specific to flavonoids.....	108

## ÍNDICE DE TABELAS

### Capítulo 1 – Introdução

Tabela 1. Classificação das substâncias húmicas.....	16
--	----

### Capítulo 2 - Isolamento de uma lectina coagulante de sementes de *Moringa oleifera*

Tabela 1. Concentrações de proteínas e atividade hemaglutinante específica de vários extratos de tecidos de <i>M. oleifera</i> .....	52
Tabela 2. Purificação de SSMoL.....	53
Tabela 3. Inibição da atividade hemaglutinante de extratos de tecidos com carboidratos e glicoproteínas.....	54
Tabela 4. Inibição de SSMoL por carboidratos e glicoproteínas.....	55

### Capítulo 3: Isolation of a coagulant seed lectin from *Moringa oleifera*

Table 1. Protein concentrations and specific hemagglutinating activities of various tissue extracts from <i>Moringa oleifera</i> .....	71
Table 2. Summary of SSMoL purification.....	72
Table 3 Inhibition haemmagglutinating activity of tissue extracts by carbohydrates and glycoproteins.....	73
Table 4. Inhibition of SSMoL by carbohydrates and glycoprotein.....	74

### Capítulo 5 - Screening for Antioxidant Activity of *Moringa oleifera*

Table 1. Percentage of total DPPH reacting with antioxidant ethanolic extract and amount of antioxidant from extracts decreasing initial concentration of DPPH by 50%.....	109
Table 2. Classes of compounds detected in <i>M. oleifera</i> extracts employed in this study.....	110

## Resumo

*Moringa oleifera* é uma planta tropical com grande importância econômica e de usos industriais e medicinais. Diferentes partes da planta são aplicadas e o extrato de sementes é comumente usado na purificação de água para consumo humano. Ácidos húmicos constituem uma significativa fração de matéria orgânica natural que ocorre em rios e constituem o maior problema nas estações de tratamento de água, porque reagem com o cloro formando subprodutos indesejáveis. O objetivo deste trabalho foi investigar a atividade hemaglutinante (AH) em tecidos de *M. oleifera*, purificar uma lectina de sementes solúvel em salina (SSMoL), avaliar a atividade coagulante de preparações lectínicas e SSMoL na água tratada com caolin e em solução de ácido húmico, caracterizar a afinidade de SSMoL com ácido húmico e investigar a atividade antioxidante em tecidos desta planta. A lectina foi isolada após extração da farinha em NaCl 0,15 M e cromatografia em gel de guar. Ensaio de AH foram realizados na presença de carboidratos, glicoproteínas, ácido húmico e compostos orgânicos halogenados. Experimentos de difusão com o ácido húmico e preparações lectínicas foram efetuados em gel de agarose. Atividade antioxidante foi investigada em extratos etanólicos (E1) e salinos (E2) de *M. oleifera* a partir de flores, raques da inflorescência e da folha, sementes, tecidos de folhas e tecido fundamental do tronco. A capacidade de capturar radical livre (RSC) de extratos e padrões antioxidantes foi determinada com *dot-blots* em placa de cromatografia em camada fina corada com solução do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) 0,4 mM. Ensaio espectrofotométricos foram realizados (515 nm); extratos foram analisados com vários reagentes para classe de compostos associados com atividade antioxidante. Atividade lectínica foi detectada em extratos salinos a partir de flores, raque da inflorescência, sementes, tecido de folha e tecido fundamental do tronco. SSMoL aglutinou eritrócitos de coelho e humanos e foi ativa na faixa de pH 4,0 a 9,0. Também, AH de extratos de tecidos e SSMoL foram inibidas por carboidratos e glicoproteínas; azocaseína e asialofetúina aboliram a AH de SSMoL. AH do extrato, fração e SSMoL diminuiu significativamente na presença do ácido húmico. Nenhum efeito foi observado na presença dos ácidos tricloroacético e dicloroacético ou clorofórmio. Bandas de precipitação foram observadas através de difusão em gel entre ácido húmico, preparações e SSMoL. A lectina básica foi termoestável a 100 °C durante 7

horas. SDS-PAGE, em condições redutoras, revelou duas bandas. Preparações de sementes e SSMoL apresentaram atividade coagulante similar ao controle positivo, sulfato de alumínio. Componentes antioxidantes foram detectados em todos E1 e E2 de flores, raque da inflorescência e tecido de folha por redução do DPPH após 30 min. Extrato de folha mostrou melhor RSC; antioxidantes presentes em E2 reagiram mais lentamente com o radical DPPH. Flavonóides foram detectados em E1 e E2; esteróides e triterpenóides foram detectados em E1. O cromatograma revelado com solução metanólica difenilborinato-2-etilamina (p/v) mostrou que flores, raques da inflorescência e da folha, bem como tecido de folha de E1 continham pelo menos três flavonóides com os mesmos valores de Rf (0,18, 0,38 e 0,44, respectivamente). Flor e folha de E2 mostraram pelo menos dois flavonóides (Rf 0,35, 0,63 e 0,16, 0,34, respectivamente). Quando DPPH foi usado para revelar o cromatograma, a presença de componentes antioxidantes foi confirmada em todos os extratos. Em conclusão, extratos de tecidos distintos de *M. oleifera* mostraram AH. Uma lectina foi purificada usando um método simples, após definido o protocolo. Extrato, fração e SSMoL mostraram propriedades coagulantes na água tratada com caolin e em solução de ácido húmico. Resultados similares foram encontrados com o sulfato de alumínio, o mais comum coagulante sintético usado no tratamento da água em todo mundo. Contudo, preparações de sementes de *M. oleifera* e SSMoL podem ser aplicadas no tratamento da água para remover ácidos húmicos. Extratos etanólicos e salinos de tecidos de *M. oleifera* possuem componentes antioxidantes.

**Palavras-chaves:** *Moringa oleifera*, purificação de água, lectina, atividade coagulante, ácido húmico, atividade antioxidante.

## **Abstract**

*Moringa oleifera* is a tropical plant of great economic importance with several industrial and medicinal applications. Many parts of the plant are used and the seed extract is commonly employed for water purification to human consumption. Humic acids constitute a significant fraction of natural occurring organic matter in freshwaters and a major problem in water treatment plants because they react with chlorine forming undesirable disinfection byproducts. The aim of this work was to investigate hemagglutinating activity (HA) in tissues of *M. oleifera*, to purify a saline soluble lectin from seeds (SSMoL), evaluate the coagulant activity of seed lectin preparations and SSMoL in kaolin treated water and humic acid solution, as well as, to characterize SSMoL affinity to bind humic acids and investigate the antioxidant activity in plant tissues. The lectin was isolated after 0.15 M NaCl flour extraction and guar gel column chromatography. Inhibition HA assays were carried out in the presence of carbohydrates, glycoproteins, humic acid, and halogenated organic compounds. Diffusion experiments with humic acid and lectin preparations were performed in an agarose gel. Antioxidant activity was investigated in *M. oleifera* ethanolic (E1) and saline (E2) extracts from flowers, inflorescence and leaf rachis, seeds, leaf tissue and fundamental tissues of stem. The radical scavenging capacity (RSC) of extracts and antioxidant standards were assayed using dot-blot on thin layer chromatography stained with a 0.4 mM 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH) solution. The spectrophotometric assays were recorded (515 nm); extracts were analysed using various reagents for classes of compounds associated with antioxidant activity. Lectin activity was detected in saline extracts from plant flowers, inflorescence rachis, seeds, leaf tissue and fundamental tissue of stem. SSMoL agglutinated erythrocytes from rabbit and human blood types; it was active at pH range 4.0 to 9.0. Also, tissue extracts and SSMoL hemagglutinating activities (HA) were inhibited by carbohydrates and glycoproteins; azocasein and asialofetuin abolished SSMoL activity. The HA of extract, fraction and SSMoL decreased significantly in the presence of humic acid. No measurable effect was observed in the presence of trichloroacetic and dichloroacetic acids or chloroform. The precipitation bands were observed in the diffusion gel between humic acid and lectin preparations and SSMoL. The basic lectin was thermostable at 100 °C during 7 hours. SDS-PAGE, under no reducing conditions, revealed two bands. Seed lectin preparations

and SSMoL showed coagulant activity similar to aluminium sulphate positive control. Antioxidant components were detected in all E1 and E2 from flowers, inflorescence rachis and leaf tissue by DPPH reduction after 30 min. Leaf tissue E1 showed the best RSC; antioxidants present in E2 reacted very slowly with DPPH radical. Flavonoids were detected in E1 and E2; steroids and triterpenoids were present in E1. The chromatogram revealed with (w/v) methanolic solution diphenylborinate-2-ethylamine showed that flower, inflorescence and leaf rachis as well as leaf tissue E1 contained at least three flavonoids with the same Rf values (0.18, 0.38 and 0.44, respectively). Flower and leaf E2 showed at least two flavonoids (Rf values 0.35, 0.63 and 0.16, 0.34, respectively). When DPPH was used to reveal the chromatogram, the presence of antioxidant components was confirmed in all extracts. In conclusion, extracts from distinct *M. oleifera* tissues showed HA. One lectin was purified from seed flour using a simple method, after defined the protocol. Extract, 0-60F and SSMoL showed water coagulant properties with kaolin treated water and with humic acid solution. Similar results were found with aluminium sulphate, the most common synthetic coagulant used in water treatment all over the world. However, *M. oleifera* seed preparations and SSMoL can be applied to water treatment to remove humic acids. *M. oleifera* ethanolic and saline tissues extracts have antioxidant components.

**Key-words:** *Moringa oleifera*, water purification, lectin, coagulant activity, humic acid, antioxidant activity.

# Capítulo 1

## 1 Introdução

### 1.1 Lectinas

#### 1.1.1 Propriedades Gerais

Em 1888, Herman Stillmark estudou a primeira lectina vegetal; observou que extrato de sementes de mamona (*Ricinus communis*) continha uma proteína tóxica que aglutinava eritrócitos, a qual chamou ricina (PEUMANS e VAN DAMME, 1998); com esse achado uma ampla área de aplicações de lectinas foi aberta (GABOR, KLAUSEGGER e WIRTH, 2001). Em 1889, H. Hellin demonstrou a presença de uma hemaglutinina tóxica em extrato de sementes de feijão jequiriti (*Abrus precatorius*), a qual chamou abrina. Em 1891, Paul Ehrlich introduziu as lectinas na pesquisa imunológica usando ricina e abrina (KENNEDY *et al.*, 1995); ele demonstrou que camundongos se tornaram imunes a doses letais de ricina após terem recebido repetidamente pequenas doses subcutâneas da toxina. Em 1897, Ehrlich determinou quantitativamente, pela primeira vez, um anticorpo *in vitro*, quando demonstrou que soro de camundongos imunes poderia neutralizar o efeito tóxico da ricina e que esta ação era específica, uma vez que o soro anti-abrina, de animais imunizados com abrina, não neutralizava os efeitos tóxicos da ricina e vice-versa. Dessa forma, Ehrlich estabeleceu um dos princípios fundamentais da imunologia: a especificidade da resposta imune (SHARON, 1989). Desde então uma diversidade de lectinas vem sendo isoladas, estudadas e clonadas (PEUMANS e VAN DAMME, 1998).

Em 1908, LANDSTEINER e RAUBITSCHKE observaram que um mesmo extrato de planta apresentava diferentes propriedades de aglutinação com células sanguíneas de animais diferentes. A concanavalina A (Con A) foi a primeira aglutinina de planta obtida na forma pura a partir de sementes de *Canavalia ensiformis*. SUMNER e HOWELL (1936) demonstraram que além de aglutinar células, a Con A precipitava glicogênio e amido a partir de solução e que sua atividade hemaglutinante podia ser inibida pelo açúcar de cana, sugerindo que a aglutinação se dava através de uma reação da proteína com carboidratos presentes na superfície dos eritrócitos (LIS e SHARON,

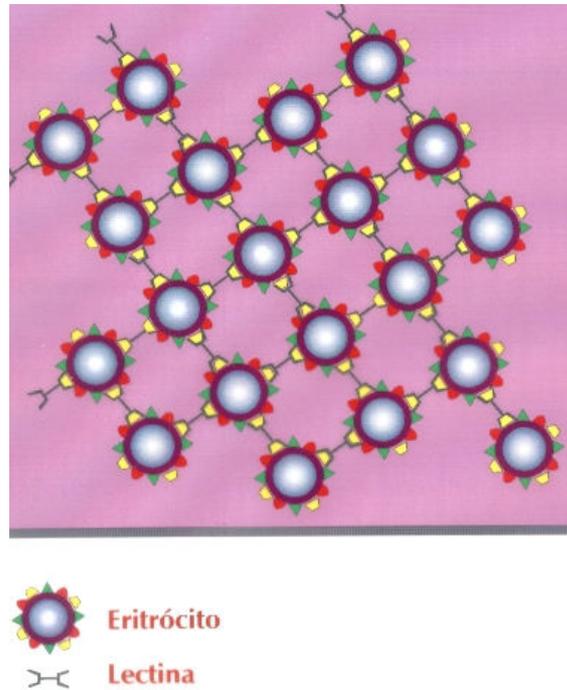
1981). Em 1945, William Boyd relatou que extratos salinos de *Phaseolus lunatos* ou *P. limensis* aglutinavam apenas eritrócitos humanos do tipo A e não os tipos B ou O. Em 1950, estudos com lectinas específicas para tipo sanguíneo, mostraram que a atividade hemaglutinante específica para eritrócitos humanos do tipo A, B e O foi inibida por  $\alpha$ -N-acetil-galactosamina,  $\alpha$ -galactose e  $\alpha$ -L-fucose, respectivamente (SHARON e LIS, 1972; KENNEDY *et al.*, 1995).

A partir de 1960, duas descobertas abriram novas perspectivas para as lectinas na pesquisa biológica. Peter Nowell observou que a aglutinina de *P. vulgaris*, conhecida como fitohemaglutinina ou PHA, possuía capacidade de estimular a mitose de linfócitos, resultando em um grande impacto na área imunológica. Em 1963, Joseph Aub relatou que a aglutinina de *Triticum vulgaris*, germe de trigo, aglutinou células malignas em concentrações muito mais baixas do que aquelas necessárias para a aglutinação de células normais (SHARON e LIS, 1987). Outras aglutininas, como por exemplo a Con A, a lectina de *Glycine max* (feijão-de-soja) também apresentaram essa capacidade de aglutinar preferencialmente células malignas, iniciando assim, um novo campo de estudo das lectinas.

Em 1995, PEUMANS e VAN DAMME definiram lectinas como proteínas que possuem pelo menos um domínio não-catalítico, que se ligam especificamente e reversivelmente a mono ou oligossacarídeos. A interação entre carboidratos e lectinas é obtida através de pontes de hidrogênio, coordenação metálica, interação de van der Waals e hidrofóbicas (ELGAVISH e SHAANAN, 1997). Lectinas possuem a habilidade de induzir o fenômeno de aglutinação celular e a presença dessas proteínas é detectada através de um ensaio de hemaglutinação (KENNEDY *et al.*, 1995). Nesse ensaio é feita uma diluição serial da lectina e incubação com eritrócitos humanos e outras espécies animais (Figura 1). Desde então, várias lectinas vem sendo isoladas e estudadas com detalhes nos níveis bioquímicos e/ou físico-químicos. Em adição, muitos genes de lectinas vem sendo clonados e a estrutura de diversas lectinas sendo resolvida por estudos de difração de raio-x (PEUMANS E VAN DAMME, 1998) e através de técnicas de cristalização (SOL *et al.*, 2007).

Muitas plantas acumulam lectinas em suas sementes ou tecidos vegetativos que são agrupadas de acordo com a ligação a carboidratos e os grupos de especificidade compreendem: fucose, manose, ácido siálico, N-acetilglicosamina, N-acetilgalactosamina-galactose e grupo glicanos complexos (PEUMANS e VAN DAMME, 1998). A definição da especificidade da lectina pode ser feita por ensaios da

inibição da atividade hemaglutinante (AH) com diferentes monossacarídeos, oligossacarídeos ou glicoproteínas ou por ensaios de precipitação de moléculas glicídicas (SHARON e LIS, 1990).



**Figura 1.** Representação esquemática da aglutinação por lectinas  
(Adaptada de KENNEDY *et al.*, 1995).

Baseado na estrutura global e propriedades de aglutinação e precipitação, lectinas de plantas são classificadas em merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas (PEUMANS e VAN DAMME, 1998). Merolectinas possuem apenas um sítio de ligação para carboidratos; devido à sua natureza monovalente são incapazes de precipitar glicoconjugados ou aglutinar células, sendo um exemplo deste grupo a proteína que se liga à quitina obtida do látex da seringueira (*Hevea brasiliensis*). Hololectinas contêm pelo menos dois sítios de ligação para carboidratos, idênticos ou muito similares; Devido à sua natureza di ou multivalente aglutinam células e ou precipitam glicoconjugados. A maioria das lectinas de plantas pertence ao grupo das hololectinas. Quimerolectinas são proteínas que possuem um ou mais sítios de ligação para carboidratos e outro sítio com atividade catalítica (ou outra atividade biológica) que funciona independentemente daquele de ligação para carboidratos. Dependendo do número de sítios para carboidratos, quimerolectinas agem como merolectinas ou hololectinas. Como exemplos de quimerolectinas existem as proteínas que inativam

ribossomos tipo 2. Superlectinas possuem pelo menos dois sítios de ligação para carboidratos diferentes; um exemplo de superlectina é a lectina do bulbo de tulipa, a qual possui dois sítios de ligação a carboidratos, sendo um específico para manose e outro para N-acetilgalactosamina (PEUMANS e VAN DAMME, 1998).

Muitas lectinas reconhecem diferenças entre antígenos de grupos sanguíneos; no grupo sanguíneo ABO, lectinas isoladas de *Dolichos biflorus*, *Vicia villosa*, *Phaseolus lunatus*, *Glycine max* e *Helix pomatia* potencialmente reconhecem o grupo sanguíneo A, outras como a de *Griffonia simplicifolia* I aglutinam B e *Ulex europaeus* I reconhece os grupos sanguíneos B e O (MATSUI *et al.*, 2001).

Lectinas são normalmente encontradas em plantas (COELHO e SILVA, 2000), microorganismos (KAWAGISHI *et al.*, 2001) e animais (ANTUNES e COELHO, 1993; ALPUCHE *et al.*, 2005) e estão envolvidas em numerosos processos celulares, como por exemplo: interações hospedeiro-patógeno, alvos de proteínas celulares e interações célula-célula (ELGAVISH e SHAANAN, 1997; HONG *et al.*, 2001). Nos últimos anos, foi observado que quando as plantas sofrem estímulos específicos bióticos ou abióticos, respondem com a expressão de lectinas citoplasmáticas ou nucleares. A localização e expressão dessas proteínas indicam que estão envolvidas em interações endógenas com carboidratos. Esses novos achados conduzem a idéia de que lectinas podem estar envolvidas na regulação e sinalização celular (VAN DAMME *et al.*, 2004).

Lectinas de plantas são abundantes em raízes, frutos, flores, cascas, folhas e sementes (RATANAPO *et al.*, 2001). Diferentes funções têm sido creditadas a essas lectinas, incluindo transporte de carboidratos, empacotamento e/ou mobilização de proteínas estocadas (RATANAPO, NGAMJUNYAPORN e CHULAVATNATOL, 2001), alongamento da parede celular, interações entre plantas e microorganismos e defesa contra o ataque de fungos, vírus, bactérias e insetos (LIENER *et al.*, 1986; RUDIGER, 1998).

### **1.1.2 Purificação e Caracterização de Lectinas**

Várias etapas são utilizadas para purificação de lectinas. A primeira etapa consiste na preparação de extratos em solução salina ou tampão. Uma vez apresentando atividade hemaglutinante, esses extratos podem ter suas lectinas parcialmente purificadas através de fracionamento salino com sulfato de amônio (diferentes concentrações) e

diálise exaustiva (KABIR *et al.*, 1998). A precipitação com sulfato de amônio pode estabilizar a atividade hemaglutinante, mesmo após longos períodos de armazenamento (KENNEDY *et al.*, 1995).

Diversas técnicas são usadas para purificação dessas proteínas. Lectinas podem ser purificadas através de membranas de afinidade em matriz de celulose modificada (BOI *et al.*, 2006), através de cromatografia de troca iônica (WANG e NG, 2001, YAN *et al.*, 2005) e gel filtração (NG e YU, 2001, REGO *et al.*, 2002). Contudo, devido à propriedade de ligação a carboidratos, cromatografia de afinidade em colunas contendo suportes polissacarídeos (MACHUKA *et al.*, 1999; COELHO e SILVA, 2000) ou glicoproteínas imobilizadas (KAWAGISHI *et al.*, 2001; KAUR *et al.*, 2005) tem sido a técnica mais comumente utilizada (Figura 2).

A cromatografia de troca iônica pode ser usada para separar as proteínas com cargas elétricas diferentes, uma vez que as proteínas são adsorvidas à matriz por meio das interações iônicas com o adsorvente (Figura 2A). A quebra das interações por modificação do pH ou por agentes que competem pelos grupos carregados da matriz adsorvente leva ao desprendimento de proteínas em frações distintas, dependendo da força de ligação de cada componente da amostra à matriz (KENNEDY *et al.*, 1995). Exemplos de trocadores utilizados para purificação de lectinas são DEAE-Celulose (NG e YU, 2001), CM-Celulose (PAJIC *et al.*, 2002), DEAE-Sephadex (RATANAPO *et al.*, 2001), Q- Sepharose e Mono S (WONG *et al.*, 2006) .

A cromatografia de exclusão por tamanho, também chamada de filtração em gel, separa as proteínas de acordo com o tamanho molecular. A coluna contém um polímero entrecruzado com os poros de tamanho selecionado. As proteínas maiores migram mais rapidamente que as menores; as proteínas grandes não penetram nos poros das esferas e, assim, tomam um caminho mais direto através da coluna (Figura 2B). Como exemplos de suportes utilizados na cromatografia de filtração em gel temos o Sephadex G-25 (ALPUCHE *et al.*, 2005) e Superdex 200 (WONG *et al.*, 2006).

Através da propriedade de reconhecimento a carboidratos, as lectinas podem ser purificadas por cromatografia de afinidade. Estas proteínas podem ser adsorvidas especificamente e com alta afinidade à molécula ligante imobilizada em suportes inorgânicos ou polissacarídeos insolúveis. A dessorção da lectina da matriz de afinidade pode ser efetuada biosseletivamente, usando um carboidrato como competidor, ou por mudanças de pH ou de força iônica (Figura 2C). As matrizes de afinidade são escolhidas de acordo com a especificidade da lectinas a carboidratos. Gel

de guar é uma dessas matrizes e consiste em um polissacarídeo com cadeias manose substituídas por resíduos de galactose  $\alpha$  1-6; é uma matriz versátil para isolamentos de lectinas ligantes de D-galactopiranosil e N-acetil-galactosaminil (COELHO e SILVA, 2000); outros exemplos de géis usados para cromatografia de afinidade são *Affi-gel blue* (WONG *et al.*, 2006) e Sepharose 4B (CHUMKHUNTHOD *et al.*, 2006).

Lectinas são purificadas das mais diversas fontes: hemolinfa do camarão branco *Litopenaeus setiferus* (ALPUCHE *et al.*, 2005), rizoma *Arundo donase* (KAUR *et al.*, 2005), fungo patogênico *Marchophomina phaseolina* (BHOWAL *et al.*, 2005), cogumelo *Schizophyllum commune* (CHUMKHUNTHOD *et al.*, 2006) e lectina de alga marinha vermelha *Gracilarea ornata* (LEITE *et al.*, 2005).

Nos mais diversos tecidos de plantas têm sido encontradas lectinas, como por exemplo, a lectina glicose/manose específica purificada da banana Imperador (*Musa basjoo*) por WONG e NG, 2006, lectina galactose específica purificada de folhas de *Bauhinia monandra* (COELHO e SILVA, 2000) e lectina de raízes, como a lectina de *Pseudostellaria heterophylla* (WANG e NG, 2001; 2006) e a lectina de *Astragalus mongholicus* (YAN *et al.*, 2005). As sementes são ricas fontes dessas proteínas (VEGA e PÉREZ, 2006); lectinas foram purificadas a partir de sementes do gênero *Artocarpus* (TRINDADE *et al.*, 2006), de sementes de *Crotalaria pallida* (REGO *et al.*, 2002) e também foram encontradas em sementes de *Moringa oleifera* (SANTOS *et al.*, 2005).

Lectinas distinguem-se entre si e entre outras proteínas de plantas pela capacidade de ligar a carboidratos simples ou complexos. Lectinas de plantas possuem uma ampla faixa de especificidade. Muitas lectinas possuem afinidade muito maior por oligossacarídeos do que por açúcares simples, devido ao fato de que os sítios de ligação para carboidratos são mais complementares para essas moléculas. Lectinas estruturalmente diferentes podem reconhecer os mesmos açúcares e a muitas lectinas são específicas para glicanos que não são originados de plantas (PEUMANS e VAN DAMME, 1998).

Lectinas isoladas de sementes diferem entre si além da estrutura, também de acordo com as propriedades físico-químicas e pela afinidade por carboidratos e/ou glicoproteínas. Por exemplo, a lectina isolada de *Sphenostyles stenocarpa* (MACHUKA *et al.*, 1999) apresenta uma estrutura oligomérica, um tetrâmero de massa molecular 122 kDa, sua atividade foi totalmente abolida após tratamento térmico (80 °C) e aglutinou eritrócitos de coelho e humanos com preferência para os tipos A e O. Outro exemplo seria a lectina de sementes de *Dolichos lablab* que é uma glicoproteína

galactose específica de massa molecular em torno de 120 kDa e estável até 40 °C (LATHA, RAO e NADIMPALLI, 2005).

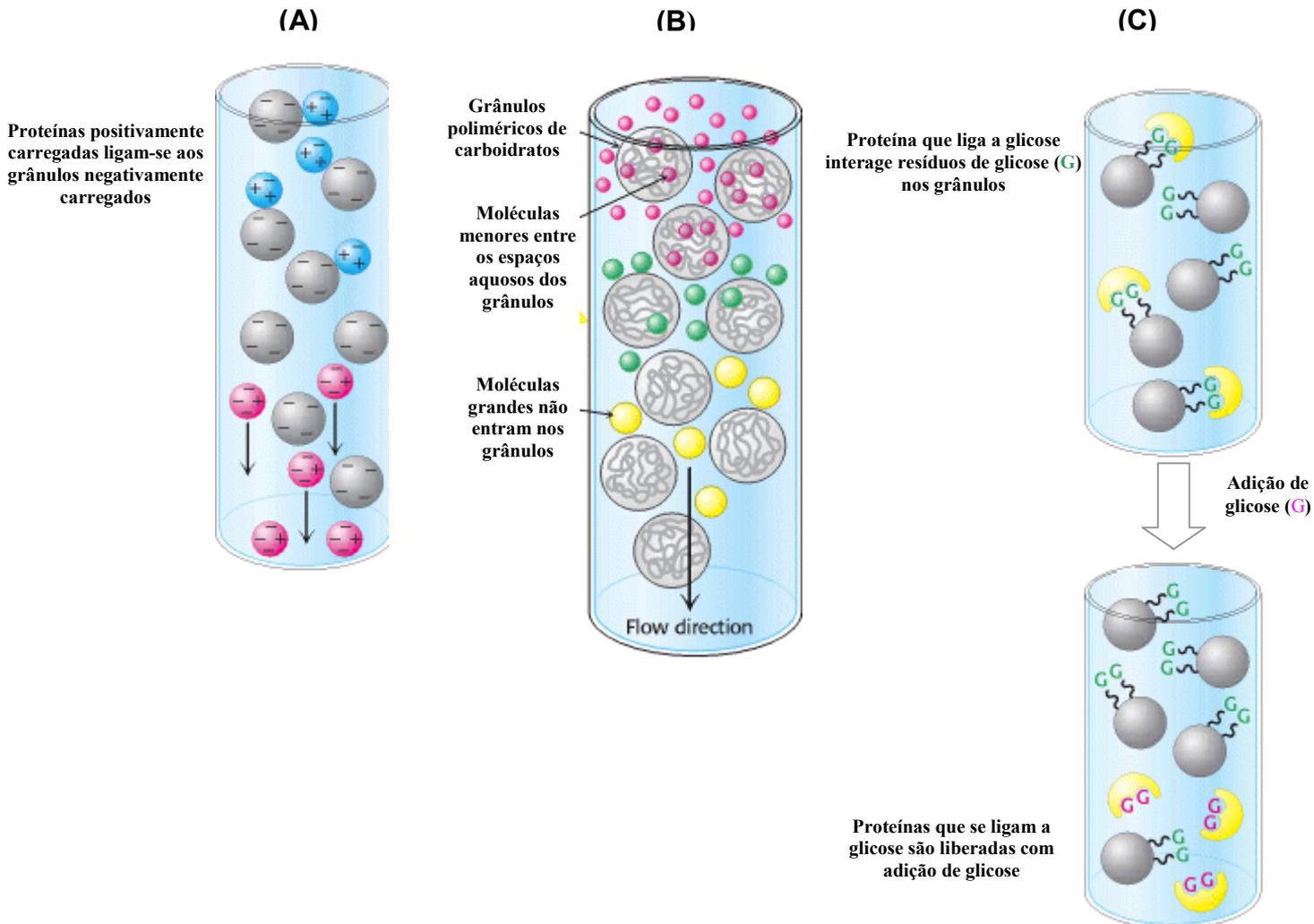
A eletroforese é uma técnica bastante utilizada para a caracterização estrutural de proteínas, assim como para o estabelecimento do grau de pureza. Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (presença de sulfato sódico de dodecila-SDS) e redutoras (presença de  $\beta$ -mercaptoetanol) revelam o grau de pureza, a composição de subunidades (PAJIC *et al.*, 2002) e através de coloração específica, a natureza glicoprotéica (COELHO e SILVA, 2000). A eletroforese em gel de poliacrilamida para proteínas sob condições não desnaturantes é utilizada para analisar a pureza de estruturas moleculares nativas.

### 1.1.3 Aplicações Biotecnológicas das Lectinas

A capacidade para ligar especificamente a carboidratos, faz das lectinas ferramentas importantes na pesquisa biotecnológica e biomédica onde são amplamente utilizadas. Lectina de sementes de *Salvia bogotensis* mostrou alta afinidade por antígenos de células tumorais e pode ser usada como ferramenta para estudos imunohistoquímicos e celulares (VEGA e PÉREZ, 2006). Devido à especificidade lectínica, que é comparável à especificidade dos anticorpos, essas proteínas podem ser aplicadas nos campos clínicos (MATSUÍ *et al.*, 2001). Lectina marcada com fluorescência é usada para visualização e caracterização bioquímica de polissacarídeos em biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* (STRATHMANN *et al.*, 2002).

Lectina de *Musa basjoo* tem propriedades de estimular macrófagos e inibir a proliferação de células leucêmicas (WONG e NG, 2006). Uma lectina galactose específica de uma variedade do feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) possui a capacidade de induzir a resposta mitogênica (WONG *et al.*, 2006). Essas duas lectinas inibem a transcriptase reversa do HIV-1 com perspectivas de aplicação clínica. KAUR *et al.* (2005) purificaram uma lectina de rizoma *Arundo donase* com atividade anti-proliferativa para linhagens de células cancerígenas e atividade mitogênica para células mononucleares periféricas. A propriedade de ligação a células tumorais torna as lectinas potenciais ferramentas bioadesivas na entrega de drogas (GABOR *et al.*, 2001). Algumas lectinas, como a de *Astragalus mongholtcus* possuem atividade anti-fúngica (YAN *et al.*, 2005) e outras como a de folhas de *Bauhinia monandra* possuem atividade inseticida (MACEDO *et al.*, 2007).

Progresso vem sendo observado na clonagem e análise molecular de genes de lectinas de plantas, bem como na expressão de lectinas em sistemas heterólogos (PEUMANS e VAN DAMME, 1998). ZHAO *et al.*, 2003 clonaram um gene da lectina de *Arisaema heterophyllum*, expressa em vários tecidos da planta.



**Figura 2.** A: Cromatografia de troca iônica. B: Cromatografia de exclusão molecular. C: Cromatografia de afinidade. (STRYER *et al.*, 2002).

## 1.2 Radicais Livres

Radicaís livres são espécies químicas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados; são moléculas eletricamente carregadas, as quais exteriorizam e capturam elétrons de outras substâncias para neutralizar-se. Embora o ataque inicial faça com que o radical livre torne-se neutralizado, outro radical livre é formado no processo, resultando numa reação em cadeia (KALIORA *et al.*, 2006).

Os radicaís livres exercem um importante papel nas causas de doenças como câncer, diabetes (MC CUNE e JOHNS, 2003), doenças neurodegenerativas e cardiovasculares (CHOI *et al.*, 2002), como na aterosclerose (KARIOLA *et al.*, 2006) e também atuam na deterioração de alimentos (ZANG e WANG, 2002). Deterioração na qualidade dos alimentos ocorre durante o processo de estocagem e está relacionado ao processo oxidativo catalizado freqüentemente por íons de ferro ou cobre. A degradação afeta principalmente lipídeos, carboidratos e proteínas (HINNEBURG *et al.*, 2006).

Espécies reativas de oxigênio tais como ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxila ( $\cdot OH$ ) são continuamente geradas dentro do corpo como consequência da exposição a químicos exógenos do meio ambiente e/ou a um número de processos metabólicos endógenos envolvendo enzimas redox e transferência bioenergética de elétrons. Em condições normais, as espécies reativas de oxigênio geradas são detoxificadas por antioxidantes presentes no corpo existindo um equilíbrio entre esses compostos. Contudo, com uma superprodução de espécies reativas de oxigênio e/ou inadequada defesa antioxidante, esse equilíbrio é rompido, culminando em um estresse oxidativo (SCHALLER, 2005, KAUR *et al.*, 2006). Várias reações bioquímicas do nosso corpo geram espécies reativas de oxigênio capazes de causar danos cruciais nas biomoléculas (KUMARAN e KARUNAKARAN, 2006). Fontes exógenas de radicaís livres incluem radiação, tabagismo, poluentes, solventes orgânicos e pesticidas (GÜLÇİN *et al.*, 2002).

O radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) vem sendo utilizado como um reagente para avaliar a atividade antioxidante de pequenas moléculas (SOLER-RIVAS *et al.*, 2000, KARTAL *et al.*, 2007). Esse radical pode reagir com uma molécula antioxidante ou uma espécie radical que o reduz e causa a mudança da cor violeta para amarela (MILARDOVIĆ *et al.*, 2006). O método DPPH independe da polaridade da amostra, é muito rápido, simples, sensível, reprodutível e não requer instrumentação especial (KOLEVA *et al.*, 2002). A capacidade antioxidante dos compostos puros ou

extratos de plantas pode ser avaliada pela captura desse radical sintético e estável em solução metanólica e temperatura ambiente (SULTANOVA *et al.*, 2001, ARGOLO *et al.*, 2004). A reação pode ser observada visualmente usando técnicas simples como cromatografia em camada delgada, bem como análise da intensidade da reação por ensaios espectrofotométricos (SÁNCHEZ-MORENO *et al.*, 1998; SOLER-RIVAS *et al.*, 2000). O radical DPPH é capturado por antioxidantes através da doação de hidrogênio para formar a molécula estável de DPPH reduzido. A redução do DPPH é seguida pelo monitoramento do decaimento de sua absorbância (515 nm) durante a reação que, sobre redução por um antioxidante, desaparece (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995).

Através de estudos feitos por BRAND-WILLIAMS *et al.* (1995), foi observado que a interação de um antioxidante com o DPPH, depende da sua conformação estrutural. Certos compostos reagem muito rapidamente com o DPPH, reduzindo o número de moléculas de DPPH correspondentes ao número de grupos hidroxil disponível. Contudo, na maioria dos compostos testados, o mecanismo é mais complexo.

Compostos antioxidantes presentes em rizoma de *Salvia miltiorrhiza* (CHOI *et al.*, 2001), folhas de *Bauhinia monandra* (ARGOLO *et al.*, 2004) e *Mentha spicata* (KANATT *et al.*, 2007), sementes de *Moringa oleifera* (SANTOS *et al.*, 2005), casca de *Pinus pinaster* e *Pinus radiata* (JEREZ *et al.*, 2007), flores de *Cassia siamea* (KAUR *et al.*, 2006) e óleo de *Ferula orientalis* (KARTAL *et al.*, 2007) possuem a capacidade de capturar o radical DPPH.

### **1.3 Compostos Antioxidantes**

Antioxidantes são moléculas capazes de estabilizar ou desativar radicais livres antes do ataque celular. Para proteger as células e os sistemas orgânicos do corpo contra espécies reativas de oxigênio, seres humanos possuem um evoluído sistema de proteção antioxidante altamente complexo que envolve uma variedade de componentes endógenos que funciona interativamente e sinergisticamente para neutralizar radicais livres.

Antioxidantes endógenos são absolutamente críticos para a ótima manutenção celular, para a saúde sistêmica e o bem-estar em geral. Entretanto, sob a exposição ao álcool, medicamentos, traumas, frios, infecções, toxinas, radiação, dietas pobres em

antioxidantes (como o ácido ascórbico, vitamina E, e carotenóides) ou atividade física árdua, a defesa antioxidante endógena não é adequada para neutralizar o estresse oxidativo e essa proteção é dependente de antioxidantes derivados da dieta (KALIORA *et al.*, 2006). O estresse oxidativo pode ser causa de diversas doenças, como por exemplo, o choque cardiocirculatório, sepsis e falência múltipla nos órgãos (CRIMI *et al.*, 2006).

Dietas ricas em antioxidantes protegem a saúde humana e esse efeito protetor é atribuído a nutrientes antioxidantes como Vitamina C e E,  $\beta$ -caroteno, polifenóis (KALIORA *et al.*, 2006), carotenóides e fenólicos de plantas, como por exemplo os flavonóides e fenilpropanóides (RICE-EVANS *et al.*, 1996). Vitamina C é hidrossolúvel e as principais fontes são as frutas cítricas, tomates e batatas. Vitamina E natural é uma mistura de tocoferóis e tocotrienóis sintetizados apenas por plantas; as fontes naturais de vitamina E são os óleos vegetais como o óleo de oliva que muitos dos seus efeitos benéficos são atribuídos a esse constituinte.  $\beta$ -caroteno é uma vitamina lipossolúvel encontrada em altas concentrações em vegetais como folhas verde-escuras (KALIORA *et al.*, 2006). Os flavonóides constituem uma grande classe de compostos muito comuns em plantas, contendo um número de grupos fenólicos hidroxil ligados a estruturas em anéis, conferindo a atividade antioxidante (RICE-EVANS, MILLER e PAGANGA, 1996) e possuem várias formas estruturais: flavonóis, flavonas, isoflavonas, flavononas, flavanol e antocianinas (KALIORA, DEDOUSSIS e SCHMIDT, 2006).

Terapia antioxidante é uma importante ferramenta no tratamento de desordens mediadas por radicais livres e isso justifica a pesquisa de fontes antioxidantes naturais (BRIANTE *et al.*, 2002). Plantas constituem uma importante fonte de produtos naturais ativos, os quais diferem em termos de estrutura e propriedades biológicas. Nos últimos anos, a prevenção de câncer e doenças cardiovasculares está associada com a ingestão de vegetais, frutas ou chás como fontes de antioxidantes naturais (JOHNSON, 2001; VIRGILI *et al.*, 2001). Existe uma grande evidência de que uma alta ingestão de tais compostos está associada com um baixo risco de mortalidade por essas doenças (LIM *et al.*, 2002), assim como diabetes (MCCUNE e JOHNS, 2002), hipertensão (AJITH e JANARDHANAN, 2002) e aterosclerose (BRACA *et al.*, 2002).

Vegetais como *Moringa oleifera*, *Mentha spicata*, cenoura (ARABSHAHI-D *et al.*, 2007), *Bauhinia monandra* (ARGOLO *et al.*, 2004), pinheiros das espécies *Pinus pinaster* e *Pinus radiata* (JEREZ *et al.*, 2007), legumes como *Phaseolus vulgaris* (ROCHA-GUZMÁN *et al.*, 2007), ervas culinárias como *Ocimum basilicum*, *Carum*

*carvi* e *Juniperus communis* (HINNEBURG *et al.*, 2006), chás como chá preto (WIDLANSKY *et al.*, 2005), café das espécies *Coffea arabica* e *Coffea canephora* (PARRAS *et al.*, 2006) e vinhos dos tipos branco e tinto (KATALINIĆ *et al.*, 2004) são ricos em compostos antioxidantes.

OVESNÁ *et al.* (2006) estudaram que antioxidantes atuam na proteção contra os danos causados pelos radicais livres nas células leucêmicas; KAUR *et al.* (2006) observaram que esses compostos dispõem de significativa proteção contra danos oxidativos no fígado e WIDLANSKY *et al.* (2005) viram que chás, como o chá preto, que contém flavonóides e componentes polifenólicos provavelmente influenciam favoravelmente a saúde vascular e diminuem o risco para doenças cardiovasculares.

Tocoferóis e seus metabólitos têm efeito protetor contra toxicidade dos metais (APPENROTH *et al.*, 2001);  $\beta$ -caroteno, em virtude da atividade antioxidante, aumenta a resposta imunológica, reduz neoplasma fotoinduzido, inibe mutagênese e reduz o crescimento de tumor *in vitro*, além de reduzir danos causados pelo estresse oxidativo induzido pela hipóxia (SARADA *et al.*, 2002).

Catequinas, polifenóis funcionais presentes em chá verde, são agentes antioxidantes e anticancerígenos não-tóxicos (TANG *et al.*, 2002). A atividade de capturar radicais livres por antioxidantes fenólicos é essencialmente determinada pela força das pontes de hidrogênio (ZHANG e WANG, 2002).

#### **1.4 Tratamento de Água**

A água constitui um recurso essencial à vida; um fator indispensável à sobrevivência da biosfera, do homem e de todas as outras espécies a ele associadas ou que com ele convivem. Devido às características físico-químicas próprias e que a definem, a água não se encontra em estado puro na natureza. A sua presença é acompanhada por substâncias estranhas presentes em solução e/ou em suspensão que afeta as suas capacidades potenciais de utilização podendo gerar problemas a nível de saúde pública, problemas econômicos e distúrbios ambientais (MENDES e OLIVEIRA, 2004). Existem muitas fontes de contaminação da água e esses contaminantes são principalmente substâncias do solo, provenientes de atividades agrícolas e industriais (GOPAL *et al.*, 2007).

O tratamento convencional da água inclui: coagulação, floculação, sedimentação, filtração e desinfecção. Coagulação e filtração são os processos mais

críticos e estão interligados, determinando o sucesso ou o fracasso dos sistemas de tratamento de água (GHEBREMICHAEL, 2004). Quando bem operados, os outros processos, como a floculação e a sedimentação, podem não ser requeridos (CONLEY, 1961; GHEBREMICHAEL, 2004) e o papel da desinfecção pode ser significativamente reduzido (GHEBREMICHAEL, 2004). A desinfecção por cloro é um importante passo no tratamento da água para o abastecimento público, contudo o cloro pode reagir com matéria orgânica natural presente na água e produzir subprodutos com efeitos prejudiciais a longo prazo. A formação desses compostos depende de outros fatores como temperatura, pH, dose, tempo de contato, compostos inorgânicos e matéria orgânica natural presentes na água. A formação desses subprodutos tem aumentado à necessidade de exploração de alternativas desinfectantes e novas tecnologias de tratamentos da água. Entre os subprodutos encontrados na água temos como exemplo os trihalometanos: clorofórmio, diclorobromometano, dibromoclorometano e bromofórmio e os ácidos haloacéticos: ácidos dicloroacético e tricloroacético (GOPAL *et al.*, 2007).

#### **1.4.1 Coagulação**

Em estações de tratamento de água, convencionalmente, ocorre agitação da água, seguida pela adição de coagulantes para reduzir a força repulsiva entre as partículas, aumentando a colisão dessas e a formação de flocos (MCCONHACHIE *et al.*, 1999). O coagulante tem um papel chave nesse processo. Coagulação/floculação é um processo comum no tratamento da água, o qual desestabiliza os materiais em suspensão e dissolvidos, sendo seguido por agregação em grandes flocos que são facilmente separados da água por subseqüentes processos de sedimentação e filtração (CHEN *et al.*, 2006).

A atividade floculante pode ser explicada por diferentes mecanismos. Proteínas catiônicas de alto peso molecular têm sua atividade floculante explicada pelo modelo de formação de pontes (GASSENSCHMIDT *et al.*, 1995). Floculação de partículas negativamente carregadas é resultante de ligações como forças de Coulomb entre macromoléculas carregadas positivamente e neutralização de parte das cargas. Geralmente, uma pequena parte das macromoléculas liga-se à superfície das partículas enquanto que a maior parte fica livre para se ligar a outra e isso leva a aglomeração e formação de flocos. O mecanismo de ligação de cargas pode ser aplicado a proteínas pequenas e básicas como a isolada por GASSENSCHMIDT *et al.* (1995); devido à

colisão de partículas, ocorre saturação interpartículas de setores diferentemente carregados e formação de flocos no local (GASSENSCHMIDT *et al.*, 1995). Após a floculação, ocorre a remoção dos flocos através da sedimentação por gravidade e/ou filtração (TOMASZEWSKA *et al.*, 2004).

Muitos coagulantes são amplamente usados em processos convencionais de tratamento de água para produção de água potável. Esses podem ser tanto coagulantes inorgânicos (sulfato de alumínio e cloreto de polialumínio), polímero orgânico sintético (derivados de poliacrilamida e polietileno imina) ou coagulantes naturais (quitosana e coagulantes microbianos). Contudo, estudos têm mostrado que o alumínio pode induzir a doença de Alzheimer e que monômeros de alguns polímeros orgânicos sintéticos como acrilamida possuem neurotoxicidade e fortes propriedades carcinogênicas (OKUDA *et al.*, 1999).

Polímeros orgânicos são comumente usados como coagulantes primários no tratamento de água (ÖZACAR e ŞENGİL, 2002), possuem alto peso molecular e forte tendência a adsorver partículas na superfície da suspensão aquosa. Esses polímeros podem ser classificados em catiônicos, aniônicos ou não iônicos. Polímeros catiônicos são freqüentemente usados como coagulantes primários; polímeros aniônicos ou não iônicos são referidos como floculantes. Polímeros orgânicos sintéticos vêm sendo usados como um coagulante efetivo nos sistemas de purificação de água, contudo possuem limitações; suas formulações contêm contaminantes como monômeros residuais e reagem com subprodutos que podem ter um potencial impacto negativo na saúde humana. Também foi observado que esses polímeros, usados como coagulantes, reagiram com cloro e formaram uma grande quantidade de compostos orgânicos voláteis carcinogênicos, como o clorofórmio e o benzeno e que a quantidade desses subprodutos aumenta com o aumento da turvação da água (LEE *et al.*, 1998).

Coagulantes naturais de origem vegetal foram usados para o tratamento da água antes do advento dos sais químicos e seu uso foi progressivamente diminuído (NDABGENGESERE e NARASIAH, 1998). Recentemente, o interesse por esses coagulantes tem ressurgido devido a serem biodegradáveis e seguros para a saúde humana (OKUDA *et al.*, 2001). ÖZACAR e ŞENGİL (2002) verificaram que taninos, compostos aromáticos policíclicos de alto peso molecular, encontrados freqüentemente em plantas, constituem um eficiente coagulante primário. ZHANG *et al.* (2006) estudaram as propriedades coagulantes do cacto no tratamento da água e diversos estudos vêm sendo feitos para avaliar a atividade de compostos coagulantes presentes

em sementes de *M. oleifera* (NDABIGENGESERE *et al.*, 1995; OKUDA *et al.*, 2001; GHEBREMICHAEL *et al.*, 2005).

### 1.5 Substâncias Húmicas

Diversos compostos orgânicos são gerados por processos biológicos encontrados na água, afetando significativamente o seu tratamento (MATILAINEN *et al.*, 2002). Esses compostos são caracterizados como uma mistura de frações hidrofílica e hidrofóbica. A fração hidrofílica é composta por ácidos carboxílicos, carboidratos e proteínas e a fração hidrofóbica é composta pelas substâncias húmicas (CROUE *et al.*, 2000). O processo de humificação inicia-se com a decomposição hidrolítica de resíduos vegetais com formação de substâncias simples de natureza aromática. Em seguida, há oxidação por enzimas microbianas levando à formação das substâncias húmicas (ROCHA e ROSA, 2003). Essas substâncias são importantes na conservação do solo e complexação de espécies metálicas nos sistemas aquáticos (ROSA *et al.*, 2000).

As substâncias húmicas presentes nos ecossistemas aquáticos existem em três classes: ácidos fúlvicos, ácidos húmicos e huminas (Tabela 1); todos são biomoléculas estruturalmente heterogêneas, cuja cor varia do amarelo ao preto e possuem peso molecular de elevado a moderado. Os ácidos fúlvicos são solúveis em qualquer pH, os ácidos húmicos são solúveis em pH acima de 2 e as huminas são insolúveis em qualquer faixa de pH (HESSEN e TRANVIK, 1998; MATILAINEN, 2006). A cor, devido à presença das substâncias húmicas, vem sendo um problema para a indústria de abastecimento de água. Substâncias húmicas exibem valores de absorvância UV específica (254 nm) relativamente alta e contêm grande número de carbonos aromáticos (PARK *et al.*, 2005).

A estrutura das substâncias húmicas é controversa. Alguns estudos sugerem a predominância de unidades aromáticas, outros sugerem que estruturas alifáticas estão presentes em larga escala. Muitos são os fatores que podem ser as causas dessas contradições, como a origem do material húmico, a técnica de extração, o método de purificação e as técnicas analíticas (AMIR *et al.*, 2006).

**Tabela 1.** Classificação das substâncias húmicas.

Ácido Fúlvico		Ácido Húmico		Humina
Amarelo claro	Amarelo escuro	Marrom escuro	Cinza	Preto
-Solúvel em água em qualquer condição de pH.		- Insolúvel em água em condições ácidas (pH<2); - Solúvel em elevados valores de pH.		- Insolúvel em água em qualquer condição de pH.

(Adaptada de STEVENSON, 1982)

O termo “substâncias húmicas solúveis” descreve uma mistura complexa e mal definida, com elevado peso molecular, que possui características alifáticas e aromáticas, contém grupos funcionais como carboxilas e fenóis; e agem como polieletrólitos em solução, contudo, o grau de dissociação dos grupos funcionais é dependente do pH (DAIFULLAH *et al.*, 2004). Essas substâncias são moléculas orgânicas que ocorrem naturalmente, sendo formadas pela separação de matérias animais e vegetais no meio ambiente.

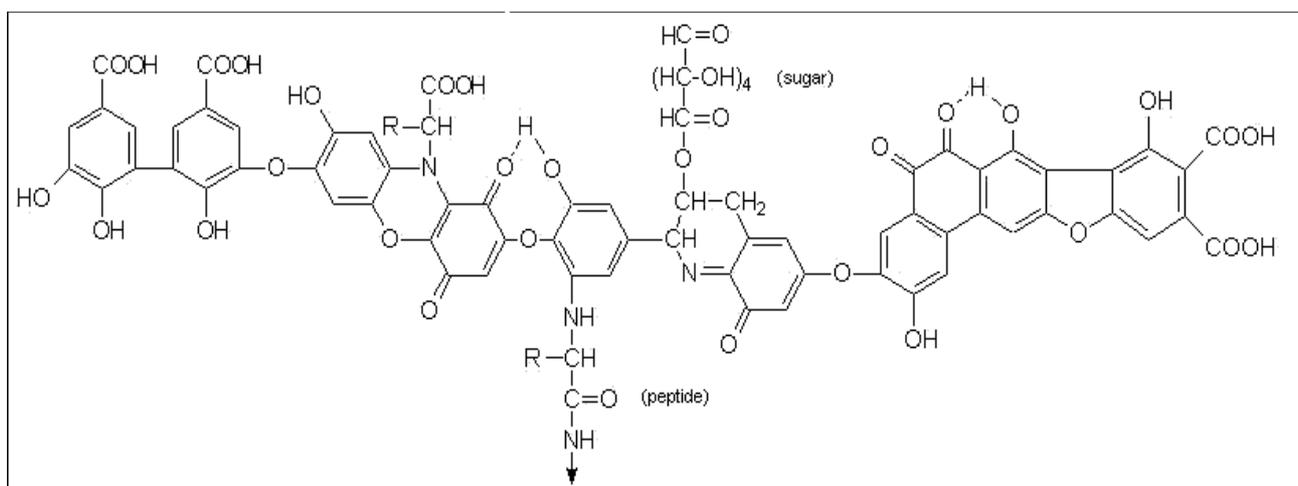
As substâncias húmicas aquáticas contribuem com cerca de 50% do carbono orgânico dissolvido presente em águas naturais (ROCHA e ROSA, 2003). Em lagos e rios, substâncias húmicas possuem uma cor escura e devem ser removidas para obtenção de água clara, própria para o consumo humano (MORIGUCHI *et al.*, 2005). Águas correntes carregam essas moléculas para o solo e eventualmente para os córregos, rios e reservatórios (DAIFULLAH *et al.*, 2004). O tratamento de água convencional processado por coagulação, assentamento e filtração na areia, já removeu entre 20 e 50% das substâncias húmicas dissolvidas (DAIFULLAH *et al.*, 2004). Nas estações de tratamento de água, para a remoção das substâncias húmicas ou da cor, a agregação por alumínio e o processo de adsorção com carvão são usados (MORIGUCHI *et al.*, 2005). Porém, uma pequena quantidade dessas substâncias ainda permanece na água tratada e através do processo de cloração e desinfecção é transformada em subprodutos orgânicos mutagênicos, como os trihalometanos (ROOK, 1974; BELLAR *et al.*, 1974; DAIFULLAH *et al.*, 2004; MORIGUCHI *et al.*, 2005) e outros compostos orgânicos halogenados (DAIFULLAH *et al.*, 2004). Esses subprodutos são distribuídos

no processo de abastecimento de água, em adição ao íon alumínio o qual pode ser neurotóxico (MORIGUCHI *et al.*, 2005).

### 1.5.1 Ácidos Húmicos

Ácidos húmicos são misturas heterogêneas de matéria orgânica oxidada, possuindo várias porções moleculares e grupos funcionais (SHIN *et al.*, 1999). Consistem em uma fração escura solúvel em álcali, mas insolúvel em ácido, com cerca de 58% em carbono (ROCHA e ROSA, 2003). O tamanho molecular dos ácidos húmicos é reportado de várias centenas a vários milhares de daltons e, a estrutura química (Figura 3), mostra padrões não repetitivos (SHIN *et al.*, 1999). Por se tratar de uma molécula complexa que varia em composição, dependendo da sua origem (animal, vegetal e microbiológica) a estrutura dos ácidos húmicos ainda não foi totalmente elucidada (MORAES *et al.*, 2004).

A presença de ácidos húmicos, como parte dos materiais orgânicos naturais, vem sendo um problema na indústria de água devido à sua solubilidade, extensa faixa de distribuição em peso molecular e tamanho, e devido à sua não biodegradabilidade (LI *et al.*, 2002). Processos tradicionais como a coagulação química, ou técnicas avançadas como adsorção em carbono ativado e nanofiltração são usadas para remover esses compostos da água (OWEN *et al.*, 1995; MATILAINEN *et al.*, 2006). Foi observado que a remoção dos ácidos húmicos por coagulação e adsorção em carbono ativado em pó mostrou uma redução da absorvância  $UV_{254nm}$  em torno de 99% (TOMASZEWSKA *et al.*, 2004). MORIGUCHI *et al.*, (2006) estudaram que a remoção das substâncias húmicas do meio aquoso pode ser feita em adsorventes de sílica modificada com  $Fe^{2+}$ ,  $Mg^+$  e  $Ca^{2+}$ .



**Figura 3.** Estrutura hipotética do ácido húmico (STEVENSON, 1982).

## 1.6 *Moringa oleifera* Lam.

*Moringa oleifera* Lamarck, planta pertencente à família das *Moringaceae* é nativa da Índia e amplamente cultivada nos trópicos de todo o mundo (KARADI *et al.*, 2006). Cresce rapidamente sendo capaz de sobreviver em solos pobres, requerendo o mínimo de atenção, e em longos períodos de seca (MCCONNACHIE *et al.*, 1999). Segundo JOLY (1979), *M. oleifera* é uma planta arbórea com longas vagens verdes, sementes aladas, folhas grandes e flores brancas perfumadas (Figura 4).

As árvores de *Moringa* podem alcançar 4 m de altura, gerando flores e frutos em um ano; múltiplas colheitas de sementes são possíveis em muitas partes do mundo (MCCONNACHIE *et al.*, 1999). Possui significativa importância econômica na indústria e medicina (MAKKAR e BECKER, 1996). Nas Filipinas, as folhas jovens, flores e vagens verdes são comuns na dieta (GUEVARA *et al.*, 1999); é usada medicinalmente em Guiné, La Reunion, Madagascar, Guiana e Burma (KARADI *et al.*, 2006); são consumidas por populações do sudoeste da Ásia que acreditam ter efeitos benéficos na visão (LIU *et al.*, 2007). Devido ao uso na medicina popular, estudos têm sido feitos visando o isolamento de compostos bioativos.

As folhas são boas fontes protéicas e não contêm taninos, lectinas ou inibidores de tripsina, segundo MAKKAR e BECKER (1996); a partir de extrato etanólico, delas têm sido obtidos compostos com atividade hipotensiva (FAIZI *et al.*, 1995), hormônios promotores do crescimento (MAKKAR e BECKER, 1996), compostos com atividade hipocolesterolêmica (GHASI *et al.*, 2000) e atividade contra a infecção com vírus herpes *simplex* tipo 1 (LIPUN *et al.*, 2003). Também possuem atividade antioxidante (IQBAL e BHANGER, 2006; LAKO *et al.*, 2007, REDDY *et al.*, 2005) e são ricas em polifenóis totais, quercetina, campferol e  $\beta$ -caroteno (LAKO *et al.*, 2007). TAHILIANI e KAR (1999) estudaram que o extrato aquoso de folhas de *M. oleifera* em baixa concentração pode ser usado para regulação do hipertireoidismo; RICHTER *et al.* (2003) observaram que as folhas de *M. oleifera* podem ser usadas para alimentar tilápias do Nilo substituindo 10% da dieta protéica sem alterar significativamente o crescimento desses peixes. Vacas alimentadas com folhagens de moringa tiveram aumento na produção sem alteração na composição de leite (SÁNCHEZ *et al.*, 2006).

Extratos aquosos e etanólicos de raízes de *M. oleifera* são dotados de atividade antiurolitíaca (KARADI *et al.*, 2006). As vagens possuem atividade anti-

lipidêmica (MEHTA *et al.*, 2003) e semelhantes às folhas, possuem atividade hipotensiva (FAIZI *et al.*, 1998). A casca do tronco de *M. oleifera* apresentou atividade hipoglicêmica (KAR *et al.*, 2003).

Sementes foram examinadas e apresentaram atividade hipotensiva (FAIZI *et al.*, 1998), antimicrobiana (GHEBREMICHAEL *et al.*, 2005, SPILIOTIS *et al.*, 1998), antitumoral (GUEVARA *et al.*, 1999), atividade anti-fúngica *in vivo* contra dermatófitos (CHUANG *et al.*, 2007) e antioxidante (SANTOS *et al.*, 2005). As sementes protegem animais contra o estresse oxidativo induzido pelo arsênico da biosfera, presente na água de beber e inalado e absorvido através da pele (GUPTA *et al.*, 2005), além de removerem esse composto da água (KUMARI *et al.*, 2006); SHARMA *et al.* (2006) estudaram a remoção do cádmio da água pelo processo de biossorção com as sementes descascadas, sendo uma tecnologia barata e segura para o meio ambiente. As sementes também são utilizadas para extração de óleo (ABDULKARIM *et al.*, 2005) e podem ser usadas no tratamento de água para uso doméstico (SULEYMAN e EVISON, 1995). SANTOS *et al.* (2005) observaram que uma lectina solúvel em água está presente em sementes desta planta.

OKUDA *et al.* (1999), estudaram que as sementes de *M. oleifera* possuem um coagulante extraído com NaCl 1 M com capacidade de coagulação 7,4 vezes maior do que o extraído em água. OKUDA *et al.* (2001) isolaram outro componente com propriedades coagulantes, que não foi detectado por métodos que quantificam proteínas, nem por análises para polissacarídeos e lipídeos; o pH ótimo para coagulação foi maior ou igual a 8 e após a coagulação, a concentração de carbono orgânico residual não aumentou. Foi definido que o coagulante é um polieletrólito orgânico de peso molecular 3.000 daltons.

GASSENSCHMIDT *et al.* (1995), utilizaram sementes de *M. oleifera* trituradas e desengorduradas e obtiveram a partir de extrato, em tampão fosfato, 3 frações contendo atividade floculante. Uma proteína caracterizada como sendo uma molécula catiônica de massa molecular 6.500 daltons foi isolada de uma das frações. A comparação da estrutura primária com seqüências de proteínas conhecidas não revelou significativa homologia. A atividade floculante da proteína foi similar à atividade de um polímero sintético catiônico.

Experimentos de coagulação com proteínas purificadas das sementes (NDABIGENGESERE e NARASIAH, 1998) revelaram que a dosagem ótima foi 0,5 a 1 mg/L e que a proteína foi totalmente solúvel em água; como coagulante, *M. oleifera*

pode ser um substituto em potencial para o alumínio (NDABIGENSERE *et al.*, 1995). Adicionalmente, os resultados obtidos por GHEBERMICHAEL *et al.* (2005) confirmaram que proteínas são os principais componentes ativos em extratos de sementes. KATAYON *et al.* (2006) observaram que as sementes de *M. oleifera* possuem potenciais coagulantes e podem ser usadas principalmente em águas com elevada turbidez e que a atividade coagulante tem o seu efeito diminuído com o aumento do tempo de estocagem das sementes.



(A)



(B)



(C)



(D)



(E)

**Figura 4.** Aspectos de *Moringa oleifera*. A: árvore; B: inflorescência; C: vagem; D: sementes; E: folha.

## 2 Objetivos

### 2.1 Geral

Isolar e caracterizar a lectina de sementes de *M. oleifera*, bem como avaliar atividades biológicas em preparações de diferentes tecidos da planta.

### 2.2 Específicos

- ✓ Propor um protocolo de purificação para obtenção da lectina de sementes de *M. oleifera*;
- ✓ Explorar a presença de lectina em tecidos de *M. oleifera*;
- ✓ Avaliar a atividade coagulante em preparações lectínicas e lectina de sementes de *M. oleifera* em água;
- ✓ Avaliar a interação da lectina com ácidos húmicos;
- ✓ Avaliar a atividade coagulante em preparações lectínicas e lectina de *M. oleifera* em água contendo ácidos húmicos;
- ✓ Investigar a presença de compostos com atividade antioxidante em tecidos de *M. oleifera*;
- ✓ Determinar a cinética de decaimento do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) pelo componente antioxidante.

### 3. Referências

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

AJITH, T. A.; JANARDHANAN, K. K. Antioxidant and antihepatotoxic activities of *Phellinus rimosus* (Berk) Pilat. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 81, p. 387-391, 2002.

ALPUCHE, J.; PEREYRA, A.; AGUNDIS, C.; ROSAS, C.; PASCUAL, C.; SLOMIANNY, M. C.; VÁZQUEZ, L.; ZENTENO, E. 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.

AMIR, S.; HAFIDI, M.; LEMEE, L.; MERLINA, G.; GUIRESSE, M.; PINELLI, E.; REVEL, J. C.; BAILLY, J. R.; AMBLES, A. Structural characterization of humic acids, extracted from sewage sludge during composting, by thermochemolysis–gas chromatography–mass spectrometry. *Process Biochemistry*, v. 41, p. 410-422, 2006.

ANIULYTE, J.; LIESIENE, J.; NIEMEYER, B. Evaluation of cellulose-based biospecific adsorbents as a stationary phase for lectin affinity chromatography. *Journal of Chromatography B*, v. 831, p. 24-30, 2006.

ANTUNES, R. V.; COELHO, L. C. B. B. Identification of lectin activity in the hemolymph of *Castnia licus* drury, a sugar-cane giant borer (*Lepidoptera-Castniidae*). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 47, p. 33-37, 1993.

APPENROTH, D.; KARGE, E.; KIEßLING, G.; WECHTER, W. J.; WINNEFELD, K.; FLECK, C. LLU- $\alpha$ , an endogenous metabolite of  $\gamma$ -tocopherol, is more effective against metal nephrotoxicity in rats than  $\gamma$ -tocopherol. *Toxicology Letters*, v. 122, p. 255-265, 2001.

ARABSHAHI-D, S.; DEVI, D. V.; UROOJ, A. Evaluation of antioxidant activity of some plant extracts and their heat, pH and storage stability. *Food Chemistry*, v. 100, p. 1100-1105, 2007.

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

BELLAR, T. A.; LICHTENBERG, R. C. K. The occurrence of organohalides in chlorinated drinking water. *J. WWA*, v. 66, p. 703, 1974.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. *Biochemistry*, 5. ed., New York, 2002.

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

BOI, C.; CATTOLI, F.; FACCHINI, R.; SORCI, M.; SARTI, G. C. Adsorption of lectins on affinity membranes. *Journal of Membrane Science* v. 273, p. 12-19, 2006.

BRACA, A.; SORTINO, C.; POLITI, M.; MORELLI, I.; Antioxidant activity of flavonoids from *Licania licaniaeflora*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 79, p. 379-381, 2002.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRIANTE, R.; CARA, F. L.; FEBBRAIO, F.; PATUMI, M.; NUCCI, R. Bioactive derivatives from oleuropein by a biotransformation on *Olea europaea* leaf extracts. *Journal of Biochemistry*, v. 93, p. 109-119, 2002.

CHEN, Z.; FAN, B.; PENG, X.; ZHANG, Z.; FAN, J.; LUAN, Z. Evaluation of Al<sub>3</sub>O polynuclear species in polyaluminum solutions as coagulant for water treatment. *Chemosphere*, v. 64, p. 912-918, 2006.

CHOI, Y.; JUNG, C.; LEE, S.; BAE, J.; BACK, W.; SUH, M.; PARK, J.; PARK, C. E. SUH, S. The green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate attenuates  $\beta$ - amyloid-induced neurotoxicity in cultured hippocampal neurons. *Life Sciences*, v. 70, p. 603-614, 2001.

CHOI, C. W.; KIM, S. C.; HWANG, S. S.; CHOI, B. K.; AHN, H. J.; LEE, M. Y.; PARK, S. H.; KIM, S. K. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Science*, v. 163, p. 1161-1168, 2002.

CHUANG, P.; LEE, C.; CHOU, J.; MURUGAN, M.; SHIEH, B.; CHEN, H. Anti-fungal activity of crude extracts and essential oil of *Moringa oleifera* Lam. *Bioresource Technology*, v. 98, p. 232-236, 2007.

CHUMKHUNTHOD, P.; RODTONG, S.; LAMBERT, S. J.; FORDHAM-SKELTON A. P.; RIZKALLAH, P. J.; WILKINSON, M. C.; REYNOLDS, C. D. Purification and characterization of an N-acetyl-D-galactosamine-specific lectin from the edible mushroom *Schizophyllum commune*. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1760, p. 326-332, 2006.

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.

CONLEY, W. R. Experience with anthracite-sand filters. *Journal AWWA*. v. 53, p. 1473-1478, 1961.

CRIMI, E.; SICA, V.; WILLIAMS-IGNARRO, S.; ZHANG, H.; SLUTSKY, A. S.; IGNARRO, L. J.; NAPOLI, C. The role of oxidative stress in adult critical care. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 40, p. 398-406, 1961.

CROUE, J.; KORSHIN, G. V.; BENJAMIN, M. Characterization of natural organic matter in drinking water. USA: AWWARF Am Water Works Assoc, 2000.

DAIFULLAH, A. A. M.; GIRGIS, B. S.; GAD, H. M. H. A study of the factors affecting the removal of humic acid by activated carbon prepared from biomass material. *Colloids and Surfaces A*, v. 235, p. 1-10, 2004.

ELGAVISH, S.; SHAANAN, B. Lectin-carbohydrate interactions: different folds, common recognition principles. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 22, p. 462-467, 1997.

FAIZI, S.; SIDDIQUI, B. S.; SALEEM, R.; SIDDIQUI, S.; AFTAB, K.; GILANI, A. U. H. Fully Acetylated carbamate and hypotensive thiocarbamate glycosides From *Moringa oleifera*. *Phytochemistry*, v. 38, p. 957-963, 1995.

FAIZI, S.; SIDDIQUI, B. S.; SALEEM, R.; AFTAB, K.; SHAHEEN, F.; GILANI, A. H. Hypotensive constituents from the pods of *Moringa oleifera*. *Planta Medica*, v. 64, p. 225-228, 1998.

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

FRANCO-FRAGUAS, L.; PLA, A.; FERREIRA, F.; MASSALDI, H.; SUAREZ, N.; BATISTA-VIERA, F. Preparative purification of soybean agglutinin by affinity chromatography and its immobilization for polysaccharide isolation. *Journal of Chromatography B*, v. 790, p. 365-372, 2003.

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.

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

GHASI, S.; NWOBODO, E.; OFILI, J. O. Hypocholesterolemic effects of crude extract of leaf of *Moringa oleifera* Lam in high-fat diet fed wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 69, p. 21-25, 2000.

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

GHEBREMICHAEL, K. A. Moringa seed and pumice as alternative natural materials for drinking water treatment. Tese (Pós-doutorado) - Department of Land and Water Resources Engineering - Royal Institute of Technology (KTH), Stockholm, Sweden, 2004.

GOPAL, K.; TRIPATHY, S. S.; BERSILLON, J. L.; DUBEY, S. P. Chlorination byproducts, their toxicodynamics and removal from drinking water. *Journal of Hazardous Materials*, v. 140, p. 1-6, 2007.

GUEVARA, A. P.; VARGAS, C.; SAKURAI, H.; FUJIWARA, Y.; HASHIMOTO, K.; MAOKA, T.; KOZUKA, M.; ITO, Y.; HARUKUNI, T.; NISHINO, H. An antitumor promoter from *Moringa oleifera* Lam. *Mutation Research*, v. 440, p. 181-188, 1999.

GÜLÇİN, I.; OKTAY, M.; KUFREVUIĞLU, O. I.; ASLAN, A. Determination of antioxidant activity of lichen *Cetraria islandica*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 79, p. 325-329, 2002.

GUPTA, R.; KANNAN, G. M.; SHARMA, M.; FLORA, S. J. S. Therapeutic effects of *Moringa oleifera* on arsenic-induced toxicity in rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 20, p. 456-464, 2005.

HESSEN, D. O.; TRANVIK, L. J. Aquatic Humic Substances - Ecology and Biogeochemistry. Springer, New York, 1998.

HINNEBURG, I.; DORMAN, H. J. D.; HILTUNEN, R. Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. Food Chemistry, v. 97, p. 122-129, 2006.

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.

IQBAL, S.; BHANGER, M. I. Effect of season and production location on antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaves grown in Pakistan. Journal of Food Composition and Analysis, v. 19, p. 544-551, 2006.

JEREZ, M.; SELGA, A.; SINEIRO, J.; TORRES, J. L.; NUÑEZ, M. J. A comparison between bark extracts from *Pinus pinaster* and *Pinus radiata*: Antioxidant activity and procyanidin composition. Food Chemistry, v. 100, p. 439-444, 2007.

JOHNSON, I. T. Antioxidants and antitumour properties. In: Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M. (Eds.), Antioxidants in Food. Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, p. 100-123, 2001.

JOLY, A. B. Botânica: Introdução à taxonomia vegetal. 5. ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1979.

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.

KALIORA, A. C.; DEDOISSIS, G. V. Z.; SCHMIDT, H. Dietary antioxidants in preventing atherogenesis. Atherosclerosis, v. 187, p. 1-17, 2006.

KANATT, S. R.; CHANDER, R.; SHARMA, A. Antioxidant potential of mint (*Mentha spicata* L.) in radiation-processed lamb meat. Food Chemistry, v. 100, p. 451-458, 2007.

KAR, A.; CHOUDHARY, B. K.; BANDYOPADHYAY, N. G. Comparative evaluation of hypoglycaemic activity of some Indian medicinal plants in alloxan diabetic rats. Journal of Ethnopharmacology, v. 84, p.105-108, 2003.

KARADI, R.V.; GADGE, N. B.; ALAGAWADI, K. R.; SAVADI, R. V. Effect of *Moringa oleifera* Lam. root-wood on ethylene glycol induced urolithiasis in rats. Journal of Ethnopharmacology, v. 105, p. 306-311, 2006.

KARTAL, N.; SOKMEN, M.; TEPE, P.; DAFERERA, D.; POLISSIOU, M.; SOKMEN, A. Investigation of the antioxidant properties of *Ferula orientalis* L. using a suitable extraction procedure. Food Chemistry, v. 100, p. 584-589, 2007.

KATALINI, V.; MILOS, M.; MODUN, D.; MUSI, I.; BOBAN, M. Antioxidant effectiveness of selected wines in comparison with (+)-catechin. Food Chemistry, v. 86, p. 593-600, 2004.

KATAYON, S.; NOOR, M. J. M. M.; ASMA, M.; ABDUL, G. L. A., THAMER, A. M.; AZNI, I.; AHMAD, J.; KHOR, B. C.; SULEYMAN, A. M. Effects of storage conditions of *Moringa oleifera* seeds on its performance in coagulation. Bioresource Technology, v. 97, p. 1455-1460, 2006.

KAUR, A.; SINGH, J.; KAMBOJ, S. S.; SEXANA, A. K.; PANDITA, R. M.; SHAMNUGAVEL, M. Isolation of an N-acetyl-D-glucosamine specific lectin from the rhizomes of *Arundo donax* with antiproliferative activity. Phytochemistry, v. 66, p. 1933-1940, 2005.

KAUR, G.; ALAM, M. S.; JABBAR, Z.; JAVED, K.; ATHAR, M. Evaluation of antioxidant activity of *Cassia siamea* flowers. Journal of Ethnopharmacology, v. 108, p. 340-348, 2006.

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

KENNEDY, J. F.; PAIVA, P. M. G.; COREIA, 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.

KOLEVA, I. I.; VAN BEEK, T. A.; LINSSEN, J. P. H.; DE GROOT, A.; EVSTATIEVA, L. N. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochemical Analysis*, v. 13, p. 8-17, 2002.

KUMARAN, A.; KARUNAKARAN, R. J. Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of *Coleus aromaticus*. *Food Chemistry*, v. 97, p. 109-114, 2006.

KUMARI, P.; SHARMA, P.; SRIVASTAVA, S.; SRIVASTAVA, M. M. Biosorption studies on shelled *Moringa oleifera* Lamarck seed powder: Removal and recovery of arsenic from aqueous system. *International Journal of Mineral Processing*, v. 78, p. 131-139, 2006.

LAKO, J.; TRENERRY, V. C.; WAHLQVIST, M.; WATTANAPENPAIBOON, N.; SOTHEESWARAN, S.; PREMIER, R. Phytochemical flavonols, carotenoids and the antioxidant properties of a wide selection of Fijian fruit, vegetables and other readily available foods. *Food Chemistry*, v. 101, p. 1727-1741, 2007.

LATHA, V. L.; RAO, R. N.; NADIMPALLI, S. K. 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, p. 296-306, 2005.

LEE, J. F.; LIAO, P. M.; TSENG, D. H.; WEN, P. T. Behavior of organic polymers in drinking water purification. *Chemosphere*, v. 37, p. 1045-1061, 1998.

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

LI, X. Z.; LI, F. B.; FAN, C. M.; SUN, Y. P. Photoelectrocatalytic degradation of humic acid in aqueous solution using a Ti/TiO<sub>2</sub> mesh photoelectrode. *Water Research*, v. 36, p. 2215-2224, 2002.

LIENER, I. E.; SHATON, N.; GOLDESTINEIN, I. J. The Lectins: properties, functions, and applications in biology and medicine. Orlando: Academic Press, p. 371-435, 1986.

LIMA, V. L. M.; CORREIA, M. T. S.; CECHINEL, Y. M. N.; SAMPAIO, C. A. M.; OWEN, J. S.; COÊLHO, 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.

LIM, K. T.; IJU, C.; KITTS, D. D. Antioxidant activity of a *Rhus verniciflua* Stokes ethanol extract. *Food and Chemical Toxicology*, v. 39, p. 229-237, 2002.

LIPIPUN, V.; KUROKAWA, M.; SUTTISRI, R.; TAWEECHOTIPATR, P.; PRAMYONTHIN, P.; HATTORI, M.; SHIRAK, K. Efficacy of Thai medicinal plant extracts against herpes simplex virus type 1 infection in vitro and in vivo. *Antiviral Research*, v. 60, p. 175-180, 2003.

LIU, Y.; PERERA, C. O.; SURESH, V. Comparison of three chosen vegetables with others from South East Asia for their lutein and zeaxanthin content. *Food Chemistry*, v. 101, p. 1533-1539, 2007.

MACEDO, M. L. R.; FREIRE, M. G. M.; 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, Part A, in press, 2007.

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.

MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Nutritional value and antinutritional components of whole and ethanol extracted *Moringa oleifera*. *Animal feed science and technology*, v. 63, p. 211-228, 1996.

MATILAINEN, A.; LINDQVIST, N.; KORHONEN, S.; TUHKANEN, T. Removal of NOM in the different stages of the water treatment process. *Environment International*, v. 28, p. 457-465, 2002.

MATILAINEN, A.; VIENO, N.; TUHKANEN, T. Efficiency of the activated carbon filtration in the natural organic matter removal. *Environment International*, v. 32, p. 324-331, 2006.

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.

MCCONHACHIE, G. L.; FOLKARD, G. K.; MTAWALI, M. A.; SUTHERLAND, J. P. Field trials of appropriate hydraulic flocculation processes. *Water Research*, v. 33, p. 1425-1434, 1999.

MC CUNE, L. M.; JOHNS, T. Symptom-Specific Antioxidant Activity of Boreal Diabetes Treatments. *Pharmaceutical Biology*, v. 41, p. 362-370, 2003.

MEHTA, L. K.; BALARAMAN, R.; AMIN, A. H.; BAFNA, P. A.; GULATI, O. D. Effect of fruits of *Moringa oleifera* on the lipid profile of normal and hypercholesterolaemic rabbits Journal of Ethnopharmacology, v. 86, p. 191-195, 2003.

MENDES, B; OLIVEIRA J. F. S. Qualidade da água para consumo humano. Editora LIDEL. Lisboa, 2004.

MILARDOVIĆ, S.; IVEKOVIC, D.; GRABARIC, B. S. A novel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical. Bioelectrochemistry, v. 68, p. 175-180, 2006.

MORAES, S. L.; LANDGRAF, M. D.; REZENDE, M. O. O. Caracterização de ácidos húmicos de diferentes origens por eletroforese capilar de zona. Eclética Química, v. 29, p. 47-52, 2004.

MORIGUCHI, T.; YANO, K.; TAHARA, M.; YAGUCHI, K. Metal-modified silica adsorbents for removal of humic substances in water. Journal of Colloid and Interface Science, v. 283, p. 300-310, 2005.

MORIGUCHI, T.; TAHARA, M.; YAGUCHI K. Adsorbability and photocatalytic degradability of humic substances in water on Ti-modified sílica. Journal of Colloid and Interface Science, v. 297, p. 678-686, 2006.

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

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

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 & Cell Biology, v. 33, p. 269-277, 2001.

OKUDA, T.; BAES, A. U.; NISHIJIMA, W.; OKADA, M. Improvement of extraction method of coagulation active components from *Moringa oleifera* seed. Water Research, v. 33, p. 3373-3378, 1999.

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

OVESNÁ, Z.; KOZICS, K.; SLAMENŇOVÁ, D. Protective effects of ursolic acid and oleanolic acid in leukemic cells. Mutation Research, v. 600, p. 131-137, 2006.

ÖZACAR, M.; ŞENGİL, I. A. The use of tannins from turkish acorns (*Valonia*) in water treatment as a coagulant and coagulant Aid. Journal of Environment Science, p. 26, v. 255-263, 2002.

OWEN D. M.; AMY, G. L.; CHOWDHURY, Z. K.; PAODE, R.; MCCOY, G.; VISCOSIL, K. NOM characterization and treatability. Journal of the American Water Works Association, v. 87, p. 46-63, 1995.

PAIVA, P. M. G.; SOUZA, A. F.; OLIVA, M. L. V.; KENNEDY, J. F.; CAVALCANTI, M. S. M.; COELHO, L. C. B. B.; SAMPAIO, C.A.M. Isolation of a trypsin inhibitor from *Echinodorus paniculatus* seeds by affinity chromatography on immobilized *Cratylia mollis* isolectins. Bioresource Technology, v. 88, p. 75-79, 2003.

PAJIC, I.; KLJAJIC, Z.; DOGOVIC, N.; SLADIC, D.; JURANIC, Z.; GASIC, M. J. A novel lectin from the sponge *Haliclona cratera*: isolation, characterization and biological activity. Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & Pharmacology, v. 132, p. 213-221, 2002.

PARK, N.; KWON, B.; KIM, S.; CHO, J. Characterizations of the colloidal and microbial organic matters with respect to membrane foulants. Journal of Membrane Science, v. 275, p. 29-36, 2005.

PARRAS, P.; MARTÍNEZ-TOME, M.; JIMENEZ, A. M.; MURCIA, M. A. Antioxidant capacity of coffees of several origins brewed following three different procedures. *Food Chemistry*, in press, 2006.

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.

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

REDDY, V.; UROOJ, A.; KUMAR, A. Evaluation of antioxidant activity of some plant extracts and their application in biscuits. *Food Chemistry*, v. 90, p. 317-321, 2005.

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

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 20, p. 933-56 1996.

RICHTER, N.; SIDDHURAJU, P.; BECKER, K. Evaluation of nutritional quality of Moringa (*Moringa oleifera* Lam.) leaves as an alternative protein source for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *Aquaculture*, v. 217, p. 599-611, 2003.

ROCHA, J. C.; ROSA, A. H. Substâncias húmicas aquáticas - Interação com espécies metálicas. Editora UNESP, São Paulo, 2003.

ROCHA-GUZMÁN, N. E.; GONZÁLEZ-LAREDO, R. F.; IBARRA-PÉREZ, F. J.; Nava-Berúmen, C. A.; Gallegos-Infante, J., A. Effect of pressure cooking on the antioxidant activity of extracts from three common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars. *Food Chemistry*, v. 100, p. 31-35, 2007.

ROOK, J. J. Formation of haloforms during chlorination of natural waters. *Water Treatment Examination*, v. 23, p. 234, 1974.

ROSA, A. H.; VICENTE, A. A.; ROCHA, J. C.; TREVISAN, H. C. A new application of humic substances: activation of supports for invertase immobilization. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, v. 368, p. 730-733, 2000.

ROSENFELD, H.; ANIULYTE, J.; HELMHOLZ, H.; LIESIENE, J.; THIESEN, P.; NIEMEYER, B.; PRANGE, A. Comparison of modified supports on the base of glycoprotein interaction studies and of adsorption investigations. *Journal of Chromatography A*, v. 1092, p. 76-88, 2005.

RUDIGER, H. Plant lectins-more than just tools for glycoscientists: occurrence, structure, and possible functions of plant lectins. *Acta Anatomica (Basel)*, v. 161, p. 130-152, 1998.

SÁNCHEZ, N. R.; SPÖRNDLY, E.; LEDIN, I. Effect of feeding different levels of foliage of *Moringa oleifera* to creole dairy cows on intake, digestibility, milk production and composition. *Livestock Science*, v. 101, p. 24-31, 2006.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 76, p. 270-276, 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.

SARADA, S. K. S.; DIPTI, P.; ANJU, B.; PAULINE, T.; KAIN, A. K.; SAIRAM, M.; SHARMA, S. K.; ILAVAZHAGAN, G.; KUMAR, D.; SELVAMURTHY, W. Antioxidant effect of beta-carotene on hypoxia induced oxidative stress in male albino rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 79, p. 149-156, 2002.

SCHALLER, B. Prospects for the future: the role of free radicals in the treatment of stroke. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 38, p. 411-425, 2005.

SHARMA, P.; KUMARI, P.; SRIVASTAVA, M.M.; SRIVASTAVA, S. Removal of cadmium from aqueous system by shelled *Moringa oleifera* Lam. seed powder. *Bioresource Technology*, v. 97, p. 299-305, 2006.

SHARON, N. A centenary of lectins: Impact on immunology. *Cellular Basis of Immune Modulation*, p. 609-620, 1989.

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

SHARON, N.; LIS, H. Lectins: cell-agglutinating and sugar specific proteins. *Science*, v. 177, p. 949-959, 1972.

SHARON, N.; LIS, H. A century of lectin research (1888-1988). *Trends in Biochemical Sciences*, v. 12, p. 488-491, 1987.

SHIN, H. S.; MONSALLIER, J. M.; CHOPPIN, G. R. Spectroscopic and chemical characterizations of molecular size fractionated humic acid. *Talanta*, v. 50, p. 641-647, 1999.

SOLER-RIVAS, C.; ESPÍN, J. C.; WICHERS, H. J. An easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of foodstuffs. *Phytochemical Analysis*, v.11, p.1-9, 2000.

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

SPILIOTIS, V.; LALAS, S.; GERGIS, V.; DOURTOGLOU, V. Comparison of antimicrobial activity of seeds of different *Moringa oleifera* varieties. *Pharmaceutical and Pharmacological Letters*, v. 8, p. 39-40, 1998.

STRATHMANN, M.; WINGENDER, J.; FLEMMING, H. C. Application of fluorescently labelled lectins for the visualization and biochemical characterization of polysaccharides in biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Microbiological Methods*, v. 50, p. 237-248, 2002.

SULTANOVA, N.; MAKHMOOR, T.; ABILOV, Z. A.; PARWEEN, Z.; OMURKAMZINOVA, V. B.; RAHMAN, A.; CHOUDHARY, M. I. Antioxidant and antimicrobial activities of *Tamarix ramosissima*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 78, p. 201-205, 2001.

SULEYMAN, A. M.; LILIAN, M. E. *Moringa oleifera* seeds for softening hardwater. *Water Research*, v. 29, p. 1099-1105, 1995.

TAHILIANI, P.; KAR, A. Role of *Moringa oleifera* leaf extract in the regulation of thyroid hormone status in adult male and female rats. *Pharmacological Research*, v. 41, p. 319-323, 1999.

TANG, S. Z.; KERRY, J. P.; SHEEHAN, D.; BUCKLEY, D. J. Antioxidative mechanisms of tea catechins in chicken meat systems. *Food Chemistry*, v. 76, p. 45-51, 2002.

TOMASZEWSKA, M.; MOZIA, S.; MORAWSKI, A. W. Removal of organic matter by coagulation enhanced with adsorption on PAC. *Desalination*, v. 161, p. 79-87, 2004

TRINDADE, M. B.; LOPES, J. L. S.; SOARES-COSTA, A.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C.; MOREIRA, R. A.; OLIVA, M. L. V.; BELTRAMINI, L. M. Structural

characterization of novel chitin-binding lectins from the genus *Artocarpus* and their antifungal activity. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1764, p. 146-152, 2006.

WANG, H. X.; NG, T. B. A novel lectin from *Pseudostellaria heterophylla* roots with sequence similarity to Kunitz-type soybean trypsin inhibitor. *Life Sciences*, v. 69, p. 327-333, 2001.

WANG, H. X.; NG, T. B. Concurrent isolation of a Kunitz-type trypsin inhibitor with antifungal activity and a novel lectin from *Pseudostellaria heterophylla* roots. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 342, p. 349-353, 2006.

WIDLANSKY, M. E.; DUFFY, S. J.; HAMBURG, N. M.; GOKCE, N.; WARDEN, B. A.; WISEMAN, S.; KEANEY, J. F.; FREI, J. B.; VITA, J. Á. Effects of black tea consumption on plasma catechins and markers of oxidative stress and inflammation in patients with coronary artery disease. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 38, p. 499-506, 2005.

WONG, J. H.; NG, T. B. 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*, v. 38, p. 234-243, 2006.

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

VAN DAMME, E. J. M.; BARRE, A.; ROUGE, P.; PEUMANS, W. J. Cytoplasmic/nuclear plant lectins: a new story. *Trends in Plant Science*, v. 9, p. 484-489, 2004.

VEGA, N.; PÉREZ, G. Isolation and characterization of a *Salvia bogotensis* seed lectin specific for the Tn antigen. *Phytochemistry*, v. 67, p. 347-355, 2006.

VIRGILI, F.; SCACCINI, C.; PACKER, L.; RIMBACH, G. Cardiovascular disease and nutritional phenolics. In: Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M. (Eds.), *Antioxidants in Food*. Woodhead Publishing Ltd, Cambridge, p. 87-99, 2001.

YAN, Q.; JIANG, Z.; YANG, S.; DENG, W.; HAN, L. A novel homodimeric lectin from *Astragalus mongholicus* with antifungal activity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 442, p. 72-81, 2005.

ZHANG, H.; WANG, L. Theoretical elucidation on structure–antioxidant activity relationships for indolinonic hydroxylamines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 12, p. 225-227, 2002.

ZHAO, X.; YAO, J.; LIAO, Z.; ZHANG, H.; CHEN, F.; WANG, L.; LU, Y.; SUN, X.; YU, S.; TANG, K. Molecular cloning of a novel mannose-binding lectin gene from *Arisaema heterophyllum*. *Plant Science*, v. 165, p. 55-60, 2003.

## Capítulo 2

### **Isolamento de uma Lectina Coagulante de Sementes de *Moringa oleifera***

Artigo submetido para concorrer ao **XXII PRÊMIO JOVEM  
CIENTISTA - 2006**

**Tema:** Gestão Sustentável da Biodiversidade - desafio do milênio

**Linha de pesquisa:** Instrumentos econômicos e tecnológicos aplicados à conservação e ao uso sustentável da biodiversidade

## **Isolamento de uma lectina coagulante de sementes de *Moringa oleifera***

Andréa F. S. Santos\*; Luciana A. Luz; Maria B. R. Silva; Adriana C. C. Argolo;  
Patrícia M. G. Paiva & Luana C. B. B. Coelho

Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas (CCB),  
Departamento de Bioquímica, Rua Prof. Nelson Chaves S/N, 50670-901, Cidade  
Universitária, Recife-PE, Brasil.

\* Corresponding author. Tel: 005581 35233990.

E-mail address: andrefatimass@hotmail.com (Andréa F. S. Santos).

### **Resumo**

*Moringa oleifera* é uma planta tropical, com grande importância econômica na indústria e na medicina; muitas partes da planta têm sido usadas. Folhas, flores e vagens verdes são comestíveis; efeito hipocolesterolêmico foi encontrado em extrato de folhas e frutos; as sementes contêm atividades hipotensiva, antioxidante, e constituem um poderoso agente quimio-preventivo. O extrato das sementes é geralmente utilizado no processo de purificação de água para consumo humano. A atividade da lectina foi detectada em extratos salinos das flores, raque da inflorescência, sementes, tecido da folha e tecido fundamental do caule. O objetivo deste trabalho foi purificar uma lectina solúvel em salina, de sementes de *M. oleifera* (SSMoL) e avaliar a atividade coagulante de preparações lectínicas de sementes e de SSMoL purificada. A lectina foi isolada após a extração da farinha em NaCl 0,15 M e cromatografia em coluna contendo gel de guar. SSMoL aglutinou eritrócitos de coelho e humanos; foi ativa na escala de pH 4,0 - 9,0. A atividade hemaglutinante (AH) dos extratos dos tecidos de *M. oleifera* e SSMoL foi inibida por carboidratos e glicoproteínas; asocaseína e asialofetuína aboliram a AH de SSMoL. A lectina foi termoestável a 100 °C durante sete horas. SSMoL é uma proteína básica; eletroforese em gel de poliacrilamida contendo sulfato sódico de dodecila (SDS-PAGE) em condições não redutoras, revelou duas bandas polipeptídicas. Preparações lectínicas de sementes e SSMoL mostraram atividade coagulante semelhante ao controle positivo, sulfato de alumínio.

Palavras chaves: Lectina; *Moringa oleifera*; atividade hemaglutinante; atividade coagulante; tratamento de água.

## 1 Introdução

Sementes são ricas em lectinas, classe de proteínas hemaglutinantes que existe em várias formas de vida, mas as mais estudadas são as extraídas de plantas, talvez devido à abundante disponibilidade e fácil isolamento (Jeyaprakash *et al.*, 2005).

Lectinas interagem seletiva e reversivelmente com resíduos de carboidratos específicos (Franco-Fraguas *et al.*, 2003). O número e especificidade dos sítios de ligação para açúcares, bem como a grande disponibilidade é a base para classificação dessas proteínas. O grupo mais numeroso inclui hololectinas, proteínas com dois ou mais sítios de ligação para carboidratos, idênticos ou similares (Peumans e Van Damme, 1998). Em adição aos sítios de ligação para carboidratos, algumas lectinas possuem domínios responsáveis pelas interações entre as proteínas. Essa característica estrutural resulta em ferramentas para uso terapêutico (Thies *et al.*, 2005, Vega e Pérez, 2006) bem como, propostas biotecnológicas (Fraguas *et al.*, 2004). Lectinas podem ser purificadas por cromatografia de afinidade (Bajpai *et al.*, 2005, Vega e Pérez, 2006). Imobilizadas (Aniulyte *et al.*, 2006) constituem um usual método de purificação para isolar importantes biomoléculas, tais como glicoproteínas do plasma, incluindo lecitina-colesterol aciltransferase (Lima *et al.*, 1999), polissacarídeos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* (Franco-Fraguas *et al.*, 2003) e peroxidase (Fraguas *et al.*, 2004).

Polímeros vêm sendo aplicados nos processos de coagulação/floculação da purificação de água durante décadas (Özacar e Şengil, 2002). Coagulantes naturais de origem vegetal foram usados no tratamento da água antes do advento dos químicos sintéticos como, por exemplo, os sais de alumínio e ferro (Ndabigengesere *et al.*, 1995).

*Moringa oleifera* (Lam), planta da família das Moringaceae, vem sendo usada na dieta das Filipinas; folhas, flores e vagens verdes são comestíveis e classificadas como vegetais nutritivos (Guevara *et al.*, 1999). As sementes contêm atividade hipotensiva (Faizi *et al.*, 1995), atividade antioxidante e constituem um poderoso agente quimio-preventivo (Guevara *et al.*, 1999). Propriedades coagulantes das sementes vêm sendo

usadas para o tratamento da água (Okuda *et al.*, 1999; Ghebremichael *et al.*, 2005). Sementes descascadas de *M. oleifera* possuem a capacidade de descontaminar a água que contém arsênico e pode ser usada como uma tecnologia doméstica segura e que não causa danos para o meio-ambiente (Kumari *et al.*, 2006). Efeito hipocolesterolêmico também foi encontrado em extrato de folhas (Ghasi *et al.*, 2000) e frutos (Mehta *et al.*, 2003).

Neste trabalho foi investigada a presença de proteínas hemaglutinantes em extratos de tecidos de *M. oleifera*. Uma lectina de sementes, apresentando atividade coagulante, também foi isolada e parcialmente caracterizada.

## **2 Materiais e Métodos**

### **2.1 Preparações dos extratos**

Flores, raque da inflorescência, sementes, tecido de folha, tecido fundamental do tronco e casca do tronco de *M. oleifera* Lam foram manualmente coletadas na cidade de Recife, Nordeste do Brasil. Uma amostra do material coletado foi arquivada como espécime de número 63184, IPA, no herbário “Dárdano de Andrade Lima” (Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária, Recife, Brazil). Farinhas de tecidos de *M. oleifera* foram extraídas com NaCl 0,15 M durante 6 h, em temperatura ambiente e resultou em extratos salinos (E) de flores (E1), raque da inflorescência (E2), sementes (E3), tecido de folha (E4), tecido fundamental do tronco (E5) e casca do tronco (E6).

### **2.2 Fracionamento salino**

Proteínas de todos os extratos foram precipitadas usando sulfato de amônio 0-60% durante 4 h, em temperatura ambiente.

### **2.3 Atividade hemaglutinante (AH)**

AH foi realizada em placas de microtitulação de acordo com Correia e Coelho (1995). Preparações lectínicas (50 µL) foram serialmente diluídas em NaCl 0,15 M antes da adição de 50 µL de uma suspensão 2.5% (v/v) de eritrócitos de coelho tratados com

glutaraldeído ou eritrócitos não tratados de humanos. O título foi expresso como a maior diluição que mostrou atividade hemaglutinante.

#### **2.4 Efeito do pH, temperatura e cátions divalentes**

O efeito do pH na AH foi avaliado com SSMoL (50 µL) diluída em tampão citrato-fosfato 10 mM (pH 3,0 – 6,5) ou tampão fosfato de sódio 10 mM (pH 7,0 - 8.0) ou tampão Tris-HCl 10 mM (pH 8,5 – 9,0) e em seguida, eritrócitos de coelho foram adicionados. A termo-estabilidade da lectina foi avaliada com aquecimento prévio (30 °C a 90 °C, até 30 min e subsequente 100°C, a cada 30 min, até 7 h) e suspensão 2.5% (v/v) de eritrócitos de coelho. Ensaios para requerimento de cátions divalentes foram realizados por diálise com EDTA e AH foi medida com MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub> e KCl<sub>2</sub>.

#### **2.5 Inibição da atividade hemaglutinante**

Ensaios de inibição da AH foram avaliados com extratos e SSMoL com soluções de carboidratos: D(-)-frutose, D(+)-rafinose, D(+)-glicose e D(+)-manose. A atividade de SSMoL foi também avaliada com soluções de D(+)-lactose, (+)-arabinose, trealose, L(+)-raminose e galactose. Extratos e SSMoL foram testados com soluções de glicoproteínas 0,5 mg/mL (fetuína, asialofetuína, ovalbumina, caseína e asocaseína). Extratos também foram testados com tiroglobulina. Os ensaios inibitórios foram similares aos ensaios hemaglutinantes, com exceção de um passo de incubação (temperatura ambiente, 15 min) antes da adição dos eritrócitos.

#### **2.6 Avaliação de proteínas**

A proteína foi estimada de acordo com Lowry *et al.* (1951) e por absorbância a 280 nm.

#### **2.7 Isolamento da lectina (SSMoL)**

F0-60 foi cromatografada (10 mg de proteínas) em uma coluna de gel de guar (5 x 1 cm) previamente equilibrada (fluxo de 20 mL/h) com NaCl 0,15 M. A banda protéica ativa foi eluída com NaCl 1,0 M.

## 2.8 Caracterização das lectinas

O peso molecular de SSMoL foi estimado por eletroforese em gel de poliacrilamida com sulfato sódico de dodecila (SDS-PAGE) como descrito por Laemmli (1970). PAGE para proteínas nativas básicas e ácidas foram realizados de acordo com Reisfeld *et al.* (1962) e Davis (1964), respectivamente. Os géis foram corados com Azul Brilhante de Coomassie para proteínas (Laemmli, 1970) ou usando reagente de Schiff para carboidratos (Sigma) de acordo com *Pharmacia Fine Chemicals* (1980). O peso molecular nativo foi determinado por coluna de gel filtração *Sephacryl S-300* (com NaCl 0,5 M, fluxo 20 mL/h) usando os marcadores de pesos moleculares (albumina sérica bovina: 66 kDa, fetuína: 64 kDa, ovoalbumina: 44 kDa e ovoinibidor: 28 kDa).

## 2.9 Ensaio da atividade coagulante

O ensaio da atividade coagulante foi baseado no método descrito por Ghebremichael *et al.* (2005). Inicialmente, a amostra de água de torneira foi tratada com caolin (10 g/L), agitada por 30 min e deixada em repouso durante 24 h para a completa hidratação. A turbidez desejada foi obtida por diluição. Uma alíquota (100 µL) das amostras (extrato de *M. oleifera*, F0-60 e SSMoL) e controle positivo (sulfato de alumínio 5%) foram adicionados à suspensão de maior turbidez (900 µL, 250-300 NTU) em cubeta de 1 mL e instantaneamente homogeneizada. Diluição (1:2) da suspensão foi feita, uma menor turbidez foi obtida e as amostras foram testadas. Amostras foram decantadas por 1 h e a absorbância foi medida a 500 nm usando um espectrofotômetro UV-visível FEMTO 700 S. A partir do topo da cubeta, 800 µL da amostra foram transferidos para uma outra cubeta e a absorbância foi medida. Redução na absorbância em relação ao controle definiu a atividade coagulante.

## 3 Resultados e Discussão

Farinha de sementes de *M. oleifera* vem sendo amplamente usada nos países desenvolvidos como um coagulante natural para o tratamento de água para consumo humano. AH foi detectada em extrato de sementes e em todos os outros extratos obtidos de tecidos de *M. oleifera*. As maiores atividades específicas, contudo, foram detectadas

em extratos obtidos da casca do tronco, flores e raque da inflorescência (Tabela 1); o último tecido vem sendo consumido pela população (Makkar e Becker, 1996; Iqbal e Bhangar, 2006). A atividade lectínica geral foi similar à detectada em extratos de tecidos de *Bauhinia monandra* (Coelho e Silva, 2000).

Quando F0-60 (Atividade hemaglutinante específica, AHE: 371) de sementes *M. oleifera* foi cromatografada em coluna de gel de guar (Figura 1) AH foi detectada no não adsorvido (AHE: 35) e frações eluídas com NaCl 1 M (AHE: 864). A lectina com maior AHE, foi denominada SSMoL (do inglês, *Saline Soluble M. oleifera Lectin*), e correspondeu a 59 % da atividade cromatografada (Tabela 2). Cromatografia de afinidade purificou eficientemente SSMoL, com bom rendimento, assim como foi observado anteriormente em outras proteínas isoladas (Coelho e Silva, 2000; Roy *et al.*, 2005). Uma lectina solúvel em água, WSMoL (do inglês, *Water Soluble M. oleifera Lectin*), previamente descrita, foi principalmente ativa com células de coelho no pH 4.5; tratamento térmico, pH 7.0 (Santos *et al.*, 2005). SSMoL mostrou AH com eritrócitos de coelho (títulos:  $256^{-1}$ ) e eritrócitos frescos humanos dos tipos A, B, O e AB (títulos:  $64^{-1}$ ,  $128^{-1}$ ,  $16^{-1}$  e  $256^{-1}$ , respectivamente) como a lectina de sementes de *Crotalaria pallida* (Rego *et al.*, 2002); SSMoL foi ativa na escala de pH 4.0-9.0 e mostrou resistência até 7 h a 100° C. Ghebremichael *et al.* (2005) purificaram uma proteína coagulante de sementes de *M. oleifera*, que foi termo-resistente, permanecendo ativa após 5 h de aquecimento a 95 °C; a eficiência da coagulação da amostra tratada com aquecimento foi ligeiramente maior do que as amostras sem esse tratamento. O calor promove a vibração molecular e esse fato pode ser responsável pela melhor eficiência da coagulação. Na presença dos íons  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  e  $K^{+}$  a AH aumentou.

Ensaio de inibição revelaram que a AH dos extratos foram parcialmente abolidas com carboidratos e glicoproteínas (Tabela 3). Glicoproteínas foram inibidores mais eficientes para SSMoL do que carboidratos; AH de SSMoL foi potencialmente inibida por ovoalbumina; asocaseína e asialofetúina aboliram completamente a AH de SSMoL (Tabela 4). Tiroglobulina aboliu a AH de WSMoL (Santos *et al.*, 2005).

PAGE para proteínas nativas confirmou SSMoL como uma proteína básica diferentemente da WSMoL, uma proteína ácida (Santos *et al.*, 2005). Em condições desnaturantes SSMoL revelou duas bandas polipeptídicas (Figura 2). O reagente de Schiff não revelou coloração para glicoproteínas. WSMoL mostrou uma banda glicopolipeptídica (Santos *et al.*, 2005); o peso molecular nativo de SSMoL

determinado por cromatografia de filtração a gel em *Sephacryl* S-300 foi 30 kDa (Figura 3).

Extrato de sementes, 0-60F e SSMoL mostraram atividade coagulante semelhante ao sulfato de alumínio, usado como controle positivo (Figura 4). Resultados similares foram observados com a suspensão de menor turbidez. O uso do extrato de sementes de *M. oleifera* é de grande interesse como tratamento de água para consumo humano de baixo custo. SSMoL é uma lectina com propriedades coagulantes. Proteínas coagulantes foram previamente reportadas em sementes de *M. oleifera*. Nadabgengesere *et al.* (1995) descreveu uma proteína catiônica dimérica com massa molecular de 12-14 kDa e ponto isoelétrico (pI) entre 10 e 11; Ghebremichael *et al.* (2005) estudou uma proteína catiônica com pI maior que 9.6 e massa molecular menor que 6,5 kDa; Gassenschmidt *et al.* (1995) purificaram uma proteína catiônica com pI maior que 10 e massa molecular em torno de 6,5 kDa. Okuda *et al.* (2001) encontraram um composto coagulante em extrato salino de sementes de *M. oleifera* que não era proteína, polissacarídeo ou lipídeo. A atividade coagulante de derivados catiônicos de alto peso molecular é explicada pelo modelo de formação de pontes; coagulação de partículas carregadas negativamente resulta de ligações através de forças de Coulomb; proteínas carregadas positivamente ligam-se à superfície de partículas carregadas negativamente (Gassenschmidt *et al.*, 1995).

Esse trabalho revela que extratos de tecidos distintos de *M. oleifera* mostraram AH; uma lectina básica termo resistente (SSMoL), com propriedades coagulantes, foi purificada a partir de farinha de sementes, diferente de uma lectina ácida, solúvel em água e termo sensível (WSMoL), previamente reportada (Santos *et al.*, 2005). *M. oleifera* pode fornecer um interessante modelo para comparação estrutural das proteínas relatadas.

#### **4 Conclusões**

Os resultados indicam que extratos de tecidos diferentes de *M. oleifera* mostraram AH e uma lectina foi purificada a partir da farinha das sementes, quantidades em miligrama, usando uma técnica simples. Extrato, F0-60 e SSMoL mostraram propriedades coagulantes na água. Resultados similares foram observados com o sulfato de alumínio, o mais comum coagulante sintético usado no tratamento da água em todo mundo. Em conclusão, preparações de sementes de *M. oleifera* podem ser aplicadas no

tratamento de água para consumo humano e SSMoL pode vir a ser utilizada para purificação de água através de uma técnica segura para o meio ambiente, contribuindo dessa forma para o uso sustentável da biodiversidade.

### **Agradecimentos**

Os autores expressam sua gratidão ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro e Bolsa de Produtividade em Pesquisa recebida (LCBBC). Também somos gratos pelo suporte financeiro à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

### **Referências**

Aniulyte, J.; Liesiene, J.; Niemeye, B. Evaluation of cellulose-based biospecific adsorbents as a stationary phase for lectin affinity chromatography. *Journal of Chromatography B* **2006**, 831, 24-30.

Bajpai S.; Sharma A.; Gupta M. N. Removal and recovery of antinutritional factors from soybean flour. *Food Chemistry* **2005**, 89, 497-501.

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

Correia, M. T. S.; Coelho, L. C. B. B. Purification of a glucose/mannose specific lectin, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu bean). *Applied Biochemistry and Biotechnology* **1995**, 55, 261-273.

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

Faizi S.; Siddiqui B. S.; Saleem R.; Siddiqui S.; Aftab K.; Gilani A. H., 64, 225-228. Fully acetylated carbamate and hypotensive thiocarbamate glycosides from *Moringa oleifera*. *Phytochemistry* **1995**, 38, 957- 963.

Fraguas, L. F.; Batista-Vieira, F.; Carlsson, J. Preparation of high-density Concanavalin A adsorbent and its use for rapid, high-yield purification of peroxidase from horseradish roots. *Journal of Chromatography B* **2004**, 803, 237 -241.

Franco-Fraguas L.; Plá A.; Ferreira F.; Massaldi H.; Suárez N.; Viera F. B. Preparative purification of soybean agglutinin by affinity chromatography and its immobilization for polysaccharide isolation. *Journal of Chromatography B* **2003**, 790, 365 -372.

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

Ghasi S.; Nwobodo E.; Ofili J. O. Hypocholesterolemic effects of crude extract of leaf of *Moringa oleifera* Lam in high-fat diet fed wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology* **2000**, 69, 21-25.

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

Guevara A. P.; Vargas C.; Sakurai H.; Fujiwara Y.; Hashimoto K.; Maoka T.; Kozuka M.; Ito Y.; Harukuni T.; Nishino H. An antitumor promoter from *Moringa oleifera* Lam. *Mutation Research* **1999**, 440,181–188.

Iqbal, S.; Bhangar, M. I. Effect of season and production location on antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaves grown in Pakistan. *Journal of Food Composition and Analysis* **2006**, 19, 544-551.

Jeyaprakash, A. A.; Jayashree, G.; Mahanta, S. K.; Swaminathan, C. P.; Sekar, K.; Surolia, A.; Vijayan, M. Structural Basis for the Energetics of Jacalin–Sugar

Interactions: Promiscuity Versus Specificity. *Journal of Molecular Biology* **2005**, 347, 181-188.

Kumari, P.; Sharma, P.; Srivastava, S.; Srivastava, M. M. Biosorption studies on shelled *Moringa oleifera* Lamarck seed powder: Removal and recovery of arsenic from aqueous system. *International Journal of Mineral Processing* **2006**, 78, 131-139.

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

Lima, V. L. M.; Correia, M. T. S.; Cechinel, Y. M. N.; Sampaio, C. A. M.; Owen, J. S.; Coêlho, L. C. B. B. Immobilized *Cratylia mollis* lectin as a potential matrix to isolate plasma glycoproteins, including lecithin-cholesterol acyltransferase. *Carbohydrate Polymers* **1997**, 33, 27-32.

Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* **1951**, 193, p. 265-275.

Makkar, H. P. S.; Becker, K. Nutritional value and antinutritional components of whole and ethanol extracted *Moringa oleifera*. *Animal Feed Science and Technology* **1996**, 63, 211-228.

Mehta, L. K.; Balaraman, R., Amin, A.H.; Bafna, P.A.; Gulati, O. D. Effect of fruits of *Moringa oleifera* on the lipid profile of normal and hypercholesterolaemic rabbits. *Journal of Ethnopharmacology* **2003**, 86, 191-195.

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

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

Okuda, T.; Baes, A. U.; Nishijima, W.; Okada, M. Improvements of extraction methods of coagulation active components from *Moringa oleifera* seed. *Water Research* **1999**, *33*, 3373–3378.

Özacar, M.; Şengil, A. The use of tannins from Turkish acorns (Valonia) in water treatment as a coagulant and coagulant aid. *Journal of Engineering Environment Science* **2002**, *26*, 255-263.

Peumans W. J.; Van Damme E. J. M. Specific tools for the identification, isolation, and characterization of O-linked glycans. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **1998**, *33*, 209-258.

Rego, E. J. L.; Carvalho, D. D.; Marangoni, S.; Oliveira, B.; Novello, J. C. Lectins from seeds of *Crotalaria pallida* (smooth rattlebox). *Phytochemistry* **2002**, *60*, 441–446.

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

Roy, I.; Sardar, M.; Gupta, M. N. Cross-linked alginate–guar gum beads as fluidized bed affinity media for purification of jacalin. *Biochemical Engineering Journal* **2005**, *23*, 193-198.

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* **2005**, *39*, 975-980.

Thies A.; Nugel D.; Pfüller U.; Moll I.; Schumacher U. Influence of mistletoe lectins and cytokines induced by them on cell proliferation of human melanoma cells in vitro. *Toxicology* **2005**, *207*, 105-116.

Vega, N.; Pérez, G. Isolation and characterization of a *Salvia bogotensis* seed lectin specific for the Tn antigen. *Phytochemistry* **2006**, *67*, 347–355.

Tabela 1. Concentrações de proteínas e atividade hemaglutinante específica de vários extratos de tecidos de *M. oleifera*

Tecido extraído <sup>a</sup>	Concentração de proteínas (mg/mL)	AHE <sup>b</sup> (AH/concentração de proteínas)
Flores	0.9	1185
Raque da inflorescência	0.4	680
Sementes	4.9	208
Tecido de folha	1.0	8
Tecido fundamental do tronco	0.4	84
Casca do tronco	1.7	2444

<sup>a</sup> Todos os tecidos foram coletados da mesma planta.

<sup>b</sup> AHE, Atividade hemaglutinante específica. Amostras foram ensaiadas com eritrócitos tratados com glutaraldeído.

Tabela 2. Purificação de SSMoL

Preparação	Proteína total (mg)	AH	AH Total	AHE	Rendimento* (%)	Purificação
F0-60	10,0	2048	3710	371	100	1,0
SSMoL	2,5	256	2201	864	59	2,3

\* Porcentagem da atividade total recuperada. Ensaios de atividade hemaglutinante (AH) foram realizados com eritrócitos de coelho. AHE, AH específica.

Tabela 3. Inibição da atividade hemaglutinante de extratos de tecidos com carboidratos e glicoproteínas

<b>Inibidor</b>	<b>E1</b>	<b>E2</b>	<b>E3</b>	<b>E4</b>	<b>E5</b>	<b>E6</b>
D(-) Frutose	148,1	N	N	N	N	305,5
D(+) Rafinose	592,5	NS	76,8	N	10,5	N
D(+) Glicose	148,1	167,5	153,6	N	N	N
D(+) Manose	N	335,0	153,6	N	N	N
Fetuína	0	41,8	38,4	4,0	0	152,7
Ovalbumina	N	335,0	76,8	4,0	0	611,0
Tiroglobulina	0	10,4	76,8	2,0	0	19,0
Caseína	296,2	0	38,4	2,0	0	19,0
Asocaseína	0	0	9,6	2,0	0	2,3

Flores (E1), raque da inflorescência (E2), sementes (E3), tecidos de folha (E4), tecido fundamental do tronco (E5), casca do tronco (E6). Atividade hemaglutinante específica (AHE) de E: 1185,0 (E1), 2680,0 (E2), 307,0 (E3), 8,1 (E4), 84,2 (E5) e 2444,0 (E6). Ensaio foram realizados com eritrócitos de coelho. Carboidratos 0,2 M e glicoproteínas 0.5 mg/mL foram usados. N indica que não houve inibição da AH.

Tabela 4. Inibição de SSMoL por carboidratos e glicoproteínas

<b>Inibidor</b>	<b>SSMoL</b>
D(-) Frutose	N
D(+) Rafinose	320
D(+) Glicose	80
D(+) Manose	N
Lactose	160
D(+)-Arabinose	320
Trealose	160
L(+)-Raminose	160
Galactose	80
Fetuína	N
Asialofetuína	0
Ovalbumina	10
Caseína	80
Asocaseína	0

*Saline Soluble Moringa oleifera Lectin* (SSMoL). Atividade hemaglutinante específica (AHE) foi 640. Os ensaios foram realizados com eritrócitos de coelho. Os carboidratos foram usados na concentração de 0,2 M e as glicoproteínas foram usadas na concentração de 0,5 mg/mL. A letra N indica que não houve inibição da AH.

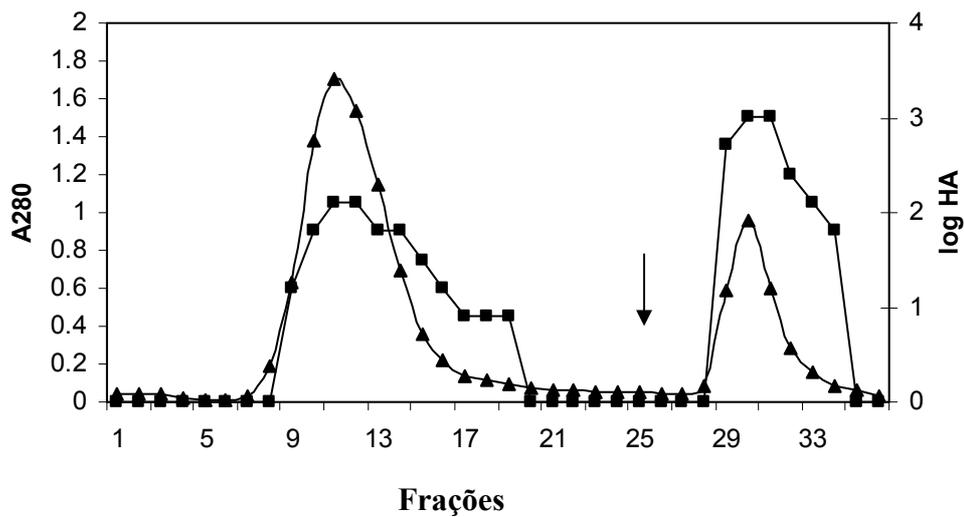


Figura 1. Purificação de lectina de sementes de *M. oleifera* (10 mg de proteínas) em coluna de gel de guar (10 x 1 cm). O ponto indicado (seta) indica que a eluição do tampão foi trocada por NaCl 1 M. Absorbância a 280 nm (-■-) e log da AHE (-▲-) são representadas.

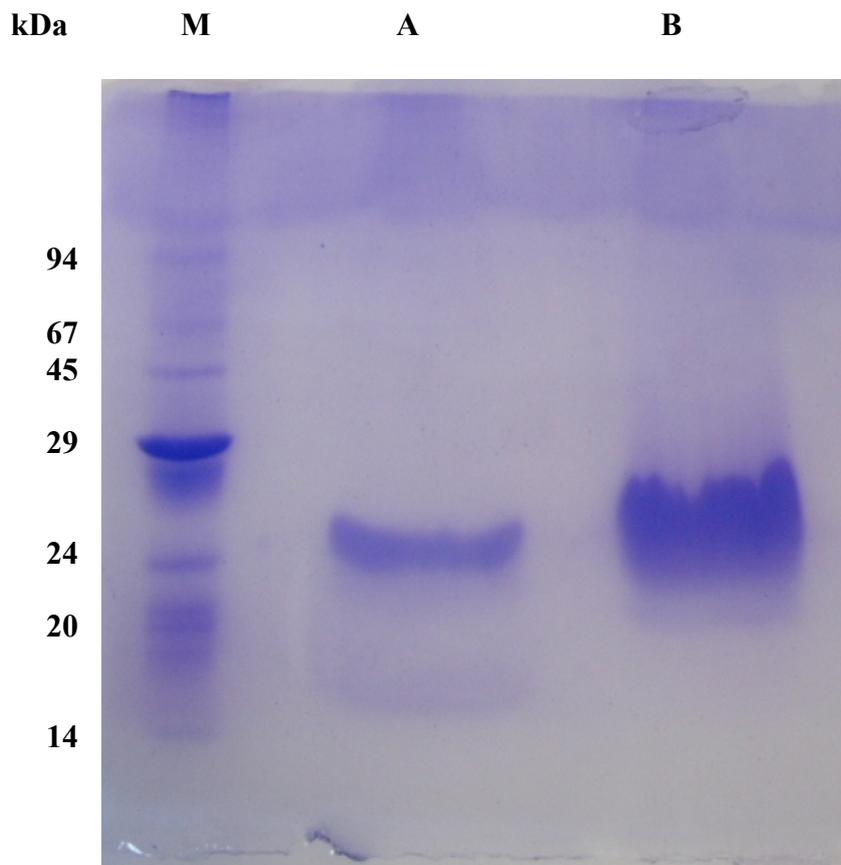


Figura 2. Eletroforese em gel de poliacrilamida (12%) de SSMoL (100  $\mu$ g), tratada com  $\beta$ -mercaptoetanol (A) e sem  $\beta$ -mercaptoetanol (B). Marcadores de massa molecular (M): fosforilase b (94 kDa), albumina sérica bovina (67 kDa), ovoalbumina (43 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), tripsinogênio (24 kDa), inibidor de tripsina (20 kDa) and  $\alpha$ -lactoalbumina (14 kDa). Proteínas foram coradas com azul brilhante de Coomassie.

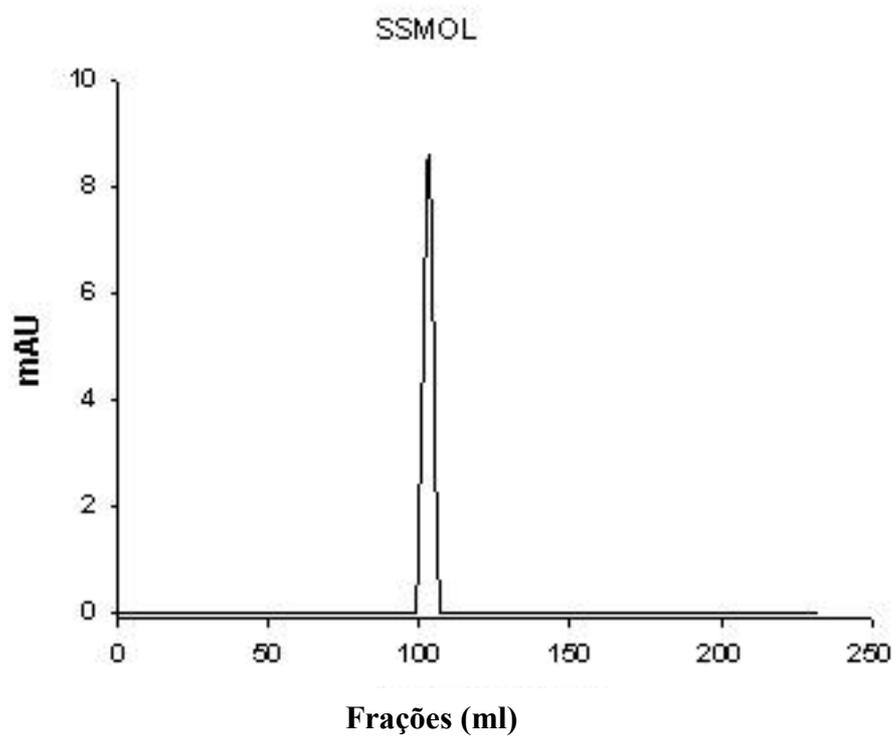


Figura 3. Massa molecular nativa de SSMoL em coluna de gel filtração Sephacryl S-300. Um pico de 30 kDa é representado. Os marcadores de peso molecular usados foram: albumina sérica bovina, 66 kDa; fetuína, 64 kDa; ovoalbumina, 44 kDa; ovinibidor, 28 kDa.

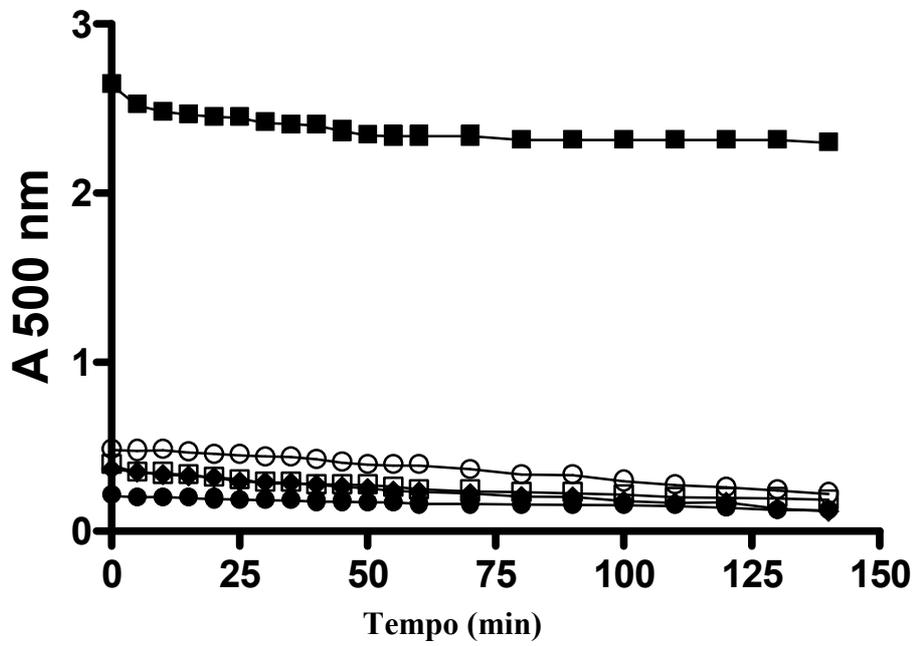


Figura 4. Atividade coagulante. SSMoL (1 mg/mL, □), extrato (1 mg/mL, ●), F0-60 (1 mg/mL, ◆), sulfato de alumínio, controle positivo (5% p/v, ○) e água tratada com caolin, controle negativo(■).

## **Capítulo 3**

**Isolation of a coagulant seed lectin from *Moringa oleifera***

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

## Isolation of a coagulant seed lectin from *Moringa oleifera*

Andréa F. S. Santos; Luciana A. Luz; Maria B. R. Silva; Adriana C. C. Argolo; Patrícia M. G. Paiva & Luana C. B. B. Coelho

Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas (CCB),  
Departamento de Bioquímica, Rua Prof. Nelson Chaves S/N, 50670-901, Cidade  
Universitária, Recife-PE, Brasil.

### Abstract

*Moringa oleifera* has economic importance and industrial and medicinal uses. Tissues of *Moringa* are used and seeds are applied for water purification. The aim of this work was to purify a saline soluble lectin from *M. oleifera* seeds (SSMoL) and evaluate the coagulant activity of seed lectin preparations and SSMoL. Lectin was detected in saline extracts from flowers, inflorescence rachis, seeds, leaves and fundamental tissue of stem. SSMoL was isolated after 0.15 M NaCl flour extraction and guar gel column chromatography, agglutinated erythrocytes from rabbit and human blood types and was active at pH range 4.0 to 9.0. Hemagglutinating activities (HA) of SSMoL and extracts of tissues were inhibited by carbohydrates and glycoproteins; azocasein and asialofetuin abolished SSMoL HA. The lectin was thermostable at 100 °C during 7 hours. SSMoL is basic and revealed two bands in SDS-PAGE, under no reducing conditions. Seed lectin preparations and SSMoL showed coagulant activity similar to aluminium sulphate, the coagulant control most widely used in water treatment.

*Keywords:* lectin; *Moringa oleifera*; coagulant activity; water treatment.

### 1 Introduction

Seeds are rich in lectins, hemagglutinating proteins that exist in all forms of life but the most studied are extracted from plants, perhaps due to their abundant availability, specially from seeds (Jeyaprakash *et al.*, 2005). Lectins interact selectively and reversibly with residues of specific sugars (Franco-Fraguas *et al.*, 2003). The number and specificity of carbohydrate binding sites as well as the presence of multiple activities at the protein is the basis for lectin classification. The most numerous group

include hololectins, proteins with two or more carbohydrate binding sites, identical or similar (Peumans and Van Damme, 1998). In addition to carbohydrate binding sites, some lectins showed domains responsible for protein-protein interactions. Structural characteristics result in tools for therapeutic use (Thies *et al.*, 2005, Vega and Pérez, 2006) as well as biotechnological purposes (Fraguas *et al.*, 2004). Lectins can be purified by affinity chromatography (Bajpai *et al.*, 2005, Vega and Pérez, 2006) and immobilized (Anilyte *et al.*, 2006) provides usual purification method to isolate important biomolecules, such as plasma glycoprotein, including lecithin-cholesterol acyltransferase (Lima *et al.*, 1999), polysaccharides from *Streptococcus pneumoniae* capsular (Franco-Fraguas *et al.*, 2003) and peroxidase (Fraguas *et al.*, 2004).

Polymers have been applied in coagulation/flocculation processes for water purification during decades (Özacar and Şengil, 2002). Natural coagulants of vegetable origin were used in water treatment before the advent of synthetic chemicals like aluminium and ferric salts (Ndabigengesere *et al.*, 1995).

*Moringa oleifera* (Lam), Moringaceae family, has been used in the Filipino diet; leaves, flowers and green pods are edible as a human nutritious vegetable (Guevara *et al.*, 1999). Hypocholesterolemic effects were also found in leaf extract (Ghasi *et al.*, 2000) and fruits (Mehta *et al.*, 2003). Plant seeds contain hypotensive activity (Faizi *et al.*, 1995), potent antioxidant activity and chelating property against arsenic toxicity (Gupta *et al.*, 2005); also constitute a powerful chemo-preventive agent (Guevara *et al.*, 1999). Seed coagulant properties have been used to water treatment (Okuda *et al.*, 1999; Ghebremichael *et al.*, 2005). Shelled *M. oleifera* seeds have the property to decontaminate arsenic from water and can be used as domestic and environment-friendly safe technology (Kumari *et al.*, 2006).

In this report we investigated hemagglutinating proteins in *M. oleifera* tissue extracts. Also, a seed lectin with coagulant activity was isolated, partially characterized and named SSMoL (Saline Soluble *Moringa oleifera* Lectin).

## **2 Materials and Methods**

### **2.1 Extract preparations**

Flowers, inflorescence rachis, seeds, leaf tissue, fundamental tissue of stem and steam bark of *M. oleifera* Lam were collected in Recife city, Northeast of Brazil. A sample of

the collected material is archived as voucher specimen number 63184, IPA, at the herbarium “Dárdano de Andrade Lima” (Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária, Recife, Brazil). Tissue flours of *M. oleifera* were extracted with 0.15 M NaCl for 6 h at room temperature and resulted in saline extracts (E) of flowers (E1), inflorescence rachis (E2), seeds (E3), leaves (E4), fundamental tissue of stem (E5) and steam bark (E6).

## **2.2 Saline fractionation**

Proteins of E were precipitated using 0-60% ammonium sulphate fractionation for 4 h at room temperature. The 0-60F was dialyzed with H<sub>2</sub>O (two exchanges) and 0.15M NaCl overnight.

## **2.3 Hemagglutinating activity (HA)**

HA was performed in microtiter plates according to Correia and Coelho (1995). Lectin preparations (50 µL) were serially two-fold diluted in 0.15 M NaCl before addition of 50 µL 2.5% (v/v) suspension of rabbit glutaraldehyde treated erythrocytes or fresh human erythrocytes. Titer was expressed as the highest dilution exhibiting hemagglutination.

## **2.4 Lectin isolation**

0-60 F was chromatographed (10 mg of protein) on a guar gel column (10 x 1.0 cm) previously equilibrated (20 mL/h flow rate) with 0.15 M NaCl. The HA bound was eluted with 1.0 M NaCl (SSMoL).

## **2.5 Effect of pH, temperature and divalent cation on HA**

The pH effect was evaluated with SSMoL (50 µL) diluted in 10 mM citrate-phosphate buffer (pH 3.0 to 6.5) or 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0 to 8.0) or 10 mM Tris-HCl buffer (pH 8.5 to 9.0) and following, rabbit erythrocytes were added. Lectin thermo stability was evaluated with previously heated SSMoL (30 °C to 90 °C, up to

30 min and subsequently 100°C, every 30 min, up to 7 h) and 2.5% (v/v) rabbit erythrocyte suspension was added. Assays for divalent cation requirements were performed by dialysis with EDTA and HA was measured with MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub> and KCl<sub>2</sub>.

## **2.6 Hemagglutinating activity inhibition**

The lectin inhibitory assays using E and SSMoL were evaluated with solutions of carbohydrates D(-)-fructose, D(+)-raffinose, D(+)-glucose and D(+)-mannose. SSMoL was also assayed with solutions of D(+)-lactose, (+)-arabinose, trehalose, L(+)-rhaminose and galactose. E and SSMoL were tested with 0.5 mg/ml glycoprotein solutions (fetuin, asialofetuin, ovalbumin, casein and azocasein). E was also tested with thyroglobulin. The inhibitory assays were similar to the hemagglutinating assay with exception of an incubation step (room temperature, 15 min) before erythrocyte addition.

## **2.7 Protein evaluation**

The protein was estimated according to Lowry *et al.* (1951) and by absorbance at 280 nm.

## **2.8 Lectin characterization**

SSMoL molecular weight was estimated by sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) as described by Laemmli (1970). PAGE for basic and acidic native proteins was performed according to Reisfeld (1962) and Davis (1964), respectively. Gels were stained either for protein with Coomassie Brilliant Blue (Laemmli, 1970) or for carbohydrate using Schiff reagent (Sigma) according to Pharmacia Fine Chemicals (1980). The native molecular weight was determined by Sephacryl S-300 gel filtration column (with NaCl 0.5 M, 20 mL/h flow rate) using molecular weight markers (bovin serum albumin: 66 kDa, fetuin: 64 kDa, ovalbumin: 44 kDa and ovoinhibitor: 28 kDa).

## 2.9 Coagulation activity assay

The coagulation activity assay was based on the method described by Ghebremichael *et al.* (2005). Initially, the water sample was treated with kaolin clay (10 g) to 1 L tap water, stirred for 30 min and allowed to settle for 24 h to achieve complete hydration. Desired turbidity was obtained by dilution. An aliquot (100  $\mu$ L) of samples (1mg/mL, E3, seed 0-60 F and SSMoL) and positive control (aluminium sulphate 5%) were added to high turbidity clay suspension (900  $\mu$ L, 250-300 NTU, Nephelometric Turbidity Units) in 1 mL cuvette and homogenized instantly. Dilution (1:2) of clay suspension was done to obtain low turbidity and samples were assayed. Samples were allowed to settle for 1 h and absorbance was measured at 500 nm using a UV-Visible spectrophotometer FEMTO 700 S. In order to reduce background effect, a sample volume of 800  $\mu$ L from the top was transferred to the cuvette for absorbance measurements every 5 min up to 60 min and to each 10 min up to 140 min. Reduction in absorbance relative to control defines coagulation activity. The assays were done in three times and in different temperatures (15°C, 30 °C, 45 °C and 60 °C).

## 2.10 Statistics analysis

Values of experimental results showed in tables and figures were the mean of at least three determinations ( $\pm$  standard deviation). Linear regression equations were established using the Origin version 6.0 program (Microcal, Northampton, MA, USA).

## 3 Results and Discussions

Flour of *M. oleifera* seeds has been broadly used in developing countries as a natural coagulant for water treatment and human consumption. HA was detected in seed and all extracts obtained from *M. oleifera* tissues. The highest specific activities, however, were detected in extracts obtained from stem bark, flowers and inflorescence rachis (Table 1); the latter tissues have been consumed by the population (Makkar and Becker, 1996). A general lectin activity was similarly detected in *Bauhinia monandra* tissue extracts (Coelho and Silva, 2000).

When 0-60F (SHA: 371) of *M. oleifera* seeds was chromatographed on guar gel column (Figure 1) HA was detected with unadsorbed (SHA: 35) and 1.0 M NaCl eluted fractions (SHA: 864). The lectin with highest SHA, termed SSMoL (saline soluble *M. oleifera* lectin), corresponded to 59 % of chromatographed activity (Table 2). Affinity chromatography efficiently purified SSMoL, with good recoveries, like other isolated proteins (Coelho and Silva, 2000; Roy *et al.*, 2005). A water soluble *M. oleifera* lectin, WSMoL, previously described, was mainly active with rabbit cells at pH 4.5; heat treatment, pH 7.0, fructose and porcine thyroglobulin abolished HA of WSMoL (Santos *et al.*, 2005). SSMoL showed HA to rabbit (titer:  $256^{-1}$ ) and A, B, O and AB human fresh erythrocytes (titer:  $64^{-1}$ ,  $128^{-1}$ ,  $16^{-1}$  and  $256^{-1}$ , respectively) like the seed lectin from *Crotalaria pallida* (Rego *et al.*, 2002); SSMoL was active at pH range 4.0-9.0 and showed resistance up to 7 h at 100° C. Ghebremichael *et al.* (2005) purified a coagulant protein from *M. oleifera* seeds, which was thermoresistant since remained active after 5 h heat treatment at 95 ° C; The presence of ions  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  and  $K^{+}$  increased HA of SSMoL.

Inhibition assays revealed that HA of extracts was partially abolished with carbohydrates and glycoproteins (Table 3). Glycoproteins were more effective inhibitors to SSMoL than carbohydrates; SSMoL HA was potentially inhibited by ovalbumin; azocasein and asialofetuin abolished completely SSMoL HA (Table 4). WSMoL lost HA with thyroglobulin (Santos *et al.*, 2005).

PAGE to native proteins confirmed SSMoL as a basic protein different from WSMoL, an acidic protein (Santos *et al.*, 2005). Under denatured conditions SSMoL revealed two polypeptide bands (Figure 2). No staining was detected with Schiff reagent; WSMoL showed a main glycopolypeptide band (Santos *et al.*, 2005); SSMoL native molecular weight determined by Sephacryl S-300 gel filtration chromatography was 30 kDa (Figure 3).

Seed extract, 0-60F and SSMoL showed coagulant activities like control aluminium sulphate (Figure 4) on water with high (10 g/L) and low (1:2 dilution) turbidity kaolin clay suspension. Significant differences had not been observed in the temperatures analyzed.

The use of seed extract from *M. oleifera* is of great interest as a low cost water treatment to human consumption. SSMoL is a lectin with coagulant properties. Coagulant proteins were previously reported in *M. oleifera* seeds. Nadabgengesere *et al.* (1995) described dimeric cationic proteins with molecular mass of 12-14 kDa and

isoelectric point (pI) between 10 and 11; Ghebremichael *et al.* (2005) studied a cationic protein with pI greater than 9.6 and molecular mass less than 6.5 kDa that showed coagulation efficiencies of heat-treated samples slightly higher than raw samples. Heat treatment promotes the molecular vibration and this fact can be responsible for better coagulation efficiency. Gassenschmidt *et al.* (1995) purified a cationic protein with pI greater than 9.6 and molecular mass less than 6.5 kDa. Okuda *et al.* (2001) founded a coagulant compound in saline extract of *M. oleifera* seeds that was neither protein, polysaccharide nor lipid. The coagulant activity of high-molecular cationic polyacrylamide derivatives is explained by the bridge formation model; coagulation of negatively charged particles results from binding through Coulomb forces; positively charged proteins bind to surface patches of negatively charged particles (Gassenschmidt *et al.*, 1995).

The present work revealed that extracts from distinct *M. oleifera* tissues showed HA. *M. oleifera* may provide an interesting model for structural comparison of related proteins. A thermoresistant basic lectin (SSMoL), with coagulant properties, was purified from seed flour, different from WSMoL, a water-soluble thermosensible acidic lectin, previously reported (Santos *et al.*, 2005).

#### **4 Conclusions**

The present results indicate that extracts from distinct *M. oleifera* tissues showed HA and one lectin was purified from seed flour using a simple technique. Extract, 0-60F and SSMoL showed water coagulant properties. Similar results were found with aluminium sulphate, the most common synthetic coagulant used in water treatment all over the world. In conclusion, *M. oleifera* seed preparations and SSMoL can be applied to water treatment for human consumption.

#### **Acknowledgements**

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

## References

- Aniulyte, J., Liesiene, J., Niemeje, B., 2006. Evaluation of cellulose-based biospecific adsorbents as a stationary phase for lectin affinity chromatography. *J. Chromatogr. B.* 831, 24-30.
- Bajpai S., Sharma A., Gupta M. N., 2005. Removal and recovery of antinutritional factors from soybean flour. *Food Chem.* 89, 497-501.
- 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*. *Phytochem. Anal.* 11, 295-300.
- 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). *Appl. Biochem. Biotechnol.* 55, 261-273.
- Davis, B. J. 1964. Disc electrophoresis II: method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121, 404-427.
- Faizi S., Siddiqui B. S., Saleem R., Siddiqui S., Aftab K., Gilani A. H. 1995. Fully acetylated carbamate and hypotensive thiocarbamate glycosides from *Moringa oleifera*. *Phytochemistry.* 38, 957- 963.
- Fraguas, L. F., Batista-Vieira, F., Carlsson, J. 2004. Preparation of high-density Concanavalin A adsorbent and its use for rapid, high-yield purification of peroxidase from horseradish roots. *J. Chromatogr. B.* 803, 237 -241.
- Franco-Fraguas L., Plá A., Ferreira F., Massaldi H., Suárez N., Viera F. B. 2003. Preparative purification of soybean agglutinin by affinity chromatography and its immobilization for polysaccharide isolation. *J. Chromatogr. B.* 790, 365 -372.
- Ghasi S., Nwobodo E., Ofili J. O. 2000. Hypocholesterolemic effects of crude extract of leaf of *Moringa oleifera* Lam in high-fat diet fed wistar rats. *J. Ethnopharmacol.* 69, 21-25.
- Gassenschmidt, U., Jany, K. D., Tauscher, B., Niebergall, H. 1995. Isolation and characterization of a flocculating protein from *Moringa oleifera* Lam. *Biochim. Biophys. Acta.* 1243, 477-481.
- Ghebremichael, K. A., Gunaratna, K. R., Henriksson, H., Brumer, H., Dalhammar, G. 2005. A simple purification and activity assay of the coagulant protein from *Moringa oleifera* seed. *Water Res.* 39, 2338-2344.

- Guevara A. P., Vargas C., Sakurai H., Fujiwara Y., Hashimoto K., Maoka T., Kozuka M., Ito Y., Harukuni T., Nishino H. 1999. An antitumor promoter from *Moringa oleifera* Lam. *Mutat. Res.* 440,181-188.
- Gupta, R., Kannan, G. M., Sharma, M., Flora, S. J. S. 2005. Therapeutic effects of *Moringa oleifera* on arsenic-induced toxicity in rats. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 20, 456-464.
- Jeyaprakash, A. A., Jayashree, G., Mahanta, S. K., Swaminathan, C. P., Sekar, K., Surolia, A., Vijayan, M. 2005. Structural Basis for the Energetics of Jacalin–Sugar Interactions: Promiscuity Versus Specificity. *J. Mol. Biol.* 347, 181-188.
- Kumari, P., Sharma, P., Srivastava, S., Srivastava, M. M. 2006. Biosorption studies on shelled *Moringa oleifera* Lamarck seed powder: Removal and recovery of arsenic from aqueous system. *Int. J. Miner. Process.* 78, 131-139.
- Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227, 680-685.
- Lima, V. L. M., Correia, M. T. S., Cechinel, Y. M. N., Sampaio, C. A. M., Owen, J. S., Coêlho, L. C. B. B. 1997. Immobilized *Cratylia mollis* lectin as a potential matrix to isolate plasma glycoproteins, including lecithin-cholesterol acyltransferase. *Carbohydr. Polym.* 33, 27-32.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Makkar, H. P. S., Becker, K. 1996. Nutritional value and antinutritional components of whole and ethanol extracted *Moringa oleifera*. *Anim. Feed Sci. Technol.* 63, 211-228.
- Mehta, L. K., Balaraman, R., Amin, A. H., Bafna, P. A., Gulati, O. D. 2003. Effect of fruits of *Moringa oleifera* on the lipid profile of normal and hypercholesterolaemic rabbits. *J. Ethnopharmacol.* 86, 191-195.
- Ndabigengesere, A., Narasiah, K. S., Talbot, B. G. 1995. Active agents and mechanism of coagulation of turbid waters using *Moringa oleifera* seeds. *Water Res.* 29, 703-710.
- Okuda, T., Baes, A. U., Nishijima, W., Okada, M. 2001. Coagulation mechanism of salt solution-extracted active component in *Moringa oleifera* seeds. *Water Res.* 35, 830-834.
- Okuda, T., Baes, A. U., Nishijima, W., Okada, M. 1999. Improvements of extraction methods of coagulation active components from *Moringa oleifera* seed. *Water Res.* 33, 3373-3378.
- Özacar, M., Şengil, A. 2002. The use of tannins from Turkish acorns (*Valonia*) in water treatment as a coagulant and coagulant aid. *J. Eng. Env. Sci.* 26, 255-263.

- Peumans W. J., Van Damme E. J. M. 1998. Specific tools for the identification, isolation, and characterization of O-linked glycans. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 33, 209-258.
- Rego, E. J. L., Carvalho, D. D., Marangoni, S., Oliveira, B., Novello, J. C. 2002. Lectins from seeds of *Crotalaria pallida* (smooth rattlebox). *Phytochemistry.* 60, 441-446.
- Reisfeld R. A., Lewis U. J., Williams D. E. 1962. Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. *Nature.* 195, 281-283.
- Roy, I., Sardar, M., Gupta, M. N. 2005. Cross-linked alginate-guar gum beads as fluidized bed affinity media for purification of jacalin. *Biochem. Eng. J.* 23, 193-198.
- Santos, A. F. S., Argolo, A. C. C., Coelho, L. C. B. B., Paiva, P. M. G. 2005. Detection of water soluble lectin and antioxidant component from *Moringa oleifera* seeds. *Water Res.* 39, 975-980.
- Thies A., Nugel D., Pfüller U., Moll I., Schumacher U. 2005. Influence of mistletoe lectins and cytokines induced by them on cell proliferation of human melanoma cells in vitro. *Toxicology.* 207, 105-116.
- Vega, N., Pérez, G. 2006. Isolation and characterisation of a *Salvia bogotensis* seed lectin specific for the Tn antigen. *Phytochemistry.* 67, 347-355.

Table 1. Protein concentrations and specific hemagglutinating activities of various tissue extracts from *Moringa oleifera*

Tissue extracted <sup>a</sup>	Protein concentration (mg/L)	SHA <sup>b</sup> (HA/protein concentration)
Flowers	0.9	1185
Inflorescence rachis	0.4	680
Seeds	4.9	208
Leaf tissue	1.0	8
Fundamental tissue of steam	0.4	84
Steam bark	1.7	2444

<sup>a</sup> All tissues were collected from a single plant.

<sup>b</sup> SHA, Specific hemagglutinating activity. Samples were assayed with glutaraldehyde treated erythrocytes.

Table 2. Summary of SSMoL purification

Preparation	Total protein (mg)	HA	Total HA	SHA	Yield* (%)	Purification (folds)
0-60F	10.0	2048	3710	371	100	1.0
SSMoL	2.5	256	2201	864	59	2.3

\* Percentage of total activity recovered. Hemagglutinating activity (HA) assays were performed with rabbit erythrocytes. SHA, Specific HA.

Table 3 Inhibition haemmagglutinating activity of tissue extracts by carbohydrates and glycoproteins

<b>Inhibitor</b>	<b>E1</b>	<b>E2</b>	<b>E3</b>	<b>E4</b>	<b>E5</b>	<b>E6</b>
D(-) Fructose	148.1	N	N	N	N	305.5
D(+) Raffinose	592.5	NS	76.8	N	10.5	N
D(+) glucose	148.1	167.5	153.6	N	N	N
D(+) mannose	N	335.0	153.6	N	N	N
Fetuin	0	41.9	38.4	4.1	0	152.7
Ovalbumin	N	335.0	76.8	4.1	0	611.0
Thyroglobulin	0	10.5	76.8	2.0	0	19.0
Casein	296.2	0	38.4	2.0	0	19.0
Azocasein	0	0	9.6	2.0	0	2.4

Flowers (E1), inflorescence rachis (E2), seeds (E3), leaf tissue (E4), fundamental tissue of stem (E5), stem bark (E6). Specific hemagglutinating activity (SHA) of E were 1185.0 (E1), 2680.0 (E2), 307.0 (E3), 8.1 (E4), 84.2 (E5) and 2444.0 (E6). Assays were performed with rabbit erythrocytes. Carbohydrates (0.2 M) and glycoproteins (0.5 mg/mL) were used. N indicates that no inhibition of HA was detected.

Table 4. Inhibition of SSMoL by carbohydrates and glycoprotein

<b>Inhibitor</b>	<b>SSMoL</b>
D(-) Fructose	N
D(+) Raffinose	320
D(+) Glucose	80
D(+) Mannose	N
D(+) Lactose	160
D(+)-Arabinose	320
Trehalose	160
L(+)-Rhamnose	160
Galactose	80
Fetuin	N
Asialofetuin	0
Ovalbumin	10
Casein	80
Azocasein	0

Saline Soluble *Moringa oleifera* Lectin (SSMoL). Specific haemagglutinating activity (SHA) was 640. The assays were performed with rabbit erythrocytes. Carbohydrates (0.2 M) and glycoproteins (0.5 mg/mL) were used. N indicates that no inhibition of HA was detected.

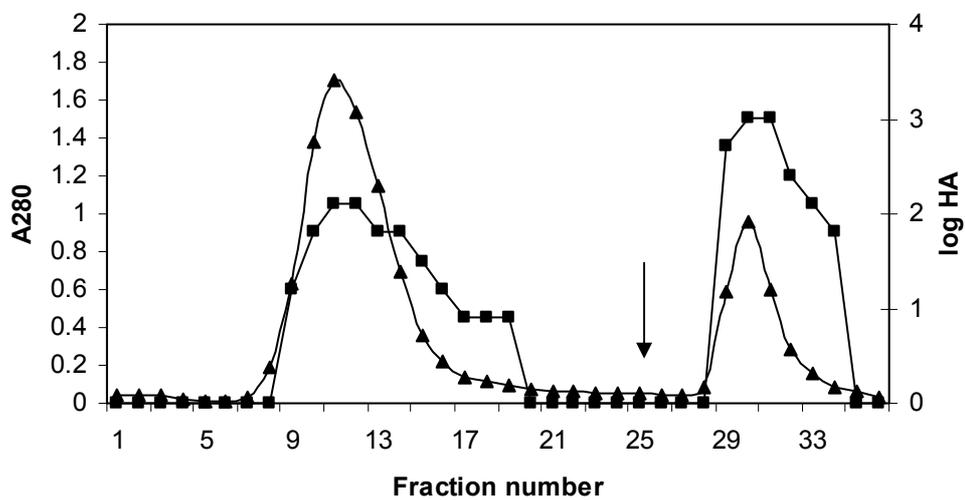


Figure 1. Purification of *M. oleifera* seed lectin (10 mg of protein) on a guar gel column (10.0 x 1.0 cm). At the point indicated (arrow) elution buffer was changed to 1.0 M NaCl. Absorbance at 280 nm (-■-) and log of HA (-▲-) are represented.

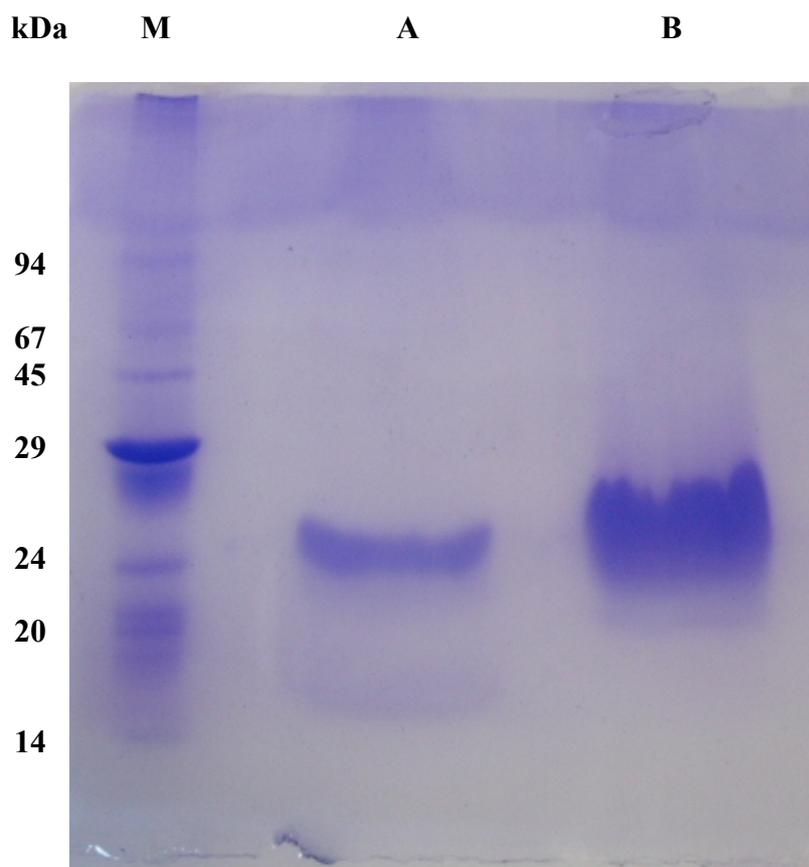


Figure 2. Polyacrylamide gel electrophoresis (12%) of SSMoL (100  $\mu$ g)  $\beta$ -mercapthoethanol treated (A) and without  $\beta$ -mercapthoethanol (B). Molecular weight markers (M): phosphorylase b (94 kDa), bovine serum albumin (67 kDa), ovoalbumin (43 kDa), carbonic anhydrase (30 kDa), trypsinogen (24 kDa), trypsin inhibitor (20 kDa) and  $\alpha$ -lactoalbumin (14 kDa). Proteins were stained with Coomassie Brilliant Blue.

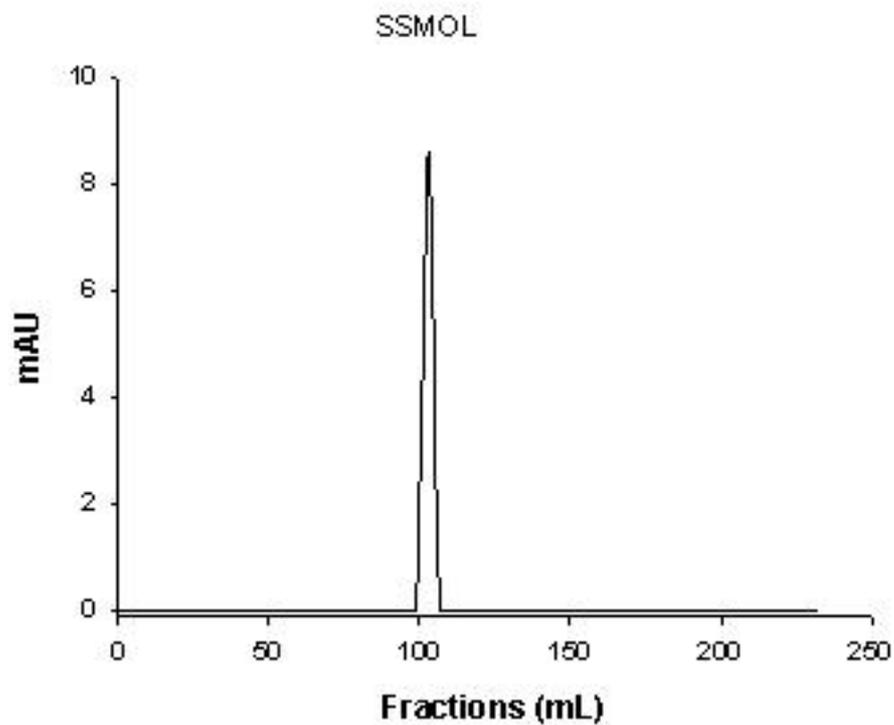


Figure 3. SSMoL native molecular weight by Sephacryl S-300 gel filtration column. A peak of 30 kDa is represented. Molecular weight markers used were: bovin serum albumin, 66 kDa; fetuin, 64 kDa; ovalbumin, 44 kDa; ovoinhibitor, 28 kDa.

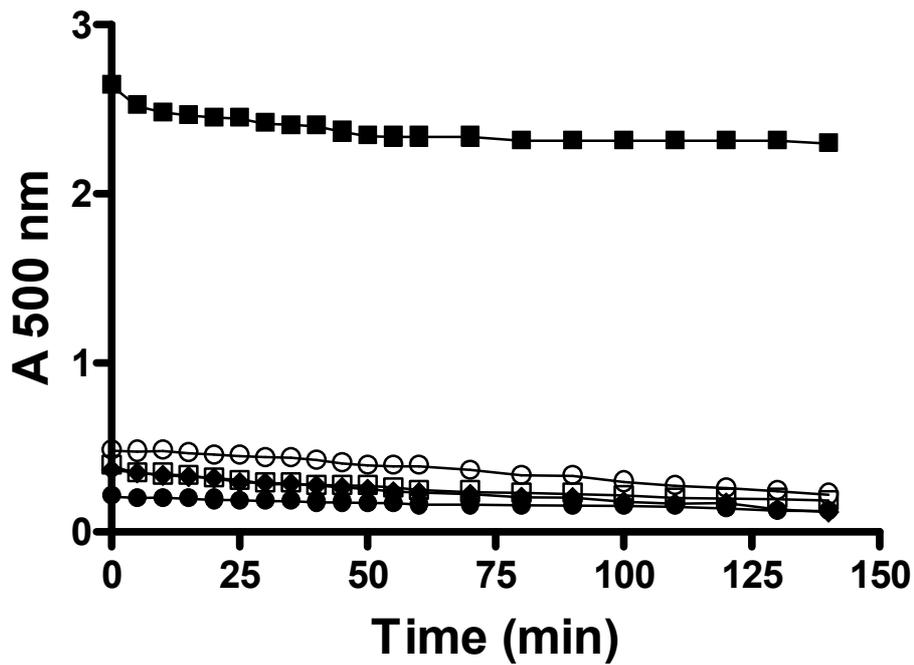


Figure 4. Coagulant activity of lectin preparations and SSMoL. SSMoL (1 mg/mL) (□), extract (1 mg/mL) (●), 0-60F (1 mg/mL) (◆), aluminium sulphate (5% p/v) (○) and negative control (■). The values represent the mean of three assays ( $\pm$  standard deviation): significant differences between groups were determined at  $p < 0.05$ .

## **Capítulo 4**

***Moringa oleifera* lectin-binding affinity to humic acids: application to  
water treatment**

**Artigo a ser submetido ao periódico *Biotechnology and Bioengineering***

***Moringa oleifera* lectin-binding affinity to humic acids:  
application to water treatment**

Andréa F. S. Santos<sup>1</sup>; Luciana A. Luz<sup>1</sup>; Maria G. Carneiro-da-Cunha<sup>1</sup>, Patrícia M. G. Paiva<sup>1</sup>, José A. C. Teixeira<sup>2</sup>, António G. Brito<sup>2</sup>, Luana C. B. B. Coelho<sup>1</sup> and Regina O. B. Nogueira<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica, Rua Prof. Nelson Chaves S/N, 50670-901, Cidade Universitária, Recife-PE, Brasil. <sup>2</sup> Universidade do Minho, Centro de Engenharia Biológica, Campus de Gualtar, 4710-057, Braga, Portugal.

**Abstract**

Humic acids are a significant fraction of natural occurring organic matter in freshwaters and constitute a major problem in water treatment plants because they react with chlorine forming of undesirable disinfection byproducts. The aim of this work was *M. oleifera* lectin affinity to bind humic acids. The isolation of *M. oleifera* lectin included several steps respectively, extraction of seed flour, saline fractionation (0-60F) and, guar gel chromatography. The hemagglutinating activity (HA) of the lectin preparations previously obtained, extract (E), fraction (0-60F) and, purified lectin was assessed with rabbit erythrocytes. Inhibition AH assays were carried out in the presence of a humic acid, carbohydrates and, halogenated organic compounds. Diffusion experiments with the humic acid and the three lectin preparations were performed in an agarose gel. The purified protein, named Saline Soluble *Moringa oleifera* Lectin (SSMoL), is basic and showed two polypeptide bands under denatured conditions. The HA of SSMoL in the presence of the humic acid decreased significantly from 512<sup>-1</sup> to 32<sup>-1</sup>, which demonstrates that SSMoL binds the humic acid. Similar results were obtained with the extract and the fraction. D(+)-galactose and L(+)-arabinose inhibited the HA of SSMoL that decreased from 512<sup>-1</sup> to 64<sup>-1</sup> while no measurable effect was observed in the presence of trichloroacetic and dichloroacetic acids and, chloroform. The precipitation bands observed in the diffusion gel corroborates the results obtained in the HA assay. The present study foresees a future application of SSMoL in water treatment to remove humic acids.

**Keywords:** Lectin, *Moringa oleifera*; humic acids, water treatment.

## 1 Introduction

Lectins are a type of receptor protein of non-immune origin that specifically interacts with carbohydrates without modifying them. These proteins recognize and bind specifically to mono- or oligosaccharides and are classified by which carbohydrate they recognize. Most lectins recognize either N-acetylneuraminic acid, N-Acetylglucosamine, N-Acetylgalactosamine, galactose, mannose, or fucose (Peumans and Van Damme, 1995). Lectins were named originally for the ability of some to selectively agglutinate human red blood cells of particular blood groups. The key interactions of lectins with carbohydrates are stereochemically via hydrogen bonds, metal coordination, and van der Waals and hydrophobic interactions (Liener *et al.*, 1986; Weiss and Drickamer, 1996; Elgavish and Shaanan, 1997). Generally, lectins interact with their target through multiple binding sites, which increases affinity and specificity. Lectins have been obtained particularly from the seeds of leguminous plants, but also from many other plant and animal sources (Santos *et al.*, 2005; Wong and Ng, 2006).

Lectins are valuable tools in biotechnological research (Fraguas *et al.*, 2004) and biomedical applications (Kelly *et al.*, 2005). An important biotechnological application of immobilized lectins reported in literature (Aniulyte *et al.*, 2006) is the isolation of biomolecules (Kelly *et al.*, 2005) namely, plasma glycoproteins (lecithin-cholesterol acyltransferase, Lima *et al.*, 1997), polysaccharides (Franco-Fraguas *et al.*, 2003), trypsin inhibitor (Paiva *et al.*, 2003) and enzymes (peroxidase, Fraguas *et al.*, 2004). Studies conducted in the biomedical field reported the isolation of lectins with mitogenic activity on human lymphocytes (Maciel *et al.*, 2004), antifungal activity (Yan *et al.*, 2005) and activity against the proliferation of human cancer cell lines (Kaur *et al.*, 2005). Purified lectins are used in clinical analyses for blood typing; some of the glycolipids and glycoproteins on an individual's red blood cells can be identified by lectins.

*Moringa oleifera* is a plant of the Moringaceae family and their seeds have been used in water treatment (Okuda *et al.*, 1999; Ghebremichael *et al.*, 2005). The aqueous extract obtained from *Moringa oleifera* seeds contains a flocculating protein that works as a clarifying agent of turbid water (Gassenschmidt *et al.*, 1995). Shelled *M. oleifera* seeds have also been used for decontamination of water containing arsenic (Kumari *et*

*al.*, 2006). Additionally, antioxidant activity and antimicrobial properties of *M. oleifera* seeds have been reported in literature (Santos *et al.*, 2005; Ghebremichael *et al.*, 2005).

Organic compounds of biological origin are found in all surface waters. They are referred as natural organic matter (NOM) and are divided into hydrophilic and hydrophobic fractions. The hydrophilic fraction includes mainly carboxylic acids, carbohydrates and proteins, while the hydrophobic fraction includes the so-called humic substances (HS) (Matilainen *et al.*, 2006). HS are divided in two fractions, humic acids and fulvic acids (Moriguchi *et al.*, 2006). Humic acids are heterogeneous mixtures of organic compounds containing several chemical groups. In general, the number of carboxylic and phenolic-OH groups is largely dominating (Shirshova *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2006). The molecular sizes of humic acids are reported to range from several hundred to several hundred thousand daltons and the chemical structures show no repetitive pattern (Shin *et al.*, 1999).

NOM is linked to the formation of disinfection by-products upon chlorination of drinking water. Trihalomethanes (THMs) are the most commonly observed of these by-products, they may cause adverse health effects in animals and humans (Eish *et al.*, 2006). For this reason, alternative processes have been investigated for the removal of humic substance from water such as coagulation/flocculation, adsorption (Le-Clech *et al.*, 2006; Moriguchi *et al.*, 2006), activated carbon filtration (Matilainen *et al.*, 2006) and photocatalytic degradability of humic substances on Ti-modified sílica (Moriguchi *et al.*, 2006).

In this work we describe the extraction and purification of a lectin from *M. oleifera* seeds and the characterization of the lectin binding-affinity to a humic acid.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1 lectin purification**

*M. oleifera* seeds were collected in Recife (Northeast of Brazil) and a sample is kept as voucher specimen number 63184, IPA, at the herbarium “Dárdano de Andrade Lima” (Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária, Recife, Brazil). Seeds were ground to flour that was extracted with 0.15 M NaCl for 6 h at room temperature and a saline extract (E) was obtained. The proteins present in E were precipitated with ammonium sulphate 60 % (w/v) for 4 h at room temperature and a protein fraction (0-60F) was

obtained. The lectin was purified by affinity chromatography, 10 mg of the protein fraction (0-60F) was applied to a guar column (10 cm x 1.0 cm), previously equilibrated with 0.15 M NaCl, at a flow rate of 20 mL/h. Subsequently, the active bound proteins were eluted with 1.0 M NaCl.

## **2.2 Lectin's hemagglutinating activity assay**

The hemagglutinating activity assay (HA) was performed in microtiter plates according to Correia and Coelho (1995). Lectin preparations (50  $\mu$ L) were two-fold serially diluted with 0.15 M NaCl before addition of 50  $\mu$ L suspension of rabbit erythrocytes previously treated with glutaraldehyde 2.5% (v/v). The titer was expressed as the highest dilution exhibiting hemagglutination. Essays were performed with the saline extract (E), 2485  $\mu$ g/mL, the protein fraction (0-60 F), 219  $\mu$ g/mL and the purified protein, 129  $\mu$ g/mL.

## **2.3 Lectin's hemagglutinating activity inhibition assay**

The inhibition assay followed the same protocol as the hemagglutinating activity assay with the exception of an incubation step with the inhibiting compound for 15 min at room temperature, before the addition of the erythrocytes' suspension. The following substances were tested: i) a humic acid (Sigma Aldrich 53680), a solution of 10 mg/L of Carbon was prepared in NaOH 0.1 M, ii) carbohydrates, aqueous solutions of D(+)-glucose, D(+)-galactose, L(+)-arabinose and, D(-)-galacturonic acid with concentrations of 0.2 M, 0.1 M, 0.05 M, 0.025 M and, 0.0125 M were tested and, iii) halogenated organic compounds, aqueous solutions of dichloroacetic acid and trichloroacetic acid with concentrations of 5.6  $\mu$ g/L and 56  $\mu$ g/L and, of chloroform with a concentration of 56  $\mu$ g/L.

## **2.4 Effect of pH and mono- and divalent-cations on the lectin's hemagglutinating activity in the presence of a humic acid**

The effect of pH in an interval of 3.0 to 10.0 on the lectin hemagglutinating activity of the purified protein was assessed in the presence of the humic acid according to the

procedure previously described. Humic acid solutions with pH between 3.0 and 6.5 were prepared in a citrate-phosphate buffer (10 mM) and humic acid solutions with pH between 7.0 and 10.0 were prepared in sodium phosphate buffer (10 mM). The effect of mono ( $K^+$ ) and divalent ( $Ca^{2+}$ ) cations on the lectin's hemagglutinating activity was assessed in the presence of the humic acid according to the procedure previously described. Humic acid solutions with  $CaCl_2$  10 mM or  $KCl_2$  with both 5 mM and 10 mM were prepared and used in the activity assays.

## **2.5 Protein evaluation**

The protein was estimated according to Lowry *et al.* (1951). A calibration curve was prepared using bovine serum albumin (BSA) as the standard in a range between 0  $\mu$ g and 400  $\mu$ g/mL.

## **2.6 Single radial diffusion**

A diffusion assay was carried out in an agarose gel formed in a Petri dish. The gel with a concentration of 1% (w/v) was prepared in 0.15 M NaCl. A humic acid solution (30  $\mu$ L), with a concentration of 100 and 200 mg/L of Carbon, was placed in a central well, while the peripheral wells were occupied with 15  $\mu$ L each of the *M. oleifera* seed extract (2485  $\mu$ g/mL), the fraction (0-60F) (219  $\mu$ g/mL) and the purified lectin (129 mg/mL). The diffusion experiments were performed in a humid chamber at 4 °C for 48 h. Subsequently the gels were exhaustively washed with 0.15 M NaCl and stained for 2 h with Coomassie Brilliant Blue 0.1% (w/v) prepared in a mixture of ethanol 45 % (v/v) and acetic acid 10 % (v/v).

## **2.7 Humic acid characterization**

The elemental composition of the humic acid (Sigma Aldrich, 53680) was determined with an elemental analyzer (Carlo Elba EA 1108). The elemental composition on a mass basis is C 48.36 %, O 26.91 %, H 4.24 %, N 0.78 % and, S 0.78 %.

## 2.8 Total organic carbon

The total organic carbon (TOC) was determined by the sample under slightly acidic conditions to remove the inorganic carbon. In the outside vial, organic carbon in the sample was digested by persulfate and acid to carbon dioxide. During digestion, the carbon dioxide diffuses into a pH indicator reagent in the inner ampoule. The adsorption of carbon dioxide into the indicator forms carbonic acid. Carbonic acid changes the pH of the indicator solution which, in turn, changes the colour. The amount of colour change is related to the original amount of carbon present in the sample. The results were detected in mg/L of Carbon.

## 2.9 Coagulation activity assay

The coagulation activity assay was based on the method described by Ghebremichael *et al.* (2005). An aliquot of *M. oleifera* samples: extract, 0-60 F and SSMoL (1 mg/mL, 200  $\mu$ L), and positive control (aluminium sulphate 5%, 200  $\mu$ L) were added to 1800  $\mu$ L of humic acid solution with 10 mg/L of Carbon in 3 mL cuvette and homogenized instantly. Absorbance of humic acid was measured at 500 nm using a UV-visible spectrophotometer FEMTO 700 S. Samples were allowed to settle for 1 h and absorbance was measured at 500 nm using a UV-visible spectrophotometer FEMTO 700 S. In order to reduce background effect, a sample volume of 900  $\mu$ L from the top of cuvette was transferred to the cuvette for absorbance measurements every 5 min up to 60 min. Reduction in absorbance relative to humic acid solution with 10 mg/L of Carbon defines coagulation activity. The assays were done in three times.

## 3 Results and Discussions

The yield of purification of the *M. oleifera* lectin determined as the percentage of the hemagglutinating activity recovered after chromatographic separation of the saline fraction (0-60F) on a guar gel was 59 %, similar to the one reported by Wong and Ng (2006) for the lectin obtained from Emperor banana (*Musa basjoo*). The purified protein, named Saline Soluble *Moringa oleifera* lectin (SSMoL), is basic, as confirmed by polyacrylamide gel electrophoresis, and showed two polypeptide bands under denaturing conditions.

The basic question addressed in the present work is whether lectins can bind humic acids present in aqueous solutions. To answer this question two types of assays were performed namely, the hemagglutinating activity and the single radial diffusion. Hemagglutinating activity was detected in all lectin preparations obtained from *M. oleifera* seeds as depicted in Figure 1. In the presence of the humic acid the HA decreased by 94 % for both saline extract (E) and purified lectin (SSMoL) and by 50 % for the protein fraction (0-60F). The single radial diffusion gel showed precipitation bands which indicated that either the extract, the fraction or, the lectin bind the humic acid with 100 and 200 mg/L of Carbon, confirming the result obtained by the HA assay (Figure 2). One possible explanation for this result is that functional groups of the humic acid compete with the carbohydrates present on the surface of the erythrocytes to bind SSMoL, reducing the formation of the mesh agglutination between lectin and erythrocytes.

Carbohydrates are present in surface waters originating from the degradation of organic compounds namely, lignin, cellulose, hemicellulose and, proteins (Sánchez-Monedero *et al.*, 1999). The HA of SSMoL was tested in the presence of D(+)-galactose, L(+)-arabinose, D(+)-glucose and, D(-)-galacturonic acid to assess their potential to interfere with humic acid binding to SSMoL. D(+)-galactose (0.2 M) and L(+)-arabinose (0.0125 M) reduced the HA of SSMoL from  $512^{-1}$  to  $64^{-1}$ . This result might be explained by the fact that D(+)-galactose and L(+)-arabinose compete with the carbohydrates on the surface of the erythrocytes to bind the lectin. The reduction in percentage of the HA in the presence of the humic acid was slightly higher than the one obtained with the above mentioned carbohydrates, 87.5 % and 94 %, respectively.

Therefore competition between both sources of organic carbon to bind SSMoL is to be expected. Nevertheless, considering that about 75 % of the dissolved organic carbon in rivers consists of humic substances (Barreto *et al.*, 2003) the competition constitutes a minor problem considering a future application of lectins to water treatment. D(+)-glucose had no effect on HA of SSMoL at all tested concentrations and D(-)-galacturonic acid dispersed the HA of SSMoL. The halogenated organic compounds trichloroacetic acid, dichloroacetic acid and, chloroform had no effect on the HA of SSMoL.

The effect of mono- and divalent ions on the HA of *M. oleifera* lectin assessed in the presence of the humic acid (Figure 3) have shown that  $K^+$  (5 mM and 10 mM KCl) enhanced the interaction of SSMoL with humic acid, since lower HA was obtained.

Opposite result was obtained with  $\text{Ca}^{2+}$  (10 mM  $\text{CaCl}_2$ ). One possible explanation for this result is that calcium decreases the availability of the humic acid to compete with SSMoL for the carbohydrates on the surface of the erythrocytes; calcium is able to form a metal bridge or salt linkage between the carboxyl groups of the humic acids, which results in the formation of macromolecules with lower ability to bind the carbohydrates than the single humic acid molecules.

The HA of *M. oleifera* lectin assessed in the presence of the humic acid decreased from  $64^{-1}$  to  $32^{-1}$  with the increase of the pH from 7.5 to 8.0. A further increase of pH in the range of 8 to 10 had not effect on SSMoL's HA. The later observation can be explained by assuming that the pH increased the solubility of the humic acid and thus its capability to compete with SSMoL for the carbohydrates on the surface of the erythrocytes

Seeds extract, 0-60F and SSMoL showed coagulant activities with humic acid like the control aluminium sulphate (Figure 4), the best activity was observed with the extract. The use of seed preparations from *M. oleifera* is of great interest as a low cost water treatment to human consumption. SSMoL is a lectin with coagulant properties for humic acid. Coagulant proteins were previously reported in *M. oleifera* seeds (Nadabgengesere *et al.* 1995; Ghebremichael *et al.* 2005; Gassenschmidt *et al.* 1995).

#### **4. Conclusion**

An important conclusion that can be drawn from this study is that *M. oleifera* preparations and lectin showed affinity and coagulant activity with humic acids. This feature might be explored in the field of water treatment to remove humic substances.

#### **Acknowledgements**

The authors express their gratitude to the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq) for research grants and fellowship (LCBBC). Also, the *Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco* (FACEPE), the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES) and VALNATURA Alfa Project are acknowledged for financial support.

#### 4 References

- Aniulyte J, Liesiene J, Niemeyer B. 2006. Evaluation of cellulose-based biospecific adsorbents as a stationary phase for lectin affinity chromatography. *J. Chromatogr. B.* 831: 24-30.
- Barreto SRG, Nozaki J, Barreto WJ. 2003. Origin of dissolved organic carbon studied by UV-vis spectroscopy. *Acta hydrochim. Hydrobiol.* 31: 513-518.
- Correia MTS, Coelho LCBB. 1995. Purification of a glucose/mannose specific lectin, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu bean). *Appl. Biochem. Biotechnol.* 55: 261-273.
- Davis BJ. 1964. Disc electrophoresis II: method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121, 404-427.
- Eish MYZAE, Wells MJM. 2006. Assessing the trihalomethane formation potential of aquatic fulvic and humic acids fractionated using thin-layer chromatography. *J. Chromatogr. A.* 1116: 272-276.
- Elgavish S, Shaanan B. 1997. Lectin-carbohydrate interactions: different folds, common recognition principles. *Trends Biochem Sci.* 22: 462-467.
- Fraguas LF, Batista-Vieira F, Carlsson J. 2004. Preparation of high-density Concanavalin A adsorbent and its use for rapid, high-yield purification of peroxidase from horseradish roots. *J. Chromatogr. B.* 803: 237-241.
- Franco-Fraguas L, Plá A, Ferreira F, Massaldi H, Suárez N, Batista-Viera F. 2003. Preparative purification of soybean agglutinin by affinity chromatography and its immobilization for polysaccharide isolation. *J. Chromatogr. B.* 790: 365-372.
- Gassenschmidt U, Jany KD, Tauscher B, Niebergall H. 1995. Isolation and characterization of a flocculating protein from *Moringa oleifera* Lam. *Biochim. Biophys. Acta.* 1243: 477-481.
- Ghebremichael KA, Gunaratna KR, Henriksson H, Brumer H, Dalhammar G. 2005. A simple purification and activity assay of the coagulant protein from *Moringa oleifera* seed. *Water Res.* 39: 2338-2344.
- Kaur A, Singh J, Kamboj SS, Sexana AK, Pandita RM, Shamnugavel M. 2005. Isolation of an N-acetyl-D-glucosamine specific lectin from the rhizomes of *Arundo donax* with antiproliferative activity. *Phytochemistry.* 66: 1933-1940.

- Kelly LS, Kozak M, Walker TV, Pierce M, Puett D. 2005. Lectin immunoassays using antibody fragments to detect glycoforms of human chorionic gonadotropin secreted by choriocarcinoma cells. *Anal. Biochem.* 338: 253-262.
- Kumari P, Sharma P, Srivastava S, Srivastava MM. 2006. Biosorption studies on shelled *Moringa oleifera* Lamarck seed powder: Removal and recovery of arsenic from aqueous system. *Int. J. Miner. Process.* 78: 131-139.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Le-Clech P, Lee E, Chen V. 2006. Hybrid photocatalysis/membrane treatment for surface waters containing low concentrations of natural organic matters. *Water Res.* 40: 323 - 330.
- Liener IE, Sharon N, Goldstein IJ. 1986. *The Lectins: Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine*. Orlando, FL: Academic Press.
- Lima VLM, Correia MTS, Cechinel YMN, Sampaio CAM, Owen JS, Coelho LCBB. 1997. Immobilized *Cratylia mollis* lectin as a potential matrix to isolate plasma glycoproteins, including lecithin-cholesterol acyltransferase. *Carbohydr. Polym.* 33: 27-32.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Maciel EVM, Araújo-Filho VS, Nakazawa M, Gomes YM, Coelho LCBB, Correia MTS. 2004. Mitogenic activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes. *Biologicals.* 32: 57-60.
- Matilainen A, Vieno N, Tuhkanen T. 2006. Efficiency of the activated carbon filtration in the natural organic matter removal. *Environ Int.* 32: 324-331.
- Moriguchi T, Tahara M, Yaguchi K. 2006. Adsorbability and photocatalytic degradability of humic substances in water on Ti-modified silica. *J. Colloid Interface Sci.* 297: 678-686.
- Ndabigengesere A., Narasiah KS, Talbot BG. 1995. Active agents and mechanism of coagulation of turbid waters using *Moringa oleifera* seeds. *Water Res.* 29: 703-710.
- Okuda T, Baes AU, Nishijima W, Okada M. 1999. Improvement of extraction method of coagulation active components from *Moringa oleifera* seed. *Water Res.* 33: 3373-3378.
- Paiva PMG, Souza AF, Oliva MLV, Kennedy JF, Cavalcanti MSM, Coelho LCBB, Sampaio CAM. 2003. Isolation of a trypsin inhibitor from *Echinodorus paniculatus*

- seeds by affinity chromatography on immobilized *Cratylia mollis* isolectins. *Bioresour. Technol.* 88: 75-79.
- Peumans WJ, Van Damme EJM. 1995. Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiol.* 109: 347-352.
- Reisfeld RA, Lewis UJ, Williams DE. 1962. Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. *Nature* 195: 281-283.
- Sánchez-Monedero MA, Roig A, Cegarra J, Bernal MP. 1999. Relationships between water-soluble carbohydrate and phenol fractions and the humification indices of different organic wastes during composting. *Bioresour. Technol.* 70: 193-201.
- Santos AFS, Argolo ACC, Coelho LCBB, Paiva PMG. 2005. Detection of water soluble lectin and antioxidant component from *Moringa oleifera* seeds. *Water Res.* 39: 975-980.
- Weis WI, Drickamer K. 1996. Structural basis of lectin carbohydrate recognition. *Annu Rev Biochem.* 65: 441-473.
- Shin HS, Monsallier JM, Choppin GR. 1999. Spectroscopic and chemical characterizations of molecular size fractionated humic acid. *Talanta.* 50: 641-647.
- Shirshova LT, Ghabbour EA, Davies G. 2006. Spectroscopic characterization of humic acid fractions isolated from soil using different extraction procedures. *Geoderma* 133: 204-216.
- Wong JH, Ng TB. 2006. Isolation and characterization of a glucose/mannose-specific lectin with stimulatory effect on nitric oxide production by macrophages from the emperor banana. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38: 234-243.
- Xu D, Zhu S, Chen H, Li F. 2006. Structural characterization of humic acids isolated from typical soils in China and their adsorption characteristics to phenanthrene. *Colloids Surf., A: Physicochem. Eng. Aspects.* 276: 1-7.
- Yan Q, Jiang Z, Yang S, Deng W, Han L. 2005. A novel homodimeric lectin from *Astragalus mongholicus* with antifungal activity. *Arch. Biochem. Biophys.* 442: 72-81.

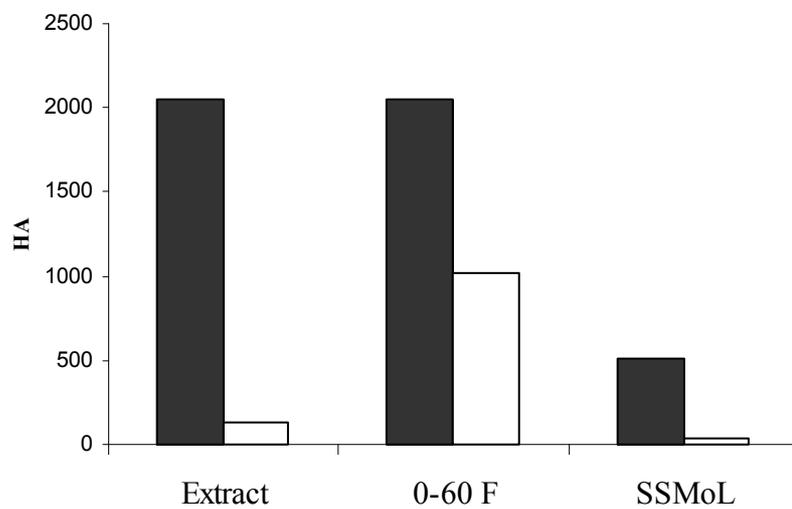


Figure 1 - Comparison of the hemmaglutinating activity (HA) of *M. oleifera* lectin's preparations (black bars) with those obtained in the presence of a humic acid (white bars).

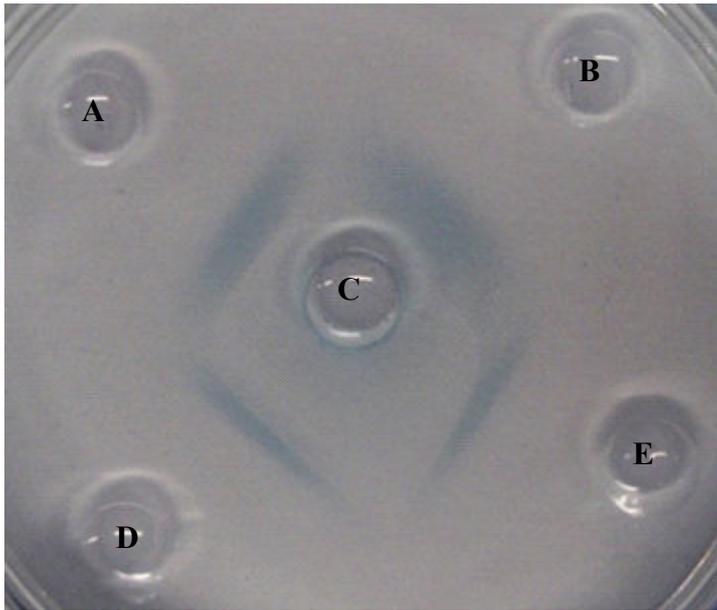


Figure 2 - Precipitation bands observed in an agarose gel corresponding to the interaction between a humic acid (C) and (A) *Moringa oleifera* extract, (B) (0-60)F, (D and E) SSMoL.

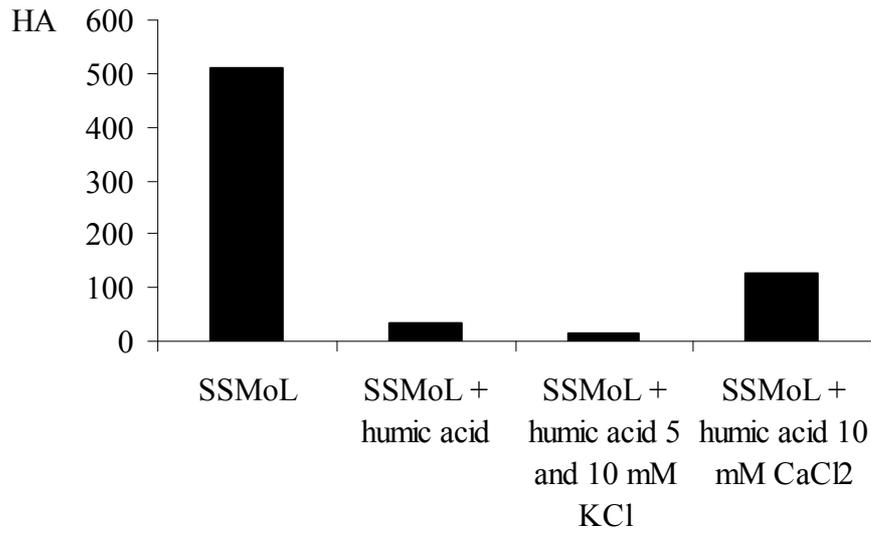


Figure 3 - Effect of the presence of mono- and divalent-ions on the hemmagglutinating activity (HA) of SSMoL measured in the presence of a humic acid.

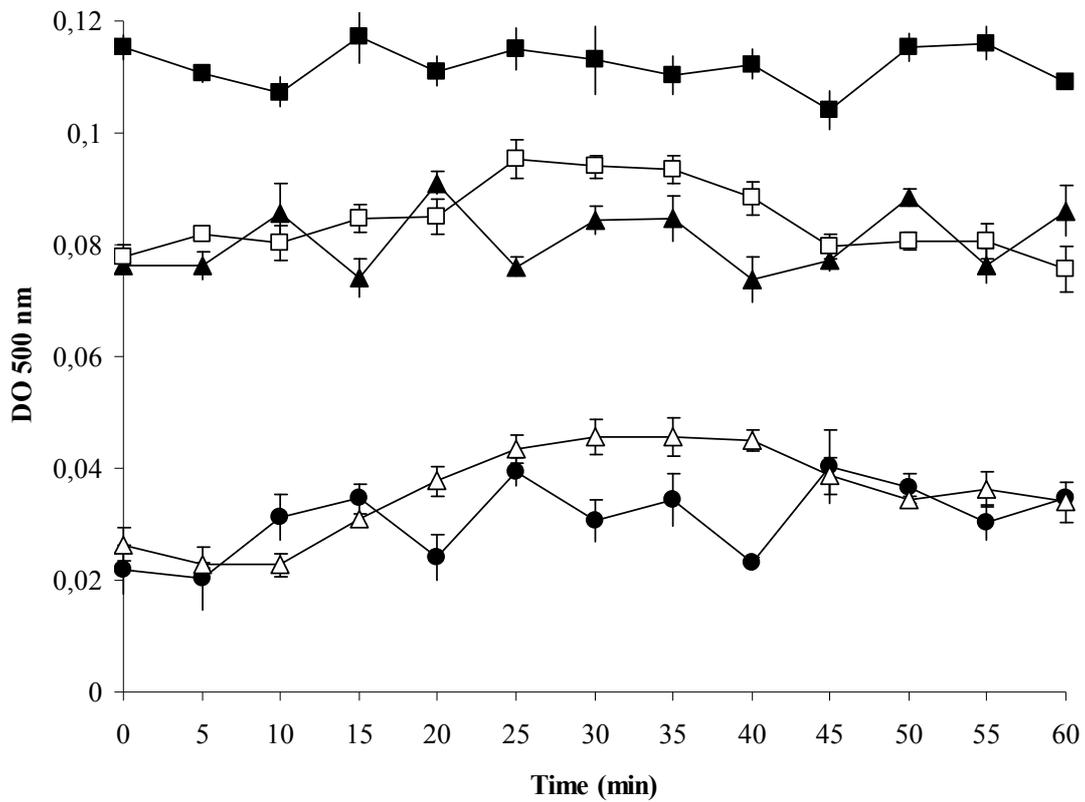


Figure 4. Coagulant activity with humic acid solution (10 mg/L of Carbon). Extract (1 mg/mL, ●), 0-60F (1 mg/mL, ▲), SSMoL (1 mg/mL, □), aluminium sulphate (5% p/v, Δ) and negative control (humic acid 10 mg/L of Carbon, ■). The values represent the mean of three assays ( $\pm$  standard deviation): significant differences between groups were determined at  $p < 0.05$ .

## **Capítulo 5**

### **Screening for Antioxidant Activity of *Moringa oleifera***

**Artigo submetido ao periódico Food Chemistry**

## Screening for Antioxidant Activity of *Moringa oleifera* Tissue Extracts

Santos, A. F. S.; Argolo, A. C. C.; Paiva, P. M. G. & Coelho, L. C. B. B. \*

Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas (CCB),  
Departamento de Bioquímica, Rua Prof. Nelson Chaves S/N, 50670-901, Cidade  
Universitária, Recife-PE, Brasil.

### Abstract

*Moringa oleifera* leaves, flowers and green pods have great human nutritious importance; seeds have been used to water treatment. The antioxidant activity of *M. oleifera* ethanolic (E1) and saline (E2) extracts was investigated. Radical scavenging capacity (RSC) of extracts was determined using dot-blot on thin layer chromatography stained with a 0.4 mM 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH) solution; spectrophotometric assays were recorded (515 nm). Antioxidant components were detected in all E1 and E2 from flowers, inflorescence rachis and leaf tissue. The best RSC was observed with leaf tissue E1; antioxidants present in E2 reacted very slowly with DPPH. The chromatogram revealed with diphenylborinate-2-ethylamine methanolic solution showed that flower, inflorescence and leaf rachis as well as leaf tissue E1 contained at least three flavonoids; flower and leaf E2 showed at least two flavonoids. In conclusion, *M. oleifera* E1 and E2 are sources of antioxidants.

Keywords: *Moringa oleifera*, antioxidant activity, DPPH, radical scavenging capacity.

### 1. Introduction

*Moringa oleifera* (Lam), Moringaceae family is an important source of antioxidants (Santos *et al.*, 2005; Iqbal & Bhangar, 2006; Arabshahi-D, Devi & Urooj, 2007) that could be benefic for human health. Antioxidants are of great importance in terms of preventing stress that may cause several degenerative diseases (Helen *et al.*, 2000). On the other hand, antioxidants are molecules capable of stabilizing or deactivating free radicals before they attack cells (Kaliora *et al.*, 2006). Food antioxidants are important for human nutrition decreasing the oxidative damage to lipids, proteins and nucleic acids induced by free radicals (Soler-Rivas *et al.*, 2000). Frequent consumption of fruits and vegetables is associated with a lowered risk of

cancer, heart disease, hypertension and stroke; the effect has been attributed to the presence of phytochemicals and antioxidants present in foods including flavonoids and anthocyanins (Lako *et al.*, 2007). Antioxidant products present in plants have protective effects in leukemic cells (Ovesná *et al.*, 2006) and prevent oxidative damage in rat liver (Kaur *et al.*, 2006).

*M. oleifera* has been used in human and animal nutrition. The young leaves, flowers and green pods are common vegetables in the Filipino diet (Guevara *et al.*, 1999). Leaves are consumed by South East Asian populations and are believed to have beneficial effects on improved vision and prevention of eye diseases (Liu *et al.*, 2007). In Nigeria, *M. oleifera* leaves are eaten as vegetables without any side effects being reported and are also eaten commonly by infants and children in south India; the high content of  $\beta$ -carotenes helps to prevent the development of vitamin A deficiency (Ghasi *et al.*, 2000). Makkar and Becker (1996) reported that *M. oleifera* leaves had negligible antinutritional factors; tannins, trypsin inhibitors and lectins were not detected. Richter *et al.* (2003) showed that moringa leaves could be used to substitute up to 10% of dietary protein in Nile tilapia without significant reduction on growth. Hypocholesterolemic (Ghasi *et al.*, 2000), hypotensive (Faizi *et al.*, 1995) and antioxidant activities with linoleic acid,  $\alpha$ -tocopherol and sunflower oil (Arabshahi-D *et al.*, 2007) were also found in leaf extract.

*M. oleifera* seeds contain hypotensive (Faizi *et al.*, 1998), antimicrobial (Spiliotis *et al.*, 1998; Ghebremichael *et al.*, 2005) and antioxidant activities (Santos *et al.*, 2005); a potent chemo-preventive agent (Guevara *et al.*, 1999) and a lectin were found (Santos *et al.*, 2005). Seed coagulant properties have been used to water treatment (Okuda *et al.*, 1999) and a coagulant protein was purified (Ghebremichael *et al.*, 2005). The uses of *M. oleifera* have induced several investigations to isolate bioactive compounds from different parts of the species (Guevara *et al.*, 1999).

In this report the antioxidant activity from *M. oleifera* ethanolic and saline extracts were evaluated.

## **2. Materials and methods**

## 2.1. Chemicals

Ethanol, methanol, ethyl acetate, formic acid, acetic acid and rutin were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Epicatechin, epicatechin gallate, epigallocatechin gallate and DPPH radical were acquired from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). All other reagents were of analytical grade.

## 2.2. *M. oleifera* extract preparations

Tissues from *M. oleifera* were collected in Recife City, State of Pernambuco, Northeast of Brazil. A sample of the collected material is archived as voucher specimen number 63184, IPA, at the herbarium “Dárdano de Andrade Lima” (Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária, Recife, Brazil). Ethanolic (E1) and saline (E2) extracts were prepared from dried and powdered flowers (a), inflorescence rachis (b), seeds (c), leaf tissue (d), leaf rachis (e) and fundamental tissues of stem (f). After filtration the extracts were evaporated to dryness, dissolved in methanol and evaporated at room temperature.

## 2.3. Determination of antioxidant activity using DPPH radical

The qualitative assay to evaluate radical-scavenger capacity (RSC) of extracts (E1 and E2, 5 mg/mL, 2  $\mu$ L) and standards (1 mg/mL, 2  $\mu$ L) epicatechin, epicatechin gallate and epigallocatechin gallate were determined (Soler-Rivas *et al.*, 2000) using dot- blots on thin layer chromatography (TLC) plates (Merck, Darmstadt, Germany; silica gel 60F254 20 · 10 cm aluminium backed), stained with a 0.4 mM 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH) solution. The negative control was pure methanol used for dissolving the extracts. Dissolved samples were diluted (1:2, 1:4, 1:8 and 1:16) in order to avoid background colour of samples which could mask the reaction with DPPH, applied in triplicate and left to dry (2-3 min). TLC sheet was immersed upside down in a 0.4 mM DPPH methanolic solution for 2 s. The stained layer (purple colour) revealed yellow spots where drops were placed depending on the RSC of samples. The intensity of yellow colour depended upon the amount and nature of radical scavengers present in sample.

## 2.4. Spectrophotometric analyze to evaluate radical-scavenging capacity

Quantitative assays were performed with spectrophotometric analyze of extracts recorded using the stable radical DPPH. The procedure followed was according to Brand-Williams *et al.* (1995) and Soler-Rivas *et al.* (2000) with some variations. For each extract (E1 and E2), different concentrations were tested. Reactions were monitored for 30 min by the disappearance of DPPH, time during which this radical was stable. The analysis was used to determine the inhibition concentration (IC<sub>50</sub>) and inhibition percentage (IP) of samples, which are widely, used parameters for determining plant extracts RSC. IC<sub>50</sub> is the amount of antioxidant necessary to decrease the initial concentration of DPPH (90 μM) by 50%. IP was the amount of total DPPH (90 μM) reacting with antioxidant at steady state. An aliquot (20 μL) of each extract (5 mg/mL, 2.5 mg/mL and 1.25 mg/mL) was mixed separately with 90 μM methanolic solution of DPPH to a final volume of 1 mL. An equal volume of pure methanol was added to the control tube. The disappearance of DPPH was monitored by the decrease in absorbance at 515 nm, which was recorded after 0, 1, 2, 3, 4 and 5 min, and subsequently every 5 min up to 30 min. The experiments were performed using a Perkin-Elmer Lambda-2 UV–visible spectrophotometer (Toronto, Canada). The concentration of DPPH in the reaction mixture was calculated from a calibration curve according to the following linear regression equation ( $r = 0.99962$ ):  $A_{515\text{ nm}} = 0.0518 + 0.00923 [\text{DPPH}]$ , where [DPPH] is expressed in mg/mL.

The percentage of remaining DPPH (%DPPH<sub>REM</sub>) was calculated according to Brand-Williams *et al.* (1995), as follows:  $\% \text{DPPH}_{\text{REM}} = [\text{DPPH}]_{\text{T}} / [\text{DPPH}]_{\text{T0}} \times 100$ , where T is the time when absorbance was determined (1-30 min) and T<sub>0</sub> is the zero time. IC<sub>50</sub> was calculated by plotting the %DPPH<sub>REM</sub> at the steady state (20 min) against various concentrations of each extract. Results were expressed as mg antioxidant/g DPPH ± standard deviation. An aliquot (50 μL) of each sample (IP determination) was then added to 2 mL of a 90 μM methanolic solution of DPPH radical and the absorbance was determined (515 nm) at the steady state. IP was calculated according to the expression:  $\text{IP} = [(A_{\text{T0}} - A_{\text{TS}}) / A_{\text{T0}}] \times 100$ , where A<sub>T0</sub> is the absorbance at zero time and A<sub>TS</sub> is the absorbance in the steady state. The results were expressed as % of inhibition.

## 2.5. Thin layer chromatography

In order to determine the number of active antioxidant compounds, a drop (15  $\mu$ L) of ethanolic and saline extracts together with positive controls were placed individually on the base line of a TLC plate which was eluted with either ethyl acetate:formic acid:acetic acid:H<sub>2</sub>O (100:11:11:26, v/v/v/v). Spots were visualized under 365 nm UV light (UVP, Model UVGL-25, Upland, CA, USA) and after treatment with 0.4 mM methanolic solution of DPPH with 1% methanolic solution of diphenylborinate-2-ethylamine specific to flavonoids using rutin as positive control.

## 2.6. Chemical assays of *M. oleifera* extracts

The extracts were analyzed using chemical tests with various reagents for classes of compounds normally associated with antioxidant activity following the protocols described by Matos (1988).

## 2.7. Statistical analysis

Values of experimental results showed in tables and figures were the mean of at least three determinations ( $\pm$  standard deviation). Linear regression equations were established using the Origin version 6.0 program (Microcal, Northampton, MA, USA).

## 3. Results and Discussion

*M. oleifera* is a plant of multipurpose uses; some tissues are consumed in the population diet and seeds are used to water treatment for human consumption. These plant properties directed the present study to evaluate *M. oleifera* tissues as sources of natural antioxidants.

There is an increasing interest in antioxidants due to the presumed capacity to prevent the deleterious effects of free radicals in human body and a preference for antioxidants from natural instead of synthetic sources. Phenolic compounds are naturally occurring substances in fruits, vegetables, nuts, seeds, flowers, and some herb beverages; they constitute an integral part of human diet (Katalinić *et al.*, 2004). In view of the diversity among the number of antioxidant assays available, the results of a single

assay can suggest the antioxidant property of plant extract (Brand-Williams *et al.*, 1995). Relatively stable DPPH radical has been widely used to test the ability of compounds to act as free radical scavengers or hydrogen donors and thus to evaluate antioxidant activity. Antioxidant radicals formed are stabilized through the formation of nonradical products (Argolo *et al.*, 2004). Compounds with RSC are able to reduce DPPH as well as type and concentration of antioxidant in samples, interfere in time of appearance and final intensity of yellow colour (Soler-Rivas *et al.*, 2000). Antioxidant components were detected in all *M. oleifera* ethanolic and saline extracts from flowers, inflorescence rachis and leaf tissue (Figure 1) by DPPH reduction after 30 min. Methanolic extract showed high (DPPH) radical-scavenging activity similarly to *Ferula orientalis*, Apiaceae (Kartal *et al.*, 2007).

Quantitative analysis revealed that ethanolic extracts of leaf rachis, inflorescence rachis and leaf tissue reduced DPPH faster than the other extracts; ethanolic extract of seeds reacted very slowly (Figure 2). When antioxidant activity of *M. oleifera* leaf ethanolic extract was assayed with linoleic acid,  $\alpha$ -tocopherol and sunflower oil a strong reaction was revealed (Arabshahi-D *et al.*, 2007). This behavior was correlated with the nature and concentration of antioxidant (Argolo *et al.*, 2004). The steady state was reached in less than 20 min for all ethanolic samples (Figure 2). Saline extracts reacted very slowly.

IC<sub>50</sub> and IP values are considered to be good measures of compound antioxidant efficiencies. Seed ethanolic extracts showed the highest IC<sub>50</sub>; IP values showed that ethanolic extract of leaf rachis, inflorescence rachis and leaf tissue reacted with more than 69% of total DPPH up to steady state (Table 1). Ethanolic extract of flowers, fundamental tissues of stem and seeds reacted with less than 40%. Antioxidants present in saline extracts reacted very slowly with DPPH radical and it was not possible to calculate IC<sub>50</sub> and IP values. Lichen extract of *Cetraria islandica* showed IP value of 100% inhibition on peroxidation of linoleic acid emulsion (Güçin *et al.*, 2002) and leaf extracts from *Bauhinia monandra* presented IP values in the range of 60% (Argolo *et al.*, 2004).

Table 2 presents a summary of classes of compounds that were detected by chemical tests to be present in the plant used in this work. Flavonoids were detected in ethanolic and saline extracts; steroids and triterpenoids were only present in ethanolic extracts. Ethanolic extract from leaves of *B. monandra* are widely used for treating human diabetes and showed antioxidant property (Argolo *et al.*, 2004).

The chromatogram revealed with a methanolic solution of diphenylborinate-2-ethylamine showed that flowers, inflorescence and leaf rachis as well as leaf tissue ethanolic extracts contained at least three flavonoids with the same Rf values (0.18, 0.38 and 0.44, respectively, figure 3). In agreement with the findings of antioxidant activity from *M. oleifera*, Lako *et al.* (2007) reported that leaves showed a high antioxidant capacity and are rich in total polyphenol content, quercetin, kaempferol and  $\beta$ -carotene. Phenolics and polyphenolic compounds constitute the main class of natural antioxidants and are believed to be the major responsible for antioxidant activity of plant materials (Kanatt *et al.*, 2007).

Saline extracts of flower and leaf showed at least two flavonoids (Rf values 0.35, 0.63 and 0.16, 0.34, respectively, figure 3). When DPPH was used to reveal the chromatogram, the presence of antioxidant components was confirmed in the extracts. Apparently no toxic effects have been related to *M. oleifera* leaves; good properties have always been associated to the studies performed.

## **Conclusions**

In the present paper it was found that *M. oleifera* extracts are potential sources of antioxidants. Antioxidant activity was stronger in ethanolic than saline extracts of tissues. Leaf tissue ethanolic extract showed the best scavenging capacity to DPPH radical. Antioxidant properties of *M. oleifera* tissues can provide more useful applications of many parts of this plant in the alimentation and seeds to water treatment for human consumption.

## **Acknowledgements**

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

## References

- Arabshahi-D, S., Devi, D. V., & Urooj, A. (2007). Evaluation of antioxidant activity of some plant extracts and their heat, pH and storage stability. *Food Chemistry*, *100*, 1100-1105.
- Argolo, A. C. C., Sant'Ana, A. E. G., Pletsh, M., & Coelho, L. C. B. B. (2004). Antioxidant activity of leaf extracts from *Bauhinia monandra*. *Bioresource Technology*, *95*, 229-233.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, *28*, 25-30.
- Faizi, S., Siddiqui, B. S., Saleem, R., Aftab, K., Shaheen, F., & Gilani, A. H. (1998). Hypotensive constituents from the pods of *Moringa oleifera*. *Planta Medica*, *64*, 225-228.
- Faizi, S., Siddiqui, B. S., Saleem, R., Siddiqui, S., Aftab, K., & Gilani, A. H. (1995). Fully acetylated carbamate and hypotensive thiocarbamate glycosides from *Moringa oleifera*. *Phytochemistry*, *38*, 957-963.
- Ghasi, S., Nwobodo, E., & Ofili, J. O. (2000). Hypocholesterolemic effects of crude extract of leaf of *Moringa oleifera* Lam in high-fat diet fed wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology*, *69*, 21-25.
- Ghebremichael, K. A., Gunaratna, K. R., Henriksson, H., Brumer, H., & Dalhammar, G. (2005). A simple purification and activity assay of the coagulant protein from *Moringa oleifera* seed. *Water Research*, *39*, 2338-2344.
- Güçin, I., Oktay, M., Küfrevioğlu, I., & Aslan, A. (2002). Determination of antioxidant activity of lichen *Cetraria islandica* (L) Ach. *Journal of Ethnopharmacology*, *79*, 325-329.
- Guevara, A. P., Vargas, C., Sakurai, H., Fujiwara, Y., Hashimoto, K., Maoka, T., Kozuka, M., Ito, Y., Harukuni, T., & Nishino, H. (1999). An antitumor promoter from *Moringa oleifera* Lam. *Mutation Research*, *440*, 181-188.
- Helen, A., Krishnakumar, K., Vijayammal, P. L., & Augusti, K. T. (2000). Antioxidant effect of onion oil (*Allium cepa*. Linn) on the damage induced by nicotine in rats as compared to alpha-tocopherol. *Toxicology Letters*, *116*, 61-68.
- Iqbal, S., & Bhangar, M. I. (2006). Effect of season and production location on antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaves grown in Pakistan. *Journal of Food Composition and Analysis*, *19*, 544-555.

- Kaliora, A. C., Dedoussis, G. V. Z., & Schmidt, H. (2006). Dietary antioxidants in preventing atherogenesis. *Atherosclerosis*, *187*, 1-17.
- Kanatt, S. R., Chander, R., & Sharma, A. (2007). Antioxidant potential of mint (*Mentha spicata* L.) in radiation-processed lamb meat. *Food Chemistry*, *100*, 451-458.
- Kartal, N., Sokmen, M., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M., & Sokmen, A. (2007). Investigation of the antioxidant properties of *Ferula orientalis* L. using a suitable extraction procedure. *Food Chemistry*, *100*, 584-589.
- Katalinić, V., Milos, M., Modun, D., Musić, I., & Boban, M. (2004). Antioxidant effectiveness of selected wines in comparison with (+) catechin. *Food Chemistry*, *86*, 593-600.
- Kaur, G., Alam, M. S., Jabbar, Z., Javed, K., & Athar, M. (2006). Evaluation of antioxidant activity of *Cassia siamea* flowers. *Journal of Ethnopharmacology*, *108*, 340-348.
- Lako, J. V., Trenerry, C., Wahlqvist, M., Wattanapenpaiboon, N., Sotheeswaran, S., & Premier, R. (2007). Phytochemical flavonols, carotenoids and the antioxidant properties of a wide selection of Fijian fruit, vegetables and other readily available foods. *Food Chemistry*, *101*, 1727-1741.
- Liu, Y., Perera, C. O., & Suresh, V. (2007). Comparison of three chosen vegetables with others from South East Asia for their lutein and zeaxanthin content. *Food Chemistry*, *101*, 1533-1539.
- Makkar, H. P. S., & Becker, K. (1996). Nutritional value and antinutritional components of whole and ethanol extracted *Moringa oleifera*. *Animal Feed Science and Technology*, *63*, 211-228.
- Matos, F. J. A. (1988). *Introdução a Fitoquímica Experimental*. Fortaleza: Edições UFC.
- Okuda, T., Baes, A. U., Nishijima, W., & Okada, M. (1999). Improvement of extraction method of coagulation active components from *Moringa oleifera* seed. *Water Research*, *33*, 3373-3378.
- Ovesná, Z., Kozics, K., & Slameňová, D. (2006). Protective effects of ursolic acid and oleanolic acid in leukemic cells. *Mutation Research*, *600*, 131-137.
- Richter, N., Siddhuraju, P., & Becker K. (2003). Evaluation of nutritional quality of *Moringa* (*Moringa oleifera* Lam.) leaves as an alternative protein source for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *Aquaculture*, *217*, 599-611.

- Santos, A. F. S., Argolo, A. C. C., Coelho, L. C. B. B., & Paiva, P. M. G. (2005). Detection of water soluble lectin and antioxidant component from *Moringa oleifera* seeds. *Water Research*, *39*, 975-980.
- Soler-Rivas, C., Espín, J. C., & Wichers, H. J. (2000). An easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of foodstuffs. *Phytochemical Analysis*, *11*, 1-9.
- Spiliotis, V., Lalas, S., Gergis, V., & Dourtoglou, V. (1998). Comparison of antimicrobial activity of seeds of different *Moringa oleifera* varieties. *Pharmaceutical and Pharmacological Letters*, *8*, 39-40.

(A)

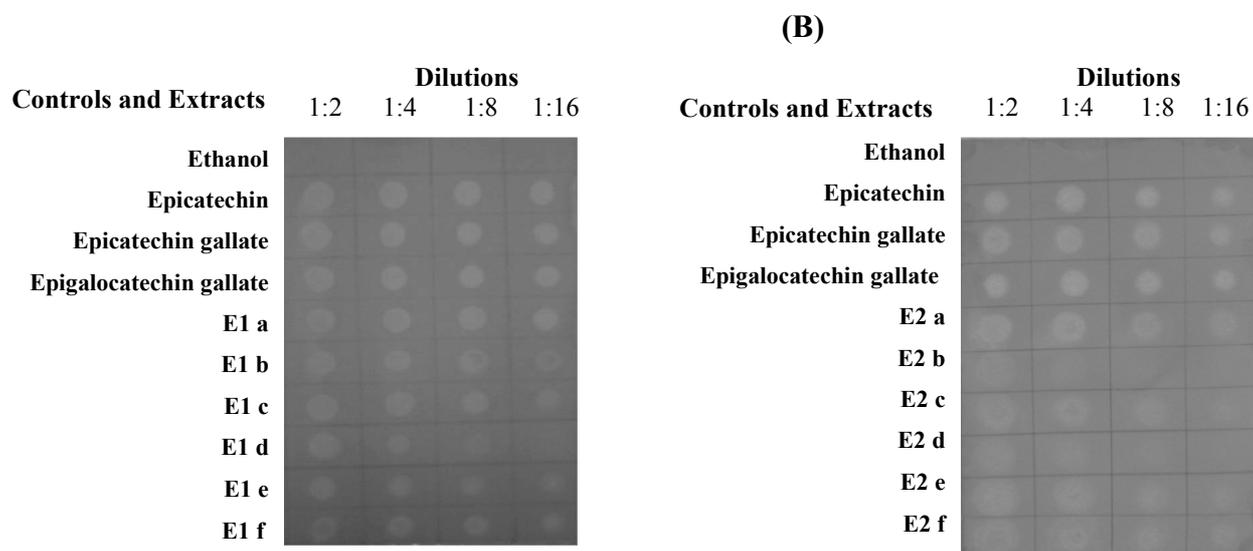
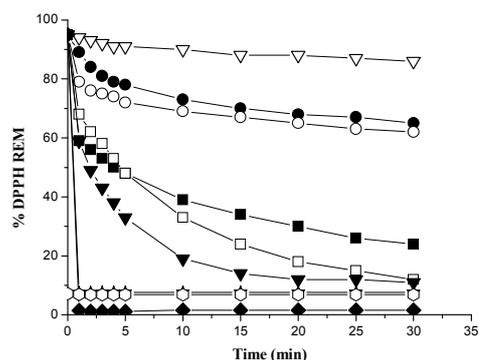
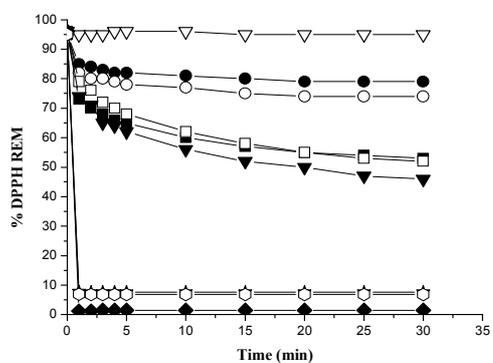


Figure 1. Qualitative assay using silica gel TLC plates stained with 0.4 mM methanolic solution of DPPH. Standard concentrations: 1.0, 0.5, 0.25 and 0.125 mg/mL; extract concentrations: 2.5, 1.25, 0.625 and 0.312 mg/mL. (A): Ethanolic, E1 and (B): saline, E2 extracts: Flowers (a), fundamental tissues of stem (b), leaf rachis (c), seeds (d), inflorescence rachis (e), and leaf tissue (f).

(A)



(B)



(C)

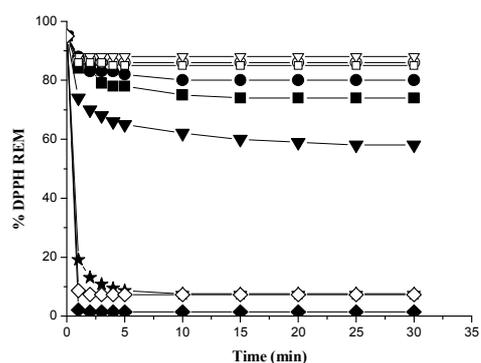


Figure 2. Kinetic behaviour of ethanolic extracts from *M. oleifera*. Reaction (515 nm) was performed with 5 mg/mL (A), 2.5 mg/mL (B) and 1.25 mg/mL (C) in a methanolic solution of DPPH. Samples: (○) flowers, (□) inflorescence rachis, (▽) seeds, (▼) leaf tissue, (■) leaf rachis, (●) fundamental tissues of stem, (★) epicatechin, (◆) epicatechin gallate, and (◇) epigallocatechin gallate.

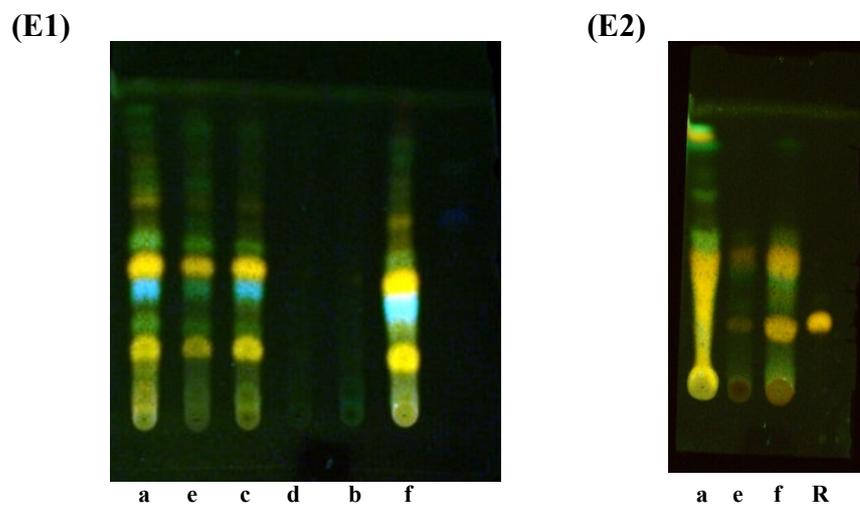


Figure 3. Chromatogram revealed with a methanolic solution of diphenylborinate-2-ethylamine specific to flavonoids. E1: Ethanolic and E2: Saline extracts: flowers (a), fundamental tissues of stem (b), leaf rachis (c), seeds (d), inflorescence rachis (e) and leaf tissue (f). R, Rutin (positive control).

Table 1. Percentage of total DPPH reacting with antioxidant ethanolic extracts and amount of antioxidant from extracts decreasing initial concentration of DPPH by 50%.

Extracts	IP (%)			IC50 (mg/g DPPH)
	5 mg/mL	2.5 mg/mL	1.25 mg/mL	
a	35.0	25.4	13.8	0.21
b	31.7	20.4	20.8	0.3
c	69.7	44.6	20.0	0.09
d	10.8	2.6	10.8	2.92
e	81.2	43.6	12.4	0.008
f	86.9	49.5	39.9	0.06

Flowers (a), fundamental tissues of stem (b), leaf rachis (c), seeds (d), inflorescence rachis (e) and leaf tissue (f). IP extracts (5 mg/mL, 2.5 mg/mL and 1.25 mg/mL) were calculated at the steady state (20 min). IC50 was calculated at the steady state (20 min).

Table 2. Classes of compounds detected in *M. oleifera* extracts employed in this study

Extracts	Phenols	Flavonones	Flavonoids, flavanonols, flavanonois, free xanthones, heterosides	Flavones, flavonoids, xanthones	Free Steroids	Pentacyclic triterpenes	Leucoantho- cyanidins
E1 a	+ <sup>a</sup>	+	+	+	+	-	-
E1 b	- <sup>a</sup>	-	-	+	-	-	-
E1 c	+	+	+	+	-	+	-
E1 d	-	+	-	+	-	-	-
E1 e	+	+	-	+	+	-	-
E1 f	+	+	+	+	-	+	-
E2 a	+	+	+	+	ND <sup>a</sup>	ND	-
E2 e	+	+	-	+	ND	ND	-
E2 f	+	+	-	-	ND	ND	-

Ethanollic (E1) and saline (E2) extracts: Flowers (a), fundamental tissues of stem (b), leaf rachis (c), seeds (d), inflorescence rachis (e), and leaf tissue (f). <sup>a</sup> +: detected; -: not detected; ND: not determined.

## **Capítulo 6**

### **Conclusões e Perspectivas**

## CONCLUSÕES E PESPECTIVAS

1. Extratos de tecidos distintos de *M. oleifera* mostraram AH. Uma lectina solúvel em salina (SSMoL) foi purificada de sementes usando uma técnica simples, após definir o protocolo. Extrato e F0-60 de sementes, e SSMoL mostraram propriedades coagulantes na água. Resultados similares foram observados com o sulfato de alumínio, o coagulante sintético mais usado no tratamento da água em todo o mundo. Preparações de sementes de *M. oleifera* e SSMoL podem ser aplicadas no tratamento da água para consumo humano.
2. Lectina de sementes de *M. oleifera* e suas preparações possuem forte afinidade com ácido húmico e atividade coagulante com esse composto orgânico. Esses achados podem ser explorados para o tratamento da água e remoção de substâncias húmicas.
3. Extratos de *M. oleifera* são fontes potenciais de antioxidantes. Atividade antioxidante foi mais forte em extratos etanólicos do que em extratos salinos. Tecido de folha mostrou melhor capacidade de capturar o radical livre DPPH. As propriedades antioxidantes dos tecidos de *M. oleifera* podem fornecer mais aplicações de muitas partes da planta na alimentação e das sementes no tratamento de água para consumo humano.